

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035322**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.28

(21) Номер заявки
201592049

(22) Дата подачи заявки
2014.05.28

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

(54) АНТИТЕЛО С "ЗАПИРАЮЩИМИ" СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ЛЕКАРСТВА БЕЛКОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

(31) **61/827,763**

(32) **2013.05.28**

(33) **US**

(43) **2016.04.29**

(86) **PCT/US2014/039821**

(87) **WO 2014/193973 2014.12.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДиэСБи-ЮэСЭй ЛЛК (US); ГАОСЮН
МЕДИКЛ ЮНИВЕРСИТИ (TW)**

(72) Изобретатель:
**Чэн Тянь-Лу, Чуан Чи-Хун, Ко Хсю-
Фень, Люй Юнь-Чи (TW)**

(74) Представитель:
Клюкин В.А. (RU)

(56) **US-A1-20120244154**
US-A1-20110287009
US-A1-20100248279
US-A1-20100029497
US-A1-20060018903
US-A1-20130011394
US-A1-20080292628

(57) Изобретение предусматривает антитело с шарнирной областью, способное селективно активироваться в клетке-мишени или в ткани-мишени для лечения заболевания. Антитело с шарнирной областью включает функциональное антитело, два ингибиторных домена и четыре отщепляемых линкера. Функциональное антитело в активированном состоянии способно к лечению указанного заболевания и содержит две лёгких цепи и две тяжёлых цепи. Каждый ингибиторный домен представляет собой шарнирный домен иммуноглобулина A (IgA), иммуноглобулина D (IgD) или иммуноглобулина G (IgG) или фрагмент шарнирного домена, причём каждый ингибиторный домен состоит из двух пептидных плечей, соединённых друг с другом дисульфидными связями. Каждый отщепляемый линкер содержит пептидный субстрат, расщепляемый ферментом, который специфически или с высокой степенью экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени и по отдельности соединяет одно из двух пептидных плечей каждого ингибиторного домена с каждым N-концом одной из двух лёгких цепей и двух тяжёлых цепей функционального антитела. Раскрыт также способ лечения рака или аутоиммунного заболевания с использованием антитела с шарнирной областью по изобретению.

B1**035322****035322****B1**

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится, в общем, к молекулам на основе антител, пригодным в качестве терапевтических агентов при лечении различных заболеваний. Более конкретно, данное изобретение относится к антителам с шарнирными областями, которые селективно активированы в клетке-мишени или в ткани-мишени для того, чтобы осуществлять лечение заболеваний.

2. Описание уровня техники

Терапевтические агенты на основе антител, включая моноклональные антитела, появляются как один из основных классов лекарств, являющихся эффективными при лечении различных заболеваний. Из 10 лекарств, занимавших первые места при продаже в мире в 2012 г., пять относились к терапевтическим антителам, включая HUMIRA™, REMICADE™, RITUXAN™, HERCEPTIN™ и AVASTIN™. Указанные пять лекарств принесли прибыль, превысившую 45 миллиардов долларов во всём мире, что составило примерно 60% от прибыли, которую в этом году принесла продажа терапевтических агентов на основе антител во всём мире. Ожидается, что их мировая продажа будет непрерывно расти, так как расширяется одобренное применение существующих продуктов и новые лекарства появляются на рынке.

Хотя указанная область продолжает развиваться, многочисленные проблемы препятствуют более эффективному и разрешённому появлению кандидатов на основе антител на рынке. Одной из проблем, связанных с имеющимися в настоящее время терапевтическими агентами на основе антител, является их недостаточная селективность к участку их действия. Моноклональные антитела и растворимые белки слияния являются специфическими при связывании с молекулярными мишенями (такими как антигены и рецепторы на поверхности клеток) и их нейтрализации. Однако большинство молекулярных мишеней не является специфическим к участку заболевания, скорее, они могут находиться в клетках и тканях, которые не являются участками заболевания. Соответственно терапевтический агент может действовать в этих здоровых нормальных клетках или тканях. Это побочное (нецелевое) действие может привести к нежелательным побочным эффектам. Следовательно, желательно создание терапевтических агентов направленного действия на основе антител.

Одной из возможных схем, которая позволяет избежать побочного действия и повысить селективность, является разработка проантител, активируемых в сайте-мишени. Например, в патенте США № 8399219 и опубликованной заявке США на патент № 2010/0189651 описаны активируемые протеазой антитела, которые модифицированы пептидной "маской" или маскирующим фрагментом. В этих документах для скрининга пептидов или фрагментов, способных к ингибированию/восстановлению связывания функционального антитела с его мишенью, используется техника фагового дисплея. Однако маскирующие молекулы, полученные этими методами, не могут применяться универсально для всех антител, для которых они идентифицируются на основе их ингибиторной способности в отношении специфической мишени. Следовательно, при использовании этого подхода необходимо получать маскирующую молекулу для каждого терапевтического агента на основе антитела, что требует значительного времени, является дорогим и сложным. Кроме того, введение маскирующих фрагментов приводит к риску индукции нежелательного иммунного ответа у субъекта.

Похожий подход описан в опубликованной заявке США на патент № 2010/0189727, в которой предлагается маскирующий лиганд, нековалентно связанный с антиген-связывающим сайтом антитела с инактивацией антитела. В частности, маскирующий лиганд содержит две копии эпитопа антигена, с которым специфически связывается антитело, и отщепляемый полипептидный линкер, присоединённый к каждой копии эпитопа. Как и в случае техники фагового дисплея, описанной выше, необходимо также специально получать маскирующий лиганд для каждого антитела, и, следовательно, создание такого инактивированного антитела также требует много времени и больших расходов. Кроме того, поскольку маскирующий лиганд имеет высокое сродство к терапевтическому антителу, могут быть некоторые маскирующие лиганды, присоединённые к антителу после отщепления полипептидного отщепляемого линкера. Эти остаточные маскирующие лиганды могут препятствовать терапевтическому действию антитела.

Ввиду вышесказанного, в уровне техники существует необходимость в создании следующего поколения терапевтических агентов, которые тщательно разработаны и созданы для того, чтобы они обладали такими свойствами, как повышенная селективность сайта действия, а также повышенная эффективность. Кроме того, такие схемы разработки и создания должны применяться для широкого круга терапевтических агентов на основе антител и не должны вызывать нежелательного иммунного ответа.

Сущность изобретения

Ниже излагается упрощённая сущность данного изобретения для того, чтобы обеспечить читателю основное понимание изобретения. Это изложение сущности не является исчерпывающим обзором данного изобретения и в нём не идентифицированы ключевые/критические элементы настоящего изобретения или не определён объём изобретения. Единственная цель этого изложения состоит в представлении некоторых концепций, которые описаны в упрощённом виде как прелюдия к более подробному описанию, которое приведено ниже.

Согласно одному из аспектов данное изобретение предусматривает антитело с шарнирной областью. Этот терапевтический агент на основе антитела способен селективно активироваться в клетке-

мишени или ткани-мишени для лечения заболевания в клетке-мишени или ткани-мишени.

Согласно различным вариантам данного изобретения антитело с шарнирной областью включает функциональное антитело, два ингибиторных домена и четыре отщепляемых линкера. Функциональное антитело способно к лечению заболевания в активированном состоянии и включает две лёгких цепи и две тяжёлых цепи. Каждый из двух ингибиторных доменов состоит из двух пептидных "плечей", связанных друг с другом дисульфидными связями. Каждый из четырёх отщепляемых линкеров включает пептидный субстрат, расщепляемый ферментом, который специфически или высоко экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени. Каждый отщепляемый линкер соединяет одно из двух пептидных плечей двух ингибиторных доменов с N-концами одной или двух лёгких цепей и двух тяжёлых цепей в функциональном антителе.

В соответствии с некоторыми вариантами данного изобретения каждый из двух ингибиторных доменов представляет собой домен, содержащий шарнирную область иммуноглобулина A (IgA), иммуноглобулина D или иммуноглобулина G (IgG) или фрагмент такого домена с шарнирной областью. Например, ингибиторный домен может включать любую из следующих последовательностей: SEQ ID Nos. 10, 11, 12 и 13 в IgG, 14 и 15 в IgA и 54 и 55 в IgD.

Согласно возможным вариантам функциональное антитело представляет собой антитело к TNF- α , антитело к RANKL, антитело к CTLA-4, антитело к HER2, антитело к EGFR, антитело к VEGF, антитело к VEGFR2, антитело к IL6R, антитело к IL12/23, антитело к CD3, антитело к CD11a, антитело к CD20, антитело к CD25, антитело к CD30, антитело к CD33 или антитело к CD52. Например, аминокислотная последовательность лёгкой цепи функционального антитела является любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9; в то время как аминокислотная последовательность тяжёлой цепи функционального антитела является любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID Nos. 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 и 66.

Согласно некоторым вариантам пептидный субстрат расщепляется любым из следующих ферментов: матриксной металлопротеиназой (MMP), катепсином (CTS), каспазой (CASP) или дисинтегрином и металлопротеиназой (ADAM). Например, согласно некоторым вариантам фермент представляет собой MMP-2 или MMP-9, и каждый отщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 16.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения функциональное антитело представляет собой антитело к TNF- α , которое содержит лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 58, при этом каждый из отщепляемых линкеров содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 16; и каждый из ингибиторных доменов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 10.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к экспрессионной системе для получения антител с шарнирной областью в соответствии с указанными выше аспектами/вариантами данного изобретения.

Согласно различным вариантам настоящего изобретения экспрессионная система включает последовательность первой нуклеиновой кислоты и последовательность второй нуклеиновой кислоты. Последовательность первой нуклеиновой кислоты содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу область, кодирующую первый ингибиторный домен, область, кодирующую первый отщепляемый линкер, и область, кодирующую первое пептидное плечо. Область, кодирующая первый ингибиторный домен, кодирует первое пептидное плечо ингибиторного домена любого из описанных выше антител. Область, кодирующая первый отщепляемый линкер, кодирует отщепляемый линкер упомянутого выше антитела с шарнирной областью, и отщепляемый линкер является пептидным субстратом, который расщепляется ферментом, который экспрессирован специфически или высоко в клетке-мишени или в ткани-мишени. Область, кодирующая лёгкую цепь функционального антитела, кодирует лёгкую цепь упомянутого выше антитела с шарнирной областью, в котором функциональное антитело способно к лечению в активированном состоянии. Вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу область, кодирующую второй ингибиторный домен, область, кодирующую второй отщепляемый линкер, и область, кодирующую второе пептидное плечо ингибиторного домена антитела с шарнирной областью. Область, кодирующая второй отщепляемый линкер, кодирует отщепляемый линкер антитела с шарнирной областью. Область, кодирующая тяжёлую цепь, кодирует тяжёлую цепь функционального антитела в антителе с шарнирной областью.

Согласно некоторым возможным вариантам данного изобретения первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты могут быть встроены в один экспрессионный вектор. Например, экспрессионная система может также содержать соединяющую последовательность нуклеиновой кислоты, которая соединяет последовательность первой нуклеиновой кислоты и последовательность второй нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры соединяющей последовательности нуклеиновой кислоты включают последовательность, кодирующую полипептид фурин-2A или последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

В случае, когда последовательности первой и второй нуклеиновой кислоты встроены в один экс-

прессионный вектор, экспрессионная система может также необязательно включать регуляторную последовательность, функционально соединённую с последовательностью первой нуклеиновой кислоты и последовательностью второй нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы регулировать трансляцию последовательности первой нуклеиновой кислоты, последовательности второй нуклеиновой кислоты и необязательно последовательности соединяющей нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Альтернативно, экспрессионная система может включать по меньшей мере две отдельных регуляторных последовательности, функционально соединённые с последовательностью первой нуклеиновой кислоты и последовательностью второй нуклеиновой кислоты соответственно, для осуществления индивидуальной регуляции экспрессии последовательности первой и второй нуклеиновой кислоты.

Согласно некоторым другим вариантам последовательности первой и второй нуклеиновой кислоты могут быть встроены в два отдельных экспрессионных вектора. Например, последовательность первой нуклеиновой кислоты вместе с функционально связанной первой регуляторной последовательностью встраивается в первый экспрессионный вектор, в то время как последовательностью второй нуклеиновой кислоты вместе с функционально связанной второй регуляторной последовательностью встраивается во второй экспрессионный вектор. Первый и второй экспрессионные векторы могут быть затем доставлены и экспрессированы в одной и той же клетке-хозяине или в разных клетках хозяина.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения ингибиторный домен представляет собой шарнирный домен иммуноглобулина A (IgA), иммуноглобулина D или иммуноглобулина G (IgG) или фрагмент этого шарнирного домена.

Согласно различным вариантам настоящего изобретения экспрессионная система кодирует любое из упомянутых выше антител с шарнирной областью. Например, когда экспрессионная система создаётся одной конструкцией, последовательность нуклеиновой кислоты конструкции может быть любой из SEQ ID Nos. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50. В случае, когда экспрессионная система создаётся как двухвекторная (или двухплазмидная) система, последовательность первой нуклеиновой кислоты представляет собой любую из SEQ ID Nos. 67, 69, 71, 73, 75 и 77; в то время как последовательность второй нуклеиновой кислоты представляет собой любую из SEQ ID Nos. 68, 70, 72, 74, 76 и 78.

Согласно ещё одному аспекту данное изобретение относится к рекомбинантному вектору, пригодному для получения антител с шарнирной областью в соответствии с описанными выше аспектами/вариантами настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения рекомбинантный вектор включает молекулу синтетической нуклеиновой кислоты в соответствии с описанными выше аспектами/вариантами настоящего изобретения, и одну или более регуляторных последовательностей, функционально соединённых с молекулой синтетической нуклеиновой кислоты таким образом, что вектор в подходящих условиях и в подходящей клетке-хозяине способен к экспрессии антитела с шарнирной областью в соответствии с описанными выше аспектами/вариантами настоящего изобретения.

Согласно ещё одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, в частности субъекта, больного раком или аутоиммунным заболеванием.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения такой способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антител с шарнирными областями в соответствии с описанными выше аспектами/вариантами настоящего изобретения. Например, антитело с шарнирной областью может быть введено субъекту перорально, подкожно, внутривенно, внутритекально или внутримышечно.

Многие из признаков и преимуществ настоящего изобретения станут более понятными после ознакомления со следующим подробным описанием, рассматриваемым вместе с прилагаемыми чертежами.

Краткое описание чертежей

Данное изобретение будет легче понять из следующего подробного описания в свете прилагаемых чертежей, где:

фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую структуру антитела с шарнирной областью согласно некоторым вариантам данного изобретения;

фиг. 2 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую схему конструирования антитела с шарнирной областью согласно некоторым вариантам данного изобретения;

фиг. 3 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело с шарнирной областью согласно некоторым вариантам данного изобретения;

фиг. 4 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую полную структуру антитела с шарнирной областью согласно некоторым вариантам данного изобретения;

фиг. 5 показывает фотографию геля SDS PAGE согласно одному примеру выполнения данного изобретения;

фиг. 6 показывает фотографию двух гелей SDS PAGE согласно одному примеру выполнения данного изобретения;

фиг. 7 отражает столбчатый график, иллюстрирующий способность к связыванию различных антител согласно одному примеру выполнения данного изобретения;

фиг. 8 отражает столбчатый график, иллюстрирующий сигнал TNF- α согласно одному примеру выполнения данного изобретения;

фиг. 9 отражает столбчатый график, иллюстрирующий способность к связыванию различных анти-тел согласно другому примеру выполнения данного изобретения;

на фиг. 10 приведён столбчатый график, иллюстрирующий способность к связыванию различных антител согласно ещё одному примеру выполнения данного изобретения;

на фиг. 11 показаны фотографии, иллюстрирующие *in vivo* локализацию и активацию антитела к α EGFR с шарнирной областью на участке опухоли у мышей согласно одному примеру выполнения данного изобретения;

на фиг. 12 приведён график, показывающий *in vivo* противовоспалительное действие антитела к TNF α с шарнирной областью в случае артрита, индуцированного коллагеном.

В соответствии с общепринятой практикой различные описанные признаки/элементы показаны не в масштабе, а изображены для лучшей иллюстрации конкретных признаков/элементов, относящихся к данному изобретению. Позиции и обозначения на различных чертежах использованы для указания похожих частей/элементов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Подробное описание, приводимое ниже, вместе с описанием чертежей предназначено для описания примеров и не представляет собой единственную форму осуществления или использования изобретения. Описание иллюстрирует проведение примеров и последовательность стадий осуществления примера. Однако в различных примерах могут быть применены одинаковые или эквивалентные функции и последовательности.

Для удобства некоторые термины, применяемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, приведены в данном разделе. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же самое значение, которое является общепринятым для специалиста в данной области, к которой относится данное изобретение.

Если в данной заявке не указано иное, технические и научные термины, используемые в данной заявке, будут иметь значение, которое является понятным и применяемым средним специалистом в данной области. Если в контексте не требуется иное, следует иметь в виду, что термины в единственном числе будут включать множественные формы этих терминов, и термины во множественном числе будут включать единственное число. Конкретно, термины, используемые в единственном числе в описании и в формуле изобретения, включают термины во множественном числе, если из контекста не следует иное. Используемые в описании и в формуле изобретения термины "по меньшей мере один" и "один или более" имеют то же значение и включают один, два, три или более элементов.

Несмотря на то что численные интервалы и параметры, представляющие широкий объём изобретения, являются приблизительными, численные величины, указанные в конкретных примерах, приведены как имеющие возможно точное значение. Однако любой численной величине присуща некоторая ошибка, которая с необходимостью вытекает из стандартного отклонения при проведении соответствующих измерений. Используемый в данной заявке термин "примерно" обычно означает отклонение равное 10, 5, 1 или 0.5% от данной величины или интервала. Альтернативно, термин "примерно" означает приемлемую стандартную ошибку среднего значения при рассмотрении его специалистом в данной области.

Термин "терапевтический агент на основе антитела" означает терапевтический агент, который ингибирует фармакологическое действие эндогенных белков или патогенов в организме человека. Указанный "терапевтический агент", когда он содержится в терапевтически эффективном количестве, приводит к получению желательного терапевтического эффекта у субъекта. Для целей данного изобретения терапевтические агенты на основе антител охватывают антитела и белки слияния, которые являются высоко специфическими при связывании молекул-мишеней или при их нейтрализации.

Термин "антитело", используемый в данной заявке, включает полноразмерные антитела и любой их антиген-связывающий фрагмент или их одиночные цепи. Основной функциональной единицей каждого антитела является мономер иммуноглобулина, который представляет собой молекулу Y-образной формы, состоящую из двух тяжёлых цепей и двух лёгких цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями. Термин "функциональное антитело" охватывает полноразмерное антитело или один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность антитела к специфическому связыванию; примеры таких функциональных фрагментов включают Fab (антиген-связывающий фрагмент), Fv (вариабельный фрагмент), а также F(ab')₂, Fab', scFv (вариабельный фрагмент одиночной цепи) и т.п. Антитело может быть моноклональным или поликлональным и может быть антителом человеческого или не человеческого происхождения или химерным белком.

В данной заявке термин "отщепляемый линкер" представляет собой пептидный субстрат, расщепляемый ферментом. При этом отщепляемый линкер, будучи расщеплённым ферментом, обеспечивает активацию данной шарнирной молекулы антитела. Предпочтительно, если отщепляемый линкер выбирается таким образом, чтобы активация возникала на желательном участке действия, который может быть сайтом или располагаться вблизи клеток-мишеней (например, клеток карциномы) или тканей-мишеней.

Например, отщепляемый линкер является пептидным субстратом, специфическим по отношению к ферменту, который специфически или с высокой степенью экспрессирован на участке действия так, что скорость расщепления отщепляемого линкера на участке-мишени больше, чем в других местах, отличных от участка-мишени.

Термин "лиганд" означает любую молекулу, которая специфически связывается или реактивно ассоциируется или образует комплексы с рецептором, субстратом, антигенной детерминантой или другим сайтом связывания на клетке или в тканях-мишенях. Примеры лигандов включают антитела и их фрагменты (например, моноклональное антитело или его фрагмент), ферменты (например, фибринолитические ферменты), модификаторы биологического ответа (например, интерлейкины, интерфероны, эритропоэтин или колониестимулирующие факторы), пептидные гормоны и их антиген-связывающие фрагменты.

Применяемый в данной заявке термин "нуклеиновая кислота" обозначает одно- и двухнитевую РНК, мРНК и ДНК, включая кДНК и геномную ДНК. Если иное не оговорено, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также охватывает её консервативно модифицированные варианты (например, замены в вырожденном кодоне) и комплементарные последовательности, а также конкретно указанную последовательность. Левый конец последовательностей однонитевого полинуклеотида является 5'-концом, направление последовательностей двухнитевого полинуклеотида влево называется направлением в сторону 5'-конца, если не оговаривается иное.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются как взаимозаменяемые для названия полимера аминокислотных остатков. Эти термины охватывают также термин "антитело". Термин "аминокислота" относится к аминокислотам природного происхождения и к синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые действуют образом, похожим на действие аминокислот природного происхождения. В полипептидах, используемых в данной заявке, в соответствии со стандартным применением и соглашением направление влево является направлением в сторону (N)-конца с аминогруппой и направление вправо является направлением в сторону (C)-конца с карбоксильной группой.

По всему тексту данной заявки термин "синтетическая" нуклеиновая кислота или аминокислота означает последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислоты, которая не обнаружена в природе. Подразумевается, что синтетические последовательности, сконструированные способом по изобретению, включены в данное изобретение в любой форме, например читаемые на бумаге или в компьютере и это могут быть физически полученные нуклеиновые кислоты и полипептиды. Физически полученные нуклеиновые кислоты и полипептиды по изобретению составляют часть настоящего изобретения, независимо от того, получены ли они непосредственно из обозначенной последовательности или из копий таких последовательностей (например, получены методом ПЦР (PCR), репликацией плазмиды, химическим синтезом и т.п.). Термин "синтетическая нуклеиновая кислота" может включать, например, последовательности нуклеиновых кислот, полученные или сконструированные из полностью искусственных аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот с единичными или множественными нуклеотидными заменами по сравнению с последовательностью природного происхождения, созданными путём случайного или направленного мутагенеза, химического синтеза, методами шаффлинга (перестановки) в ДНК, методами вторичной сборки ДНК или любым способом, известным специалисту в данной области. Такие изменения могут быть сделаны без изменения аминокислотной последовательности, закодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, или могут модифицировать аминокислотную последовательность для того, чтобы оставить желательную функцию закодированного белка неизменной или улучшенной.

Используемый в данной заявке термин "вектор" относится к молекулам (например, это могут быть фаг, плазида, вирусные векторы, а также искусственные хромосомы, такие как бактериальные и дрожжевые искусственные хромосомы, используемые для передачи генетического материала в клетку-хозяина). Вектор может состоять или из ДНК, или из РНК. Вектор может быть введён в клетку-хозяина различными методами, хорошо известными из уровня техники. Регуляторная последовательность вектора представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, требующаяся для экспрессии генного продукта-мишени, функционально связанного с ней. Термин "функционально связанный", используемый в данной заявке, означает, что регуляторные нуклеиновая кислота и нуклеиновая кислота, представляющая интерес, связаны таким образом, что экспрессия указанной нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, может регулироваться указанной регуляторной нуклеиновой кислотой, то есть последовательность регуляторной нуклеиновой кислоты будет функционально связана с последовательностью указанной нуклеиновой кислоты для осуществления экспрессии. Соответственно последовательность регуляторной нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна экспрессироваться, могут быть физически соединены друг с другом, например, путём инсерции (встраивания) последовательности регуляторной нуклеиновой кислоты в 5'-конец последовательности нуклеиновой кислоты, которая должна экспрессироваться. Альтернативно, последовательность регуляторной нуклеиновой кислоты и нуклеиновая кислота, которая должна экспрессироваться, могут просто находиться вблизи друг друга, так чтобы последовательность регуляторной нуклеиновой кислоты была способна управлять экс-

прессией по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, которая представляет интерес. Последовательность регуляторной нуклеиновой кислоты и нуклеиновая кислота, которая должна экспрессироваться, предпочтительно разделены не более чем 500 парами оснований (по), 300 по, 100 по, 80 по, 60 по, 40 по, 20 по, 10 по или 5 по.

Используемый в данной заявке термин "лечение" относится к применению или введению шарнирных молекул антитела по изобретению субъекту, у которого наблюдается медицинское состояние, симптом такого состояния, заболевание или вторичное нарушение или предрасположенность к такому состоянию, с целью частичного или полного облегчения, улучшения состояния, отсрочки начала, ингибирования развития, уменьшения степени серьезности и/или уменьшения возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. В общем, термин "лечение" включает не только снятие симптомов или уменьшение уровня маркеров заболевания, но также прекращение или замедление развития или ухудшения проявления симптома, который ожидался в отсутствие лечения. Положительные или желательные клинические результаты включают, но без ограничения, ослабление одного или более симптомов, уменьшение степени серьезности болезни, стабилизацию (то есть отсутствие ухудшения) состояния, отсрочку или замедление развития заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), независимо от того, выявлены или не выявлены эти результаты.

Термин "эффективное количество", используемый в данной заявке, относится к количеству компонента, которое достаточно для получения желательного терапевтического ответа. Терапевтически эффективное количество также означает такое количество, при введении которого терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсичные или вредные эффекты от применения соединения или композиции. Конкретное эффективное или достаточное количество будет меняться в зависимости от таких факторов, как подвергающееся лечению заболевание, физическое состояние пациента (например, вес пациента, возраст или пол), вид млекопитающего или животного, которые подвергаются лечению, продолжительность лечения, природа сопутствующей терапии (если она проводится), и используемые конкретные составы и структура применяемых соединений или их производных. Эффективное количество может быть выражено, например, в г, мг или мкг или как мг/кг веса пациента.

Термин "субъект" относится к млекопитающему, включая человека, который подвергается лечению при помощи шарнирных молекул антитела и/или способов по изобретению. Термин "субъект" относится к мужчинам и женщинам, если пол не оговаривается специально.

Настоящее изобретение относится к антителам с шарнирными областями, которые селективно активируются в клетке-мишени или ткани-мишени. Способы и соединения (например, последовательности нуклеиновых кислот и векторы) для получения таких шарнирных молекул антител, фармацевтические композиции, содержащие антитела с шарнирными областями, а также способы их применения входят в объем данного изобретения.

На чертеже показана схематическая диаграмма, иллюстрирующая общую структуру шарнирной молекулы антитела 100 согласно некоторым вариантам настоящего изобретения, и на фиг. 2 приведена схематическая диаграмма, иллюстрирующая схему дизайна и механизм действия шарнирной молекулы антитела 100. Как показано на фиг. 1, антитело 100 с шарнирной областью содержит функциональное антитело 110, два ингибиторных домена 120 и четыре отщепляемых линкера 130, соединяющие ингибиторные домены 120 с функциональным антителом 110. На фиг. 2 показана вначале нерасщепленная форма, способность к связыванию указанного антитела 100 с шарнирной областью в отношении его лиганда-мишени (L), по существу, ингибирована (инактивирована). Как только антитело 100 с шарнирной областью вводится субъекту и достигает сайта-мишени, фермент (E), который специфически или с высокой степенью экспрессирован в сайте-мишени, будет расщеплять антитело 100 с шарнирной областью в области отщепляемых линкеров 130. Это ферментативное расщепление антитела 100 с шарнирной областью удаляет ингибиторные домены 120 из шарнирной молекулы антитела 100 и приводит к образованию функционального антитела 110 со способностью связываться с лигандом (L). Следовательно, терапевтическое действие функционального антитела 110 может быть восстановлено на участке заболевания.

Возвращаясь к фиг. 1, следует отметить, что функциональное антитело 110 является полноразмерным антителом или включает один или более функциональных фрагментов антитела для лечения заболевания в активированном состоянии. Структура функционального антитела 110 содержит две лёгких цепи 112 и две тяжёлых цепи 114, соединённые друг с другом дисульфидными связями. В частности, две тяжёлых цепи 114 соединены одной или более дисульфидными связями (116) в шарнирной области.

Предпочтительно, когда функциональное антитело 110 представляет собой терапевтическое антитело для лечения одного или более заболеваний у субъекта. Функциональное антитело 110 может быть полноразмерным терапевтическим антителом или его функциональным фрагментом. Неограничивающими примерами функционального антитела 110 являются антитело к фактору некроза опухолей альфа (анти-TNF- α) (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол и голимумаб), антитело к лиганду рецептора активатора NF κ B (анти-RANKL) (например, деносумаб), антитело к антигену 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (анти-CTLA-4) (например, тремелелиумаб и ипилиумаб), антитело к рецепто-

ру человеческого эпидермального фактора роста (анти-HER2) (например, пертузумаб, трастузумаб и трастузумаб эмтанзин), антитело к рецептору эпидермального фактора роста (анти-EGFR) (например, пани-тумумаб, цетуксимаб, залутумумаб и нецитумумаб), антитело к сосудистому эндотелиальному фактору роста (анти-VEGF) (например, бевасизумаб и ранибизумаб), антитело к рецептору 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (анти-VEGFR2) (например, рамуцирумаб), антитело к рецептору интерлейкина 6 (анти-IL6R) (например, регенерон и тоцилизумаб), антитело к интерлейкину 12/23 (анти-IL12/23) (например, устекинумаб и бриакинумаб), антитело к кластеру дифференцировки 3 (анти-CD3) (например, отеликсизумаб, теплизумаб и муромонаб-CD3), антитело к CD11a (например, эфализумаб), антитело к CD20 (например, обинутузумаб, офатумумаб, тоситумумаб-I131, ибритумумаб тиуксетан и ритуксимаб), антитело к CD25 (известно также как анти-IL2R) (например, базиликсимаб и даклизумаб), антитело к CD30 (например, брентуксимаб ведотин), антитело к CD33 (например, гемтузумаб озогамидин) и антитело к CD52 (например, алектумумаб). Следует отметить, что вышеуказанное не является исчерпывающим перечнем терапевтических антител, которые пригодны для применения в качестве функционального антитела 110, описанного в данной заявке, скорее, другие антитела, имеющие структуру, описанную выше, также применимы при осуществлении данного изобретения.

Заболевания или медицинские состояния, которые можно лечить при помощи одного или более указанных выше терапевтических антител, включают, но без ограничения, меланому в прогрессирующей стадии (например, при помощи ипилимумаба), потерю костной массы (например, при помощи деносумаба), рак молочной железы (например, при помощи трастузумаба, трастузумаба эмтанзина, пертузумаба или рамуцирумаба), хронический лимфоцитарный лейкоз (например, при помощи обинутузумаба или офатумумаба), колоректальный рак (например, при помощи пани-тумумаба, цетуксимаба или бавацизумаба), болезнь Крона (например, при помощи инфликсимаба или цертолизумаба пегола), аденокарциному желудочно-пищеводного соединения (например, при помощи рамуцирумаба), рак головы и шеи (например, при помощи залутумумаба), гепатоклеточную карциному (например, при помощи рамуцирумаба), лимфому Ходжкина (например, при помощи брентуксимаба ведотина), макулярную дегенерацию (например, при помощи ранибизумаба), метастатическую меланому (например, при помощи тремелиумаба), миелоидный лейкоз (например, при помощи гемтузумаба озогамидина или алектумумаба), лимфому не-Ходжкина (например, при помощи оситумумаба-I131, ибритумумаба тиуксетана или ритуксимаба), немелкоклеточный рак лёгкого (например, при помощи нецитумумаба), псориаз (например, при помощи эфализумаба), пятнистый псориаз (например, при помощи устекинумаба или бриакинумаба), купирование или предотвращение отторжения трансплантированной почки (например, при помощи муромонаба-cd3, базиликсимаба или даклизумаба), ревматоидный артрит (например, при помощи тосилизумаба, голимумаба или адалимумаба) и сахарный диабет типа 1 (например, при помощи отеликсизумаба или теплизумаба).

Согласно некоторым вариантам функциональное антитело 110 является антителом к TNF- α , включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1 (то есть лёгкую цепь инфликсимаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 58 (то есть тяжёлую цепь инфликсимаба), антителом к EGFR, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2 (то есть лёгкую цепь пани-тумумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 59 (то есть тяжёлую цепь пани-тумумаба), антителом к HER₂, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 3 (то есть лёгкую цепь трастузумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 60 (то есть тяжёлую цепь трастузумаба), антителом к TNF- α , включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 4 (то есть лёгкую цепь адалимумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 61 (то есть тяжёлую цепь адалимумаба), антителом к RANKL, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 5 (то есть лёгкую цепь деносумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 62 (то есть тяжёлую цепь деносумаба), антителом к CTLA-4, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 6 (то есть лёгкую цепь ипилимумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 63 (то есть тяжёлую цепь ипилимумаба), антителом к CTLA-4, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 7 (то есть лёгкую цепь тремелиумаба (иначе называемого тицилимумабом) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. (пропуск) (то есть тяжёлую цепь тремелиумаба), антителом к CD11a, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 8 (то есть лёгкую цепь эфализумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 65 (то есть тяжёлую цепь эфализумаба) или антителом к IL12/23, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID No. 9 (то есть лёгкую цепь устекинумаба) и аминокислотную последовательность SEQ ID No. 66 (то есть тяжёлую цепь устекинумаба).

Как показано на фиг. 1, каждый ингибиторный домен 120 состоит из двух пептидных плечей 122. В этом примере два пептидных плеча 122 соединены друг с другом дисульфидными связями 124; однако настоящее изобретение не ограничено этим. Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения ингибиторный домен 120 является шарнирным доменом иммуноглобулина, такого как иммуноглобулин A (IgA) иммуноглобулин D (IgD) или иммуноглобулин G (IgG), или включает часть этого шарнирного домена. Согласно различным вариантам настоящего изобретения IgA представляет собой IgA1 (SEQ ID

No. 14) или IgA2 (SEQ ID No. 15), IgG представляет собой IgG1 (SEQ ID No. 10), IgG2 (SEQ ID No. 11), IgG3 (SEQ ID No. 12) или IgG4 (SEQ ID No. 13); в то время как IgD представляет собой IgD1 (SEQ ID No. 54) или IgD2 (SEQ ID No. 55).

Шарнирные структуры ингибиторных доменов 120 после присоединения к функциональному анти телу 110 стерически маскируют лиганд-связывающий сайт функционального антитела 110. Тогда шарнирная молекула антитела 100 в нерасщеплённом состоянии проявляет небольшую склонность (если она вообще есть) к взаимодействию с нужным лигандом. В соответствии с рабочими примерами, приведёнными в данном описании, в нерасщеплённом состоянии связывающая способность функционального антитела 110 по отношению к его лиганду снижается по меньшей мере примерно на 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или даже на 100%.

Согласно различным вариантам настоящего изобретения, когда функциональное антитело 110 соединяется с ингибиторным доменом 120 в присутствии нужного лиганда, связывание не происходит или практически нет связывания функционального антитела 110 с его лигандом или происходит не более 0.001, 0.02, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30%-ного связывания функционального антитела 110 с его лигандом по сравнению со связыванием функционального антитела 110, которое не соединено с ингибиторным доменом 120.

Другое преимущество такого ингибиторного домена 120 находится в его разностороннем применении. Можно оценить, что ингибиторный домен 120 не сконструирован на основе его специфического взаимодействия с функциональным антителом 110 и/или нужным лигандом функционального антитела 110 и, следовательно, его ингибирующая активность не зависит от функционального антитела 110. Кроме того, большинство терапевтических антител содержит общие и похожие основные цепи, что облегчает присоединение к ним ингибиторного домена 120.

В дополнение к желательной ингибирующей активности и разнообразному применению ингибиторный домен 120 по изобретению имеет также преимущество в том, что он произведён из шарнирной области иммуноглобулина. Отсюда в отличие от экзогенных маскирующих лигандов, известных из уровня техники, ингибиторный домен 120 по изобретению не будет вызывать нежелательный иммунный ответ у субъекта.

Ингибиторный домен 120 присоединён к функциональному антителу через отщепляемый линкер 130. Конкретно, каждый из четырёх отщепляемых линкеров 130 соединяет один из двух пептидных плечей 122 двух ингибиторных доменов 120 с N-концами одной из двух лёгких цепей 112 и двух тяжёлых цепей 114 функционального антитела 110. Отщепляемый линкер 130 представляет собой пептидный субстрат, расщепляемый ферментом, который специфически или с высокой степенью экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени (такой, как область поражения у субъекта) таким образом, что антитело с шарнирной областью активировано в клетке-мишени или в ткани-мишени.

Как обсуждалось выше, присоединение ингибиторных доменов 120 к функциональному антителу 110 приводит к ингибированию связывания функционального антитела 110 с его нужным лигандом. Однако, как только фермент переварит отщепляемый линкер 130, ингибиторные домены 120 отсоединяются от антитела 110 с шарнирной областью, при этом происходит восстановление связывающей способности функционального антитела 110.

Согласно некоторым вариантам пептидный субстрат расщепляется одним из следующих ферментов: матриксной металлопротеиназой (например, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13 и MMP-14), катепсином (например, CTS A, CTS B, CTS D, CTS E и CTS K), каспазой (например, CASP-1, CASP-2, CASP-3, CASP-4, CASP-5, CASP-6, CASP-7, CASP-7, CASP-9, CASP-10, CASP-11, CASP-12, CASP-13 и CASP-14) или дисинтегрином и металлопротеиназой (например, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-17, ADAM-TS и ADAM-TS5).

Матриксные металлопротеиназы (MMPs) представляют собой семейство цинк-зависимых эндопептидаз, который расщепляют матриксные белки. MMPs включают коллагеназы, желатиназы, матрилизины, энамелизины, металлоэластазы, стромелизины и другие структурные белки и рецепторные лизины. MMPs участвуют в разрушении внеклеточной матрицы в обычных физиологических процессах, таких как развитие и репродукция эмбрионов, а также в развитии заболеваний, таких как артрит и метастазы.

Например, обе MMP-2 (известной также как желатиназа А или коллагеназа 72 кДа типа IV) и MMP-9 (известная также как желатиназа В или коллагеназа 92 кДа типа IV) играют роль в возникновении воспалительного ответа. Соответственно эти белки экспрессируются с более высокой степенью в воспалительном сайте, чем в других клетках/тканях субъекта. Кроме того, повышенная экспрессия MMP-2 или MMP-9 также позитивно связана с развитием опухолей, включая инвазию, метастазы, рост и ангиогенез. Следовательно, пептидный субстрат для этих белков пригоден для применения в качестве отщепляемого линкера 130 таким образом, что антитело 100 с шарнирной областью активируется в воспалительном сайте или на участке, поражённом раком. Кроме того, так как уровень экспрессии MMP-2/MMP-9 в клетках/тканях, отличных от области поражения, является сравнительно низким, активация антитела 100 с шарнирной областью в этих клетках/тканях происходит редко по сравнению с активацией в области поражения. Соответственно, антитело 100 с шарнирной областью по изобретению функционирует при лечении заболевания с повышенной селективностью сайта действия.

Согласно некоторым вариантам каждый отщепляемый линкер 130 включает аминокислотную последовательность Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg (GPLGVR; SEQ ID No. 16), которая является пептидным субстратом для MMP-2 или MMP-9. Неограничивающие примеры пептидных субстратов для MMP-2/MMP-9 включают: Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg (PLGMWSR; SEQ ID No. 51), Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-(d)-Arg (PLGLWA-(d)-R; SEQ ID No. 52) и Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-(d)-Arg (PQGIAGQ-(d)-R; SEQ ID No. 53).

Под "активируемым" антителом подразумевают, что антитело 100 с шарнирной областью проявляет первую связывающую способность по отношению к лиганду, представляющему интерес, будучи в нерасщеплённом или неактивированном состоянии, и вторую связывающую способность по отношению к тому же лиганду, будучи в расщеплённом или активированном состоянии, при этом величина второй связывающей способности выше, чем величина первой связывающей способности. Например, связывающая способность активированного функционального антитела 110 по отношению к его лиганду может быть по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или даже 1000 раз выше, чем связывающая способность нерасщеплённого антитела 100 с шарнирной областью по отношению к тому же лиганду.

Поскольку отщепляемый линкер 130 выбирается на основании его специфичности к ферменту, который с высокой степенью экспрессирован в сайте-мишени, следует иметь в виду, что активация антитела 100 с шарнирной областью по большей части будет иметь место в сайте-мишени. Эта высокая селективность сайта действия в сочетании с выдающейся ингибирующей активностью в нерасщеплённом состоянии позволяет практически избежать побочного действия функционального антитела 110.

Настоящее изобретение имеет также преимущество в том, что отсоединившийся ингибиторный домен 120 не участвует в связывании между активированным функциональным антителом 110 и намеченным лигандом функционального антитела 110. Соответственно, связывающая способность функционального антитела 110 практически восстанавливается, как только антитело 100 с шарнирной областью активируется при отщеплении отщепляемого линкера 130. Например, после того как антитело 100 с шарнирной областью проконтактирует с ферментом (например, MMP-2), который с высокой степенью экспрессирован в сайте-мишени в конкретное время, возникает по меньшей мере 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%-ное связывание активированного функционального антитела 110 с выбранным лигандом функционального антитела 110, что можно сравнить со связыванием функционального антитела 110, не соединённого с ингибиторным доменом 120.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения функциональное антитело 110 является антителом к TNF- α и включает аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1, каждый из отщепляемых линкеров 130 включает аминокислотную последовательность SEQ ID No. 14; и каждый из ингибиторных доменов 120 включает аминокислотную последовательность SEQ ID No. 8.

Антитело с шарнирной областью по изобретению может быть получено синтетическим способом или может быть рекомбинантно экспрессировано и очищено.

Например, антитело с шарнирной областью может быть синтезировано обычными способами, такими как с применением t-BOC или FMOC защиты альфа-аминогрупп. Оба способа включают постадийный синтез, при этом одна аминокислота добавляется на каждой стадии, начиная от С-конца пептида. Антитела с шарнирной областью по изобретению могут быть также синтезированы хорошо известными методами твёрдофазного синтеза пептидов.

Для рекомбинантного получения антитела с шарнирной областью нужны векторные конструкции или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела с шарнирной областью по изобретению. Различные векторные конструкции, которые способны к экспрессии в прокариотных или эукариотных клетках, известны из уровня техники. Конструкции экспрессионных векторов обычно выбираются таким образом, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, в которой они должны быть использованы. Согласно некоторым вариантам вектор кодирует лёгкую и тяжёлую цепь функционального антитела, ингибиторный домен и отщепляемые линкеры.

На фиг. 3 показана диаграмма молекулы нуклеиновой кислоты 200 согласно некоторым вариантам настоящего изобретения. В подходящих условиях молекула нуклеиновой кислоты 200 может быть транскрипирована, и экспрессированный (ые) полинуклеотид (ы) затем модифицируется (ются) и/или собирается в антитело с шарнирной областью, например в антитело 100 с шарнирной областью, показанное выше. Фиг. 3 представляет схематическую диаграмму, иллюстрирующую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело с шарнирной областью в соответствии с некоторыми вариантами настоящего изобретения; например антитело 100 с шарнирной областью, показанное выше.

Согласно некоторым вариантам молекула 200 синтетических нуклеиновых кислот включает последовательность первой нуклеиновой кислоты 210, последовательность второй нуклеиновой кислоты 220 и соединяющую последовательность нуклеиновой кислоты 230. Последовательность первой нуклеиновой кислоты 210 содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу область 212, кодирующую первый ингибиторный домен, область 214, кодирующую первый отщепляемый линкер, и область 216, кодирующую лёгкую цепь. Область 212, кодирующая первый ингибиторный домен, кодирует первое пептидное плечо (такое как одно пептидное плечо 122, показанное на фиг. 1) ингибиторного домена (такого как ингиби-

торный домен 120 на фиг. 1) антитела с шарнирной областью по изобретению. Согласно некоторым вариантам ингибиторный домен может быть шарнирным доменом IgA, IgD или IgG, или фрагментом шарнирного домена. Область 214, кодирующая первый отщепляемый линкер, кодирует пептидный субстрат (например, отщепляемый линкер 130 на фиг. 1), расщепляемый ферментом, который специфически или с высокой степенью экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени. Область 216, кодирующая лёгкую цепь, кодирует лёгкую цепь (например, лёгкую цепь 102 на фиг. 1) функционального антитела, способного в активированном состоянии применяться для лечения. Последовательность 220 второй нуклеиновой кислоты включает в направлении от 5'-конца к 3'-концу область 222, кодирующую второй ингибиторный домен, область 224, кодирующую второй отщепляемый линкер, и область 226, кодирующую тяжёлую цепь. Область 222, кодирующая второй ингибиторный домен, кодирует второе пептидное плечо (такое как другое пептидное плечо 122 на фиг. 1) ингибиторного домена (например, ингибиторного домена 120 на фиг. 1). Область 224, кодирующая второй отщепляемый линкер, кодирует тот же пептидный субстрат (например, отщепляемый линкер 130 на фиг. 1). Область 226, кодирующая тяжёлую цепь, кодирует тяжёлую цепь (такую как тяжёлая цепь 104) функционального антитела.

Соединяющая последовательность нуклеиновой кислоты 230 используется для соединения последовательности первой нуклеиновой кислоты 210 и последовательности второй нуклеиновой кислоты 220 с образованием одной молекулы нуклеиновой кислоты 200.

Согласно необязательным вариантам последовательность первой нуклеиновой кислоты 210 и последовательность второй нуклеиновой кислоты 220 соединены в одной открытой рамке считывания, и транслированный продукт после секреции модифицирован для получения собранного антитела с шарнирной областью. Например, как показано на фиг. 3, последовательность 230, кодирующая фурин-2, находится между первой и второй нуклеиновыми кислотами 210 и 220. Альтернативно, последовательность IRES (не показана) может быть использована для соединения последовательности первой нуклеиновой кислоты 210 и последовательности второй нуклеиновой кислоты 220 таким образом, что эти две последовательности нуклеиновых кислот в отдельности транслированы с образованием двух полипептидов.

Согласно некоторым вариантам настоящего изобретения молекула синтетической нуклеиновой кислоты 200 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую любое из упомянутых выше антител с шарнирной областью и их эквиваленты. Например, молекула синтетической нуклеиновой кислоты может включать нуклеотидную последовательность любой из последовательностей SEQ ID Nos. 17-50. Согласно другим вариантам данного изобретения последовательности первой и второй нуклеиновой кислот встраиваются в два разных вектора, в которых последовательность первой нуклеиновой кислоты представляет собой любую из SEQ ID Nos. 67, 69, 71, 73, 75 и 77, в то время как последовательность второй нуклеиновой кислоты является любой из SEQ ID Nos. 68, 70, 72, 74, 76 и 78.

SEQ ID No. 56 также является примером последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей шарнирные домены IgD1, содержащие последовательность SEQ ID No. 54; в то время как SEQ ID No. 57 является примером последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей шарнирные домены IgD2, содержащие последовательность SEQ ID No. 55.

Векторы для экспрессии указанной выше молекулы нуклеиновой кислоты 200 обычно конструируются путём соединения молекул синтетической нуклеиновой кислоты 200 с одной или более регуляторными последовательностями таким образом, чтобы транскрипция и/или трансляция молекулы синтетической нуклеиновой кислоты 200 находились под контролем регуляторной (ых) последовательности (ей). Неограничивающие примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры, терминаторы, операторы, репрессоры и индукторы.

Конструкции экспрессионных векторов обычно обеспечивают также область инициации транскрипции и трансляции, когда это может быть необходимо или желательно, которая может быть индуцируемой или конститутивной, при этом кодирующая область функционально присоединена под контролем области инициации транскрипции и области терминации транскрипции и трансляции. Эти контролируемые области могут быть нативными для видов, из которых получена нуклеиновая кислота, или могут быть получены из экзогенных источников. Конструкции экспрессионных векторов могут также включать селективируемый маркер, действующий в хозяине для облегчения, например, роста клеток-хозяев, содержащих конструкцию, представляющую интерес. Гены селективируемого маркера могут обеспечить фенотипический признак для селекции трансформированных клеток-хозяев, такой как резистентность к ди-гидрофолат-редуктазе или неомицину для культуры эукариотных клеток.

Когда последовательность первой нуклеиновой кислоты 210 и последовательность второй нуклеиновой кислоты 220 конструируются в одной рамке считывания, экспрессионный вектор может включать одну регуляторную последовательность, функционально соединённую с последовательностью первой нуклеиновой кислоты и последовательностью второй нуклеиновой кислоты. С другой стороны, когда последовательность первой нуклеиновой кислоты 210 и последовательность второй нуклеиновой кислоты 220 расположены в различных рамках считывания, экспрессионный вектор может включать по меньшей мере две регуляторных последовательности, функционально соединённых с последовательностью первой нуклеиновой кислоты и последовательностью второй нуклеиновой кислоты соответственно.

Согласно другим вариантам первая нуклеиновая кислота и вторая нуклеиновая кислота не конст-

руируются в одном векторе; скорее, они получаются в двух разных векторах, каждый из которых включает свою собственную область инициации транскрипции и трансляции, селективируемый маркер и/или регуляторную последовательность.

Антитело с шарнирной областью согласно данному изобретению пригодно для лечения заболевания (ий) или медицинского состояния (ий), которое (ые) излечимо (ы) при применении функциональной шарнирной молекулы антитела. Заболевания или медицинские состояния, излечимые при помощи терапии на основе антител, в основном представляют собой рак или аутоиммунные заболевания.

Для лечения субъекта, страдающего от таких заболеваний, антитело с шарнирной областью по изобретению или фармацевтическая композиция, его содержащая, вводится субъекту в терапевтически эффективном количестве. Соответственно фармацевтическая композиция и способ лечения также входят в объем настоящего изобретения.

В дополнение к антителу с шарнирной областью указанная фармацевтическая композиция содержит также фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в данной заявке, означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал, применяемые для доставки или транспортировки активных агентов (например, антитела с шарнирной областью) из одного органа или части органа в другой орган или часть этого органа. Носитель должен быть "приемлемым" в смысле его совместимости с другими ингредиентами композиции и выбранным для сведения к минимуму любого разложения активного агента и для минимизации любых вредных побочных эффектов для субъекта. Фармацевтическая композиция может также содержать одну или более фармацевтически приемлемых добавок, включая связующие, вкусовые вещества, буферные агенты, загустители, красители, антиоксиданты, разбавители, стабилизаторы, буферные агенты, эмульгаторы, диспергирующие агенты, суспендирующие агенты, антисептики и т. п.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя, который должен применяться в сочетании с пептидным антителом с шарнирной областью в основном определяется способом введения этой композиции. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может вводиться путём подкожной, внутривенной, внутритекальной или внутримышечной инъекции.

Препараты для инъекций могут быть приготовлены в виде стерильных водных или неводных растворов, суспензий и эмульсий. Примеры неводных растворителей включают, но без ограничения, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Примеры водных носителей включают воду, спиртоводные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и буферный раствор. Распространённые парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингер-лактата или нелетучие масла; в то время как носители для внутривенного введения часто включают жидкости и наполнители питательных веществ, наполнители электролитов (такие как наполнители на основе раствора Рингера) и т. п.

Поскольку антитело с шарнирной областью по изобретению расщепляется и активируется на участке поражения и остаётся нерасщеплённым и неактивным в других областях организма, способ лечения по изобретению имеет преимущество в том, что он уменьшает или даже устраняет риск появления системного побочного эффекта из-за нецелевого действия. Кроме того, способ лечения по изобретению повышает эффективность известных терапевтических антител.

Следующие ниже примеры приведены для разъяснения некоторых аспектов настоящего изобретения и для того, чтобы помочь специалистам в данной области в осуществлении данного изобретения. Эти примеры никоим образом не следует рассматривать как ограничивающие объём данного изобретения. Считается, что специалист в данной области на основе данного описания без дальнейших исследований сможет применять настоящее изобретение полностью. Все публикации, указанные в данной заявке, включены полностью в данную заявку путём отсылки.

Пример 1. Материалы и способы.

1.1. Клеточные линии и клеточные культуры.

Линия клеток первичной почки человека, экспрессирующих антиген SV40 T (293T), клеточная линия рака молочной железы человека (SKBr3), клеточная линия колоректальной карциномы человека (SW480), Huh 7 были приобретены в American Type Culture Collection. Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Sigma-Aldrich) дополненной 10% телячьей сыворотки (CCS; Sigma-Aldrich), 1% (10000 мкг/мл) пенициллина и 1% (10,000 мкг/мл) стрептомицина (Invitrogen), при 37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO₂. Амфитрофические ретровирусные упаковывающие клетки Phoenix (Source) культивировали в среде DMEM/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F12), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Sigma-Aldrich), 1% (10,000 мкг/мл) пенициллина и 1% (10,000 мкг/мл) стрептомицина при 37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для переноса клетки 293T и клетки Phoenix обрабатывали раствором 1X Versene (EDTA) в течение 3-5 мин, в то время как клетки SKBr3, SW480 и Huh7 обрабатывали трипсином в течение 3-5 мин. Затем клетки субкультивировали при различных концентрациях, как это требовалось для целей эксперимента.

1.2. Биохимические реагенты.

Реагент для трансфекции TransIT®-LT1 был приобретён в Mirus Bio LLC. Среду Opti-MEM и EDTA приобретали в Invitrogen. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) и MMP2 типа IV (желатиназа А) приобретали в Sigma-Aldrich. Конъюгат HRP- Fcy козы против IgG человека и конъюгат FITC с антителом козы против IgGAM человека приобретали в компании Jackson.

1.3. Плазмидные конструкции.

Для создания конструкции нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к TNF- α , инфликсимаб, была использована конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид фурин-2А для соединения последовательности, кодирующей лёгкую цепь, и последовательности, кодирующей тяжёлую цепь, в одной плазмиде. Затем проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для введения NheI, HindIII и SfiI в N-конец лёгкой цепи, XhoI - в С-конец лёгкой цепи, BglIII - в N-конец тяжёлой цепи и ClaI и AscI - в С-конец тяжёлой цепи. Затем последовательности, кодирующие IgG1 с шарнирной областью и субстрат MMP2, вводили против хода транскрипции в последовательности, кодирующие лёгкую и тяжёлую цепи для получения конструкции нуклеиновой кислоты (SEQ ID No. 43), кодирующей шарнирную область IgG1/ MMP2/инфликсимаб. Тот же протокол использовали для создания конструкций нуклеиновых кислот, кодирующих другие антитела или антитела с шарнирной областью/MMP2, таких как конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 17), шарнирная область IgG2/MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 18), шарнирная область IgG3/MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 19), шарнирная область IgG4/ MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 20), шарнирная область IgA1/MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 21), шарнирная область IgA2/MMP2/ипилилумаб (SEQ ID No. 22), шарнирная область IgG1/MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 23), шарнирная область IgG2/ MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 24), шарнирная область IgG3/MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 25), шарнирная область IgG4/MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 26), шарнирная область IgA1/MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 27), шарнирная область IgA2/ MMP2/тремелилумаб (SEQ ID No. 28), шарнирная область IgG1/MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 29), шарнирная область IgG2/MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 30), шарнирная область IgG3/MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 31), шарнирная область IgG4/ MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 32), шарнирная область IgA1/MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 33), шарнирная область IgA2/MMP2/адалилумаб (SEQ ID No. 34), шарнирная область IgG1/MMP2/панитумаб (SEQ ID No. 35), шарнирная область IgG1/MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 36), шарнирная область IgG2/MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 37), шарнирная область IgG3/MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 38), шарнирная область IgG4/ MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 39), шарнирная область IgA1/MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 40), шарнирная область IgA2/MMP2/деносуаба (SEQ ID No. 41), шарнирная область IgG1/MMP2/эфализумаб (SEQ ID No. 42), шарнирная область IgG2/MMP2/инфликсимаб (SEQ ID No. 44), шарнирная область IgG3/MMP2/инфликсимаб (SEQ ID No. 45), шарнирная область IgG4/MMP2/инфликсимаб (SEQ ID No. 46), шарнирная область IgA1/MMP2/инфликсимаб (SEQ ID No. 47), шарнирная область IgA2/MMP2/инфликсимаб (SEQ ID No. 48), шарнирная область IgG1/MMP2/устекинумаб (SEQ ID No. 49) и шарнирная область IgG1/MMP2/трастузумаб (SEQ ID No. 50).

Конструкции, кодирующие инфликсимаб и шарнирную область/MMP2/инфликсимаб, были введены в плазмиды pLKO AS3w.puro, содержащие расширенный сигнал упаковки вируса (Ψ^+), пурамицин-резистентный ген (PuroR) и ампициллин-резистентный ген (AmpR), для получения экспрессионных векторов (плазида инфликсимаб-pLKO и плазида шарнирная область/MMP2/инфликсимаб-pLKO). Плазмиды для экспрессии других конструкторов нуклеиновых кислот были получены по тому же протоколу.

1.4. Трансфекция лентивируса.

Клетки Phoenix были обработаны Versene, и диссоциированные клетки (1.5×10^6 кл/лунку) засевали в 6-луночный планшет CellBind. После инкубации в инкубаторе при 37°C в течение 24 ч исходная жидкость клеточной культуры была удалена и восполнена половинным объёмом среды DMEM, дополненной 10% FBS.

1.25 мкг плазмиды антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб-pLKO (в 125 мкл среды Opti-MEM плюс 1.125 мкг плазмиды pCMV- Δ R8.91 и 0.125 мкг плазмиды pMD.G) медленно добавляли в реакционный раствор, содержащий 7.5 мкл реагента TransIT® в 125 мкл среды Opti-MEM. Смесь оставляли стоять в течение 30 мин, затем медленно добавляли в 6-луночный планшет и встряхивали в инкубаторе при 37°C в течение 16 ч перед добавлением половины объёма свежей среды (DMEM/F12 + 10% FBS + 1% BSA + $1 \times \text{p/s}$). В следующие 3 дня каждые 24 ч собирали 2 мл супернатанта и добавляли 2 мл свежей среды. Собранный супернатант центрифугировали со скоростью 1250 об/мин в течение 5 мин и хранили при 4°C в холодильнике.

Для конденсации вируса охлаждённый супернатант нагревали при комнатной температуре, отфильтровывали на центрифужном фильтре для белков и затем центрифугировали со скоростью 3500 об/мин при 4°C до уменьшения объёма до 1.5 мл. Получали аликвоты конденсата и хранили их при -80°C до использования.

Для трансфекции клеток 293Т клетки 293Т засевали в 6-луночный планшет при плотности 4×10^5 кл/лунку. На следующий день клетки трансфецировали до 10-20% конфлюентности. Первоначальная

среда была вначале удалена и среда для инфекционного процесса (1 мл среды для роста (DMEM + 10% CCS + 1% P/S) + 150 мкл вирусной жидкости + 8 мкг/мл полибреана) добавлялась в лунки. После встряхивания в течение 24 ч среду удаляли, добавляли новую среду для роста и трансфицированные клетки 293Т обрабатывали пурамицином (3-5 мкг/мл). Среду для роста обновляли каждые 2 дня со скринингом с пурамицином в течение 2 нед. Затем клетки собирали и проводили вестерн-блоттинг для определения стабильной экспрессии клетками конструкции шарнирная область/MMP2/инфликсимаб. Клетки 293Т, стабильно экспрессирующие инфликсимаб, получали по тому же протоколу.

7.5. Очистка антител.

Трансфицированные клетки 293Т засеивали в планшет (15 см) и культивировали в среде DMEM, дополненной 10% CCS и 1% пенициллина-стрептомицина, до достижения примерно 80-90% конфлюентности. Исходную среду удаляли и промывали планшет 10 мл PBS для удаления сыворотки. Затем клетки культивировали в 15 мл среды, не содержащей сыворотки, в течение 2 дней, супернатант собирали и центрифугировали при скорости 3500 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Супернатант затем собирали и хранили до использования при температуре -80°C.

Для осуществления очистки 135 мл замороженного супернатанта нагревали, используя водяную баню с температурой 37°C. Затем супернатант конденсировали, применяя центрифужный фильтр для белков. Антитела очищали с применением системы очистки белок А-сефароза и связанные антитела элюировали при помощи 0.1 М элюирующего буферного раствора, содержащего глицин (pH 3.0). Величину pH элюата регулировали при помощи 1 М Трис-основания (pH 8.0) и 6 N HCL до величины 7.4. Затем собирали образцы с помощью диализной мембраны (трубчатая мембрана из регенерированной целлюлозы T4, MWCO: 12000-14000, CelluSep) и дважды проводили диализ, используя 1X PBS (pH 7.4) в течение 1-2 ч. Получение продукта подтверждали методом разделения электрофорезом на полиакриламидном геле с 10% SDS с последующим окрашиванием красителем Comassie Brilliant Blue в течение 10 мин.

1.6. Расщепление субстрата MMP2.

Конструкцию антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб (5 мкг в 36 мкл PBS) подвергали взаимодействию с MMP2 (0.8 мкг в 4 мкл среды DMEM, конечная концентрация равна 20 мкг/мл) на льду в течение 0, 1, 5, 10, 30 или 60 мин. Антитело к TNF- α (инфликсимаб) использовали в качестве контроля. Затем реакционную смесь добавляли в восстанавливаемый краситель и кипятили при температуре 100°C в течение 10 мин для прекращения активности MMP2. Расщепление субстрата MMP2 подтверждали электрофорезом на полиакриламидном геле с 10% SDS и методом вестерн-блоттинга.

Для проведения вестерн-блоттинга восстановленный краситель добавляли к собранным клеткам и супернатанту в отношении 6:1 (об./об.) и кипятили при температуре 100°C в течение 10 мин. Затем белки разделяли методом электрофореза на полиакриламидном геле с 10% SDS и помещали на бумагу из нитроцеллюлозы, которую обрабатывали снятым латексом (5%) при 4°C в течение ночи. Антитело HRP-Fc γ козы против IgG человека (конъюгат антитела козы против Fc γ IgG человека, меченого пероксидазой хрена) (0.4 мкг/мл в 5% снятого латекса) было использовано для идентификации антитела.

7.7. Твёрдофазный иммуоферментный анализ (ИФА).

Активность конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело определяли методом ELISA с выявлением антигенов или методом клеточного ИФА (ELISA).

(А) Нанесение покрытия на планшеты.

Для определения активности конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб или антитело с шарнирной областью/MMP2/адалимумаб TNF- α (0.3 мкг/мл) растворяли в покрывающем буфере (буфере для сенсibilизации покрытий) (100 mM Na₂CO₃, pH 8.0) и наносили эту смесь для покрытия на планшеты при проведении ELISA (Nunc-Maxisorp) путём инкубации при 37°C в течение 2 ч. Что касается конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/деносумаб, применяли 96-луночный планшет, покрытый 50 мкл/лунку RANKL (0.3 мкг/мл) в среде покрывающего буфера (100 mM Na₂CO₃, pH 8.0) в течение 2 ч при 37°C. Для определения активности конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/ипилилумаб или антитело с шарнирной областью/MMP2/тримелилумаб использовали 96-луночный планшет, покрытый 50 мкл/лунку CTLA4 (0.3 мкг/мл) в среде покрывающего буфера (100 mM Na₂CO₃, pH 8.0) в течение 2 ч при 37°C.

Для иммобилизации в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 200 мкл 5% снятого латекса и хранили его в холодильнике при 4°C в течение ночи.

Активность конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело к EGFR и антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело к HER2 была определена методом ELISA. Вкратце можно сказать, что EGFR-положительные клетки SW480 или HER2-положительные клетки SKBr3 высевали в 96-луночный планшет с плотностью 10 кл/лунку с использованием 200 мкл среды для роста (DMEM + 10% CCS + 1% P/S) и проводили инкубацию при 37°C в течение ночи.

(В) Обработка MMP2.

20 мкл ледяного фермента MMP2 (200 мкг/мл в среде DMEM, не содержащей сыворотки) разводили в 10 раз и осуществляли взаимодействие с 180 мкл супернатанта трансфицированных клеток 293Т на льду в течение 0, 1, 10, 30, 60 или 90 мин до обрыва реакции путём добавления 20 мкл CCS.

(C) Активность антител.

На следующий день после удаления исходной культуральной жидкости из сенсibilизированного 96-луночного планшета планшеты промывали один раз 0.05% PBST (200 мкл/лунку) и PBS (200 мкл/лунку) один раз или промывали средой DMEM (200 мкл/лунку) один раз в случае проведения метода клеточного ИФА (ELISA), и жидкость в лунках удаляли. Затем обработанную MMP2 конструкцию антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело (50 мкл/лунку) добавляли в двух повторностях или в трёх повторностях в случае метода клеточного ИФА (ELISA) и проводили реакцию в течение 2 ч при комнатной температуре. После окончания реакции образцы отбирали пипеткой из лунки и затем промывали планшеты 0.05% PBST (200 мкл/лунку) три раза и PBS (200 мкл/лунку) один раз или промывали средой DMEM (200 мкл/лунку) три раза в случае метода клеточного ИФА (ELISA) для удаления свободных антител. Затем 1 мкг/мл антитела HRP-Fc γ козы против IgG человека в 2% снятого латекса в PBS или в DMEM + 2% CCS в случае метода клеточного ИФА (ELISA) распределяли в 96-луночном планшете с плотностью 50 мкл/лунку и проводили реакцию в течение 1 ч при комнатной температуре. После отбора пипеткой антитела HRP-Fc γ козы против IgG человека из лунки планшеты промывали 0.05% PBST (или промывали в случае метода клеточного ИФА (ELISA) средой DMEM (200 мкл/лунку) трижды и PBS (200 мкл/лунку) один раз.

Активность обработанной MMP2 конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело была определена путём окисления 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) в качестве субстрата. Реакционную смесь, содержащую ABTS и 30% H₂O₂ (ABTS: H₂O₂=3000 : 1), добавляли в планшеты по 150 мкл/лунку. Окисление ABTS сопровождалось увеличением абсорбции при длине волны 405 нм. Активность фермента оценивали по интенсивности абсорбции. Активность других антител была определена по тому же самому протоколу.

1.8. Нейтрализация сигнала TNF- α при помощи конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб.

Клетки Huh 7 обрабатывали трипсином (0.05%) и диссоциированные клетки (7×10^4 кл/лунку) высевали в 24-луночный планшет CellBind. После инкубации в инкубаторе при 37°C в течение 24 ч исходную культуральную жидкость удаляли и добавляли среду DMEM, дополненную 10% культуральной жидкости FBS.

0.5 мкг репортёрной плазмиды NF- κ B-Luc добавляли в реакционный раствор, содержащий 1.5 мкл реагента трансфекции TransIT®-LT1 в 30 мкл среды DMEM, не содержащей сыворотки. Смесь медленно добавляли в 24-луночный планшет и встряхивали в инкубаторе при 37°C в течение 24 ч.

Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали одним из следующих реагентов: (1) средой (отрицательный контроль); (2) 20 нг TNF- α (положительный контроль); (3) 20 нг TNF- α и 100 мг/мл инфликсимаба; (4) 20 нг TNF- α , 100 мг/мл инфликсимаба и 20 мг/мл MMP2; (5) 20 нг TNF- α и 100 мг/мл конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/инфликсимаб и (6) 20 нг TNF- α , 100 мг/мл конструкции IgG1 с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб и 20 мг/мл MMP2. Через 24 ч после обработки Steady-Glo и PBS добавляли в 96-луночный планшет и использовали планшет-ридер для определения активности люциферазы.

1.9. Эксперименты с животными.

Все животные, использованные в рабочих примерах, содержались в виварии при температуре 24-25°C с циклом чередования света и темноты 12:12. Стандартный лабораторный корм и водопроводная вода были доступны ad libitum. Методика экспериментов была одобрена в Kaohsiung Medical University Review Board (Kaohsiung City, Taiwan, R.O.C.), все эксперименты проводили в соответствии с национальными правовыми актами по содержанию животных.

Пример 2. Очистка конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб.

Трёхмерная структура конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб была создана при помощи компьютерного моделирования. На фиг. 4 видно, что шарнирный домен IgG1 состоит из двух пептидов, связанных дисульфидными связями, и область, определяющая комплементарность (CDR) лёгкой цепи и тяжёлой цепи инфликсимаба, заблокирована ингибиторным доменом, произведённым из шарнирного домена IgG1.

Очистку проводили, как описано в примере 1.5 выше, и строение полученных продуктов подтверждали методом SDS PAGE (фиг. 5). Было установлено, что очищенный продукт представляет собой тяжёлую цепь конструкции антитело с шарнирной областью IgG1/MMP2/инфликсимаб с м.м. 55 кДа (слева), размер которой похож на размер инфликсимаба (в середине). Степень чистоты продуктов по данным Lane 4 была равна примерно 85%.

Пример 3. Удаление ингибиторного домена из конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб путём обработки MMP2.

Конструкцию антитело с шарнирной областью IgG1/MMP2/инфликсимаб или инфликсимаб (антитело к TNF- α) обрабатывали MMP2 (20 мкг/мл), как описано в примере 1.6. Результаты вестерн-блоттинга показали (см. фиг. 6), что молекулярная масса инфликсимаба (примерно 53.5 кДа) была постоянной до и после обработки при помощи MMP2. С другой стороны, перед обработкой при помощи

MMP2 молекулярная масса конструкции антитело с шарнирной областью IgG1/MMP2/инфликсимаб была равна примерно 55 кДа, в то время как после обработки при помощи MMP2 интенсивность полосы продукта с м.м. 55 кДа постепенно уменьшалась, в то время как интенсивность полосы продукта с м.м. примерно 53.5 кДа возрастала со временем. Этот результат показывает, что ингибиторный домен данного антитела с шарнирной областью может быть удалён из функционального антитела путём обработки MMP2.

Пример 4. Ингибирование и восстановление антиген-связывающей активности конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело к TNF- α .

Антиген-связывающая активность очищенной конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/инфликсимаб до и после обработки MMP2 (пример 1.6) была определена методом ELISA, результаты показаны на фиг. 7. По данным этого метода анализа связывающая способность антитела к TNF- α была принята за 100% и соответственно определяли этот параметр в процентах для указанной конструкции.

Результаты ELISA показывают, что связывающая способность конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб к TNF- α составляла примерно 0.5% перед обработкой при помощи MMP2, подтверждая, что присоединение ингибиторного домена практически ингибирует связывающую способность функционального домена антитела к TNF- α на 99.5%. Полученные данные показывают также, что обработка MMP2 в течение 1 ч достаточна для активации конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб, связывающая способность которой восстановилась до примерно 110%. Через 2 ч после обработки MMP2 связывающая способность активированной конструкции антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб поднялась до примерно 120% по сравнению с инфликсимабом.

Пример 5. Нейтрализация сигнала TNF- α конструкцией антитело с шарнирной областью/MMP2/инфликсимаб.

Пример 1.8 проводили для определения, способна ли конструкция шарнирная область IgG1/MMP2/инфликсимаб всё ещё нейтрализовать сигнал TNF- α после обработки MMP2. Результаты, приведённые на фиг. 8, показали, что обычный инфликсимаб, обработанный (группа 4) или не обработанный (группа 3) MMP2, может эффективно блокировать сигнал TNF- α по сравнению с положительным контролем (группа 2). В противоположность этому конструкция шарнирная область IgG1/MMP2/инфликсимаб без обработки MMP2 (группа 5) практически не способна нейтрализовать сигнал TNF- α , в то время как обработанная MMP2 конструкция шарнирная область IgG1/MMP2/инфликсимаб (группа 6) эффективно уменьшает сигнал TNF- α . Эти результаты демонстрируют, что ингибиторный домен согласно данному изобретению эффективно блокирует связывающую способность домена функционального антитела с лигандом функционального антитела. Более того, этот эксперимент также выявил, что функциональность функционального антитела с шарнирной областью по изобретению может быть восстановлена путём обработки MMP2.

Пример 6. Ингибирование и восстановление антиген-связывающей активности различных конструкций антитело с шарнирной областью/MMP2/антитела.

Антиген-связывающая способность различных конструкций антитело с шарнирной областью/MMP2/антитело к HER2 до и после обработки MMP2 показана на фиг. 9, 10 и в таблице.

Антитело (INN)	Шарнирная область	Ингибирование (%)
Анти-TNF- α (инфликсимаб)	IgG1	99.5
	IgG2	94
	IgG3	99
	IgG4	68.5
	IgA1	97.5
	IgA2	76.5
Анти-EGFR (панитумумаб)	IgG1	89

Анти-HER2 (трастузумаб)	IgG1	73
Анти-TNF- α (адалимумаб)	IgG1	90
	IgG2	90
	IgG3	90
	IgG4	90
	IgA1	90
	IgA2	90
Анти-RANK-L (деносумаб)	IgG1	98
	IgG2	98
	IgG3	98
	IgG4	98
	IgA1	98
	IgA2	98
Анти-CTLA-4 (ипилимумаб)	IgG1	95
Анти-CTLA-4 (тремелимумаб)	IgG1	87
Анти-IL 1 β (канакинумаб)	IgG1	97

INN - международное непатентованное наименование.

При рассмотрении фиг. 9 и таблицы видно, что перед обработкой MMP2 антиген-связывающая активность инактивированной конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/трастузумаб оставляет примерно 27%, свидетельствуя о том, что примерно 73% связывающей способности домена функционального антитела к HER2 ингибируются присоединённым ингибиторным доменом. Примерно через 1.5 ч после обработки MMP2 конструкция шарнирная область IgG1/MMP2/трастузумаб активируется и связывающая способность восстанавливается до примерно 97%.

Антиген-связывающая активность инактивированной конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/панитумумаб пред обработкой MMP2 составляет примерно 11%, свидетельствуя о том, что примерно 89% связывающей способности домена функционального антитела к EGFR ингибируются присоединённым ингибиторным доменом. Существенная активация конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/панитумумаб достигается через примерно 2 ч после обработки MMP2, это доказывается величиной антиген-связывающей способности, составляющей примерно 90%.

В сумме различные конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/антитела характеризуются примерно 73-99.5% ингибированием связывания антител с шарнирной областью с их соответствующими лигандами, а сродство к связыванию может быть восстановлено до примерно 100% после обработки MMP2.

Для понимания влияния ингибиторного домена на ингибирующий эффект домена с шарнирной областью домены с шарнирной областью из различных иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) были прикреплены к функциональным антителам, как описано выше. Все из этих шарнирных доменов способны существенно ингибировать связывание антитела с шарнирной областью с его выбранным лигандом, когда антитело с шарнирной областью является неактивированным. В частности, антиген-связывающая способность шарнирная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2/MMP2/антитело к TNF- α перед обработкой MMP2 составляет 0.5, 6, 1, 31.5, 2.5 и 23.5% соответственно (фиг. 10). После активации при помощи MMP2 антиген-связывающая способность этих активированных антител восстанавливается до 100% (фиг. 10).

Эти результаты показывают, что ингибиторный домен по изобретению может блокировать от примерно 73 до 99.5% сродства к связыванию домена функционального антитела, и связывающая способность антитела с шарнирной областью может быть восстановлена до примерно 90-100% путём обработки MMP2, что позволяет предположить, что схема дизайна антитела с шарнирной областью по изобретению может быть применена к любым клинически доступным антителам.

Пример 7. Локализация и активация конструкции антитело с шарнирной областью-антитело к α EGFR в животной модели.

Панитумумаб (антитело к α EGFR) был использован при лечении EGFR-экспрессирующего колоректального рака. В этом примере была приготовлена конструкция антитело с шарнирной обла-

стью/MMP2/панитумумаб (далее, антитело с шарнирной областью к α EGFR), затем исследовали *in vivo* локализацию и активацию, используя мышей с раком ободочной кишки.

Антитело к α EGFR (панитумумаб) и антитело с шарнирной областью к α EGFR были получены в соответствии с протоколами, описанными в примере 1 выше. Затем антитело к α EGFR и антитело с шарнирной областью к α EGFR сопрягали с коммерчески доступным цианиновым красителем, IR820 (приобретён в Sigma 543365).

Бестимусным мышам со средним весом 20 г трансплантировали клетки рака ободочной кишки человека HCT116 ($EGFR^+/MMP^+$). Мышам с опухолевыми клетками HCT116 ($EGFR^+/MMP^+$) рака ободочной кишки внутривенно вводили 5 мг/кг антитела IR820 к α EGFR или антитела с шарнирной областью к α EGFR с PBS или ингибитором MMP (5 мг/кг 1.10-фенантролина моногидрата, приобретённого в Sigma). Получали оптическое изображение через 48 ч после инъекции путём визуализации мышей при помощи системы получения изображений IVIS Spectrum/CT (Caliper Life Sciences, PE) при длинах волн возбуждения и эмиссии 710 и 820 нм соответственно. В процессе получения изображения мышей выдерживали под анестезией газом (5% изофурана) при 37°C. Полученные изображения приведены на фиг. 11.

Оптическое изображение обеспечивает количественную меру трёхмерного распределения флуоресцентного сигнала у живого субъекта. Теоретически антитело с шарнирной областью к α EGFR, как только оно достигает места расположения опухоли, активируется под действием протеазы MMP2 и затем активированное функциональное антитело может связываться с EGFR-положительными клетками опухоли.

Как видно на фиг. 11, активированное антитело с шарнирной областью к α EGFR (третье изображение слева), подобно антителу к α EGFR (первое изображение слева), селективно локализовано на участке опухоли. Кроме того, судя по цвету на изображениях, уровень накопления антитела с шарнирной областью к α EGFR на участке опухоли был эквивалентен уровню накопления анти- α EGFR на участке опухоли.

Более того, при сравнении двух наборов изображений, соответственно обработанных анти- α EGFR и антителом с шарнирной областью к α EGFR на фиг. 11, следует отметить, что в присутствии ингибитора MMP меньшее количество антитела с шарнирной областью к α EGFR активировалось и связывалось с EGFR-положительными клетками опухоли. Эти данные показали, что активация антитела с шарнирной областью к α EGFR ингибировалась ингибитором MMP. Этот результат подтвердил, что активация антитела с шарнирной областью/MMP2 согласно вариантам данного изобретения осуществляется путём действия расщепляющего фермента (такого как MMP2).

Пример 8. Противовоспалительное действие антитела с шарнирной областью к $TNF\alpha$ в животной модели.

Антитело к $TNF\alpha$, такое как адалимумаб, было использовано для лечения некоторых состояний, когда желательно подавление иммунного ответа. В этом примере была изучена эффективность конструкции шарнирная область IgG1/MMP2/адалимумаб (далее, "шарнирное антитело к $TNF\alpha$ ") для лечения артрита, индуцированного коллагеном, (CIA). CIA представляет хроническую аутоиммунную модель человеческого ревматоидного артрита и широко применяется для препарирования молекулярных и клеточных медиаторов ревматоидного артрита.

Антитело к $TNF\alpha$ (адалимумаб) и шарнирное антитело к $TNF\alpha$ были получены в соответствии с протоколами, описанными в примере 1 выше.

Животная модель артрита, индуцированного коллагеном, была создана следующим образом. Самцов мышей линии DBA/1 (возраст 8-10 нед.) иммунизировали при помощи внутрикожной инъекции в основание хвоста 100 мкг бычьего коллагена типа II (Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA), который был эмульгирован с равными объёмами полного адьюванта Фрейнда (Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA). Процедуру повторяли через три недели после первой иммунизации. Мышей осматривали каждые 2-3 дня и каждую мышь с признаками эритемы и/или распухания одной или более конечностей включали в исследуемую группу. При проявлении артрита мышам делали и.п. инъекцию PBS, анти- $TNF\alpha$ или антитела с шарнирной областью к $TNF\alpha$ (100 мкг/мышь). Воспаление 4 лап классифицировали по шкале от 0 до 4 следующим образом: 0 = распухания нет и есть очаговая краснота; 1 = распухание суставов пальцев; 2 = небольшое распухание локтевых суставов или кистевых суставов; 3 = сильное воспаление всей лапы и 4 = деформация или анкилоз. Оценивали каждую лапу и суммировали 4 балла, максимально возможное количество баллов у одной мыши составило 16. Результаты представлены на фиг. 12.

Данные, показанные на фиг. 12, показали, что баллы, оценивающие воспаление у мышей, которым вводили антитело к $TNF\alpha$ (адалимумаб) и антитело с шарнирной областью к $TNF\alpha$, были значительно ниже, чем у мышей, которым вводили PBS. Более того, баллы, оценивающие воспаление у мышей, которым вводили шарнирное тело к $TNF\alpha$ по изобретению, были ниже, чем баллы у мышей, обработанных коммерчески доступным антителом к $TNF\alpha$. Следовательно, эти данные доказали, что шарнирное тело к $TNF\alpha$ по изобретению можно применять для лечения ревматоидного артрита.

Следует заметить, что, хотя антитела с шарнирной областью согласно описанным выше вариантам

и примерам произведены из моноклональных антител, настоящее изобретение этим не ограничивается. Скорее схема дизайна согласно данному изобретению применима для других терапевтических агентов на основе антител. Например, ингибиторный домен, предложенный в данной заявке, может быть присоединён к N-концу биспецифического антитела (например, катумаксумаба) способом, похожим на описанные выше. Другие терапевтики на основе антител, подходящие для применения по данному изобретению, включают, но без ограничения, биспецифическое антитело, триспецифические антитела Fab₃, двухвалентные минитела, триатела, тетратела, scFv фрагменты, Fab фрагменты и бис-scFv фрагменты.

Следует иметь в виду, что приведённое выше описание вариантов дано только как пример и что специалисты в данной области могут сделать различные модификации. Приведённые выше описание, примеры и данные обеспечивают полное описание структуры и применения вариантов настоящего изобретения. Хотя различные варианты изобретения были описаны с некоторой степенью конкретности или со ссылкой на один или несколько отдельных вариантов, средний специалист в данной области может сделать многочисленные изменения описанных вариантов не выходя за рамки или объём настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело с шарнирной областью, способное селективно активироваться в клетке-мишени или в ткани-мишени для лечения заболевания, включающее

функциональное антитело, в активированном состоянии способное к лечению заболевания, содержащее две лёгких цепи и две тяжёлых цепи;

два ингибиторных домена, в котором каждый ингибиторный домен представляет собой шарнирный домен иммуноглобулина A (IgA), иммуноглобулина D (IgD) или иммуноглобулина G (IgG) или фрагмент шарнирного домена, причём каждый ингибиторный домен состоит из двух пептидных плечей, соединённых друг с другом дисульфидными связями; и четырёх расщепляемых линкеров, причём каждый расщепляемый линкер содержит пептидный субстрат, расщепляемый ферментом, который специфически или с высокой степенью экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени и который по отдельности соединяет одно из двух пептидных плечей каждого ингибиторного домена с каждым N-концом одной из двух лёгких цепей и двух тяжёлых цепей функционального антитела.

2. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором функциональное антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к TNF- α , антитела к RANKL, антитела к CTLA-4, антитела к HER2, антитела к EGFR, антитела к VEGF, антитела к VEGFR2, антитела к IL6R, антитела к IL12/23, антитела к CD3, антитела к CD11a, антитела к CD20, антитела к CD25, антитела к CD30, антитела к CD33 и антитела к CD52.

3. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором функциональное антитело содержит одно из следующего:

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 58;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 2, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 59;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 3, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 60;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 4, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 61;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 5, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 62;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 6, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 63;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 7, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 64;

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 8, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 65; или

лёгкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 9, и тяжёлую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No. 66.

4. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором шарнирный домен представляет собой шарнирный домен IgA и IgA представляет собой IgA1 или IgA2.

5. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором шарнирный домен представляет собой шарнирный домен IgG и IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

6. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором каждый из ингибиторных доменов содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 54 или 55.

7. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором пептидный субстрат расщепляется любым из следующих ферментов: матриксной металлопротеиназой (MMP), катепсином (CTS), каспазой (CASP)

или дисинтегрином и металлопротеиназой (ADAM).

8. Антитело с шарнирной областью по п.7, в котором фермент представляет собой MMP-2 или MMP-9 и каждый расщепляемый линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 16.

9. Антитело с шарнирной областью по п.1, в котором

функциональное антитело представляет собой антитело к TNF- α , причём его лёгкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1 и его тяжёлая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 58;

каждый из расщепляемых линкеров содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 16;

каждый из ингибиторных доменов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 10.

10. Экспрессионная система для продуцирования антитела с шарнирной областью по п.1, включающая

последовательность первой нуклеиновой кислоты, включающую в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

область, кодирующую первый ингибиторный домен, которая кодирует первое пептидное плечо ингибиторного домена антитела с шарнирной областью, в котором ингибиторный домен представляет собой шарнирный домен иммуноглобулина A (IgA), иммуноглобулина D (IgD) или иммуноглобулина G (IgG) или фрагмент шарнирного домена,

область, кодирующую первый расщепляемый линкер, которая кодирует расщепляемый линкер антитела с шарнирной областью, причём расщепляемый линкер представляет собой пептидный субстрат, расщепляемый ферментом, который специфически или с высокой степенью экспрессирован в клетке-мишени или в ткани-мишени, и

область, кодирующую лёгкую цепь, которая кодирует лёгкую цепь функционального антитела с шарнирной областью, причём функциональное антитело в активированном состоянии способно лечить заболевание; и

последовательность второй нуклеиновой кислоты, включающую в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

область, кодирующую второй ингибиторный домен, которая кодирует второе пептидное плечо ингибиторного домена антитела с шарнирной областью,

область, кодирующую второй расщепляемый линкер, которая кодирует второй расщепляемый линкер антитела с шарнирной областью, и

область, кодирующую тяжёлую цепь, которая кодирует тяжёлую цепь функционального антитела с шарнирной областью;

причем первое и второе пептидное плечо соединены друг с другом дисульфидными связями в антителе с шарнирной областью.

11. Экспрессионная система по п.10, включающая также соединяющую последовательность нуклеиновой кислоты, которая соединяет последовательность первой нуклеиновой кислоты и последовательность второй нуклеиновой кислоты, причём соединяющая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность, кодирующую фурин-2A, или последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

12. Экспрессионная система по п.11, включающая также регуляторную последовательность, функционально соединённую с последовательностью первой нуклеиновой кислоты и с последовательностью второй нуклеиновой кислоты для осуществления экспрессии последовательности первой нуклеиновой кислоты, последовательности второй нуклеиновой кислоты и соединяющей последовательности нуклеиновой кислоты.

13. Экспрессионная система по п.10, включающая также

первую регуляторную последовательность, функционально соединённую с последовательностью первой нуклеиновой кислоты для осуществления экспрессии последовательности первой нуклеиновой кислоты; и

вторую регуляторную последовательность, функционально соединённую с последовательностью второй нуклеиновой кислоты для осуществления экспрессии последовательности второй нуклеиновой кислоты.

14. Экспрессионная система по п.13, в которой

последовательность первой нуклеиновой кислоты и первая регуляторная последовательность встроены в первый экспрессионный вектор и

последовательность второй нуклеиновой кислоты и вторая регуляторная последовательность встроены во второй экспрессионный вектор.

15. Экспрессионная система по п.13, в которой последовательность первой нуклеиновой кислоты, первая регуляторная последовательность, последовательность второй нуклеиновой кислоты и вторая регуляторная последовательность встроены в один экспрессионный вектор.

16. Экспрессионная система по п.10, в которой функциональное антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к TNF- α , антитела к RANKL, антитела к CTLA-4, антитела к HER2, антитела к

EGFR, антитела к VEGF, антитела к VEGFR2, антитела к IL6R, антитела к IL12/23, антитела к CD3, антитела к CD11a, антитела к CD20, антитела к CD25, антитела к CD30, антитела к CD33 и антитела к CD52.

17. Экспрессионная система по п.10, в которой шарнирный домен представляет собой шарнирный домен IgA и IgA представляет собой IgA1 или IgA2.

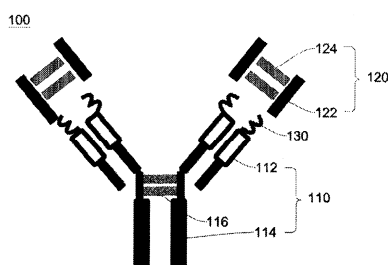
18. Экспрессионная система по п.10, в которой шарнирный домен представляет собой шарнирный домен IgG и IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

19. Экспрессионная система по п.10, в которой пептидный субстрат расщепляется любым из следующих ферментов: матриксной металлопротеиназой (MMP), катепсином (CTS), каспазой (CASP) или дисинтегрином и металлопротеиназой (ADAM).

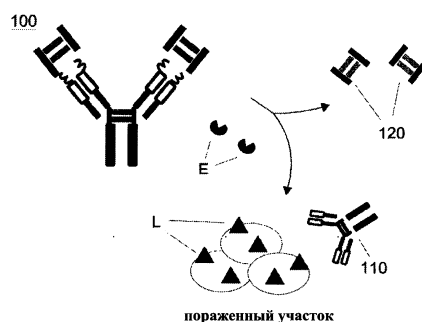
20. Экспрессионная система по п.10, которая содержит молекулу синтетической нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из SEQ ID Nos. 17-50.

21. Способ лечения рака или аутоиммунного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела с шарнирной областью по любому из пп.1-9.

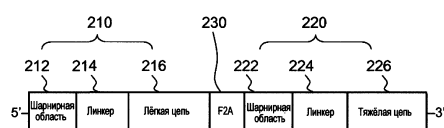
22. Способ по п.21, в котором антитело с шарнирной областью вводят подкожно, перорально, внутривенно, внутритекально или внутримышечно.



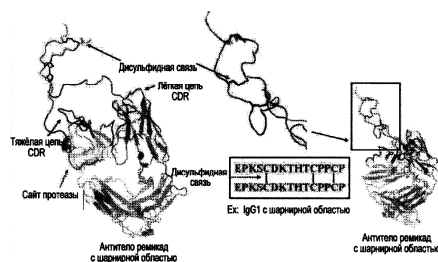
Фиг. 1



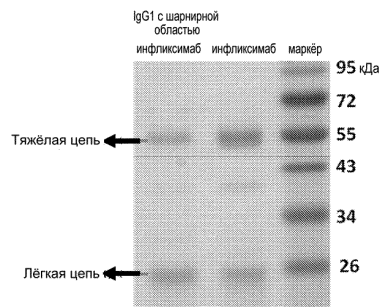
Фиг. 2



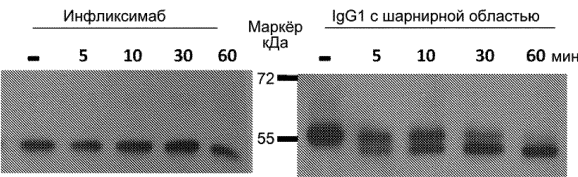
Фиг. 3



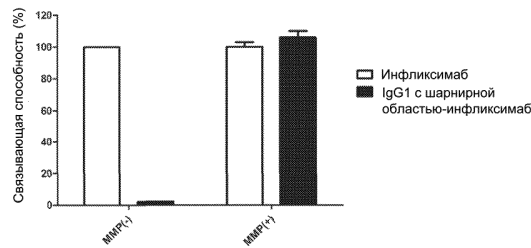
Фиг. 4



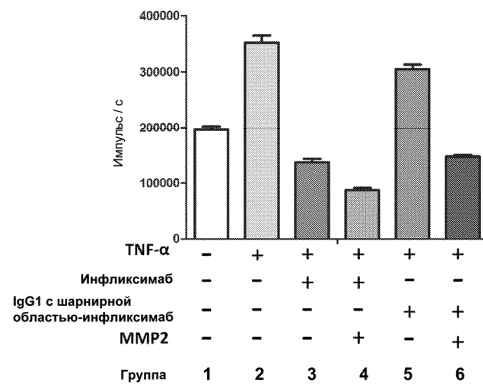
Фиг. 5



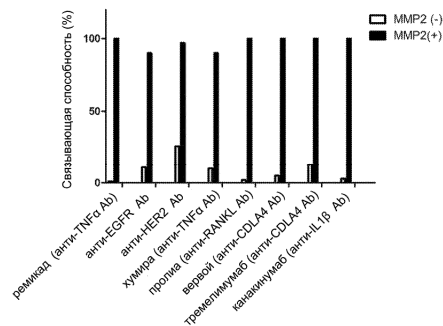
Фиг. 6



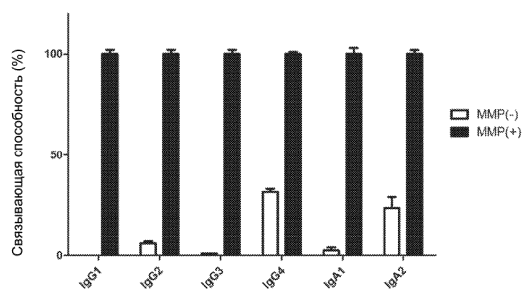
Фиг. 7



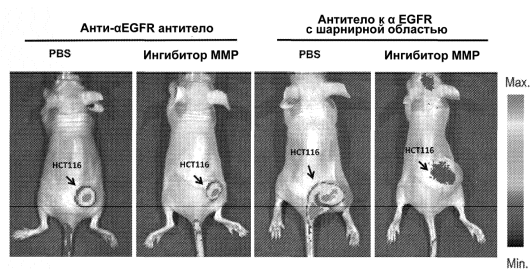
Фиг. 8



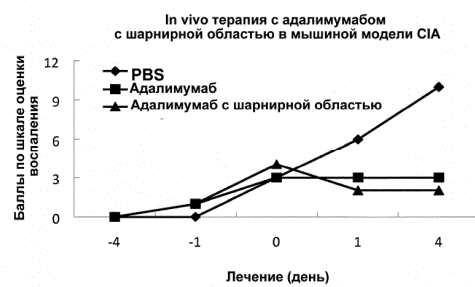
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

