

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201890907 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.30

(22) Дата подачи заявки
2010.11.29

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) МУТИРОВАННЫЕ Fc АНТИТЕЛА С УСТРАНЕННЫМИ ЭФФЕКТОРНЫМИ
ФУНКЦИЯМИ

(31) 61/265,079

(32) 2009.11.30

(33) US

(62) 201290413; 2010.11.29

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Строл Уилльям, Вафа Омид (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Антитело и другие Fc-содержащие молекулы с изменениями во фрагменте Fc сокращают связывание с гамма-рецепторами Fc; итоги этой активности можно использовать для лечения различных заболеваний и расстройств.

```

218                                     267
hIgG2 KCC---VECPFCFAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
hIgG4 KYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
hIgG1 KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
* * * * *

268                                     317
hIgG2 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTIVHVDWLNKG
hIgG4 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTIVHVDWLNKG
hIgG1 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTIVHVDWLNKG
*****

318                                     367
hIgG2 EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTLC
hIgG4 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTLC
hIgG1 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTLC
*****

368                                     417
hIgG2 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRW
hIgG4 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRW
hIgG1 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRW
*****

418                                     447
hIgG2 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
hIgG4 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
hIgG1 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
* * * * *

```

A1

201890907

201890907

A1

МУТИРОВАННЫЕ Fc АНТИТЕЛ С УСТРАНЕННЫМИ ЭФФЕКТОРНЫМИ ФУНКЦИЯМИ**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ****Область применения изобретения**

Данное изобретение относится к константным областям человеческих антител IgG2 (кристаллизующимся фрагментам иммуноглобулина или Fc), мутированным таким образом, что они в существенной степени теряют способность специфически связываться с рецепторами Fcγ или активировать митогенный ответ иммунных клеток путем образования поперечных межмолекулярных связей поверхностных антигенов-мишеней, опосредованного рецепторами Fc. Изобретение также относится к новым антителам, в которые могут быть включены мутированные константные области IgG2.

Описание области применения

Антитела, взаимодействующие с антигенами на поверхности клеток, активируют нежелательные иммуностимулирующие и эффекторные функции, связанные с взаимодействием рецептора Fc (FcR) с клетками иммунной системы и активацией комплемента. Так как требуются терапевтические антитела и связывающиеся с Fc конструкции, способные взаимодействовать и активировать или нейтрализовать функции лигандов-мишеней, но не повреждать или уничтожать клетки или ткани, велся поиск мутированных Fc без эффекторных функций.

Изотипы IgG человека (подклассы зрелых антител гамма-глобулина класса G; IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) обладают дифференциальной способностью проявлять иммунные функции, такие как антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC, например: IgG1 и IgG3), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP, например: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и комплементозависимую цитотоксичность (CDC, например: IgG1, IgG3). Взаимодействие таких иммунных функций с конкретными изотипами основывается на селективности к Fc рецепторам различных клеток иммунной системы и способности связывать C1q и

активировать формирование мембраноатакующего комплекса (МАС). Среди различных изотипов относительное сродство к рецепторам Fc γ (например: Fc γ RI, Fc γ RIIa/b/c, Fc γ RIIIa/b) высока у IgG1 и IgG3, при этом, IgG2 отличается минимальным сродством (ограниченной полиморфизмом Fc γ RIIa 131H), а у IgG4 сродство измеримо только для Fc γ RI. При помощи сравнительного анализа последовательностей и структур сокристаллов ключевые контактные остатки для связывания рецепторов были сопоставлены с остатками аминокислот, охватывающими нижний шарнир и область CH2. При помощи стандартных методов белковой инженерии были достигнуты определенные успехи в повышении и снижении тропности сыворотки антител для рецепторов Fc, а также был выявлен компонент комплемента C1q.

Среди изотипов IgG2 наименее способен связываться с набором рецепторов Fc. После того, как IgG2 бы выбран в качестве отправной точки, были предприняты усилия, чтобы найти мутаген с уменьшением эффекторных функций, но неизменными связью с FcRn, длительной стабильностью и низкой иммуногенностью. Такого рода улучшенные мутанты могут обеспечить улучшение терапии антител при сохранении стандартного уровня безопасности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к соединениям модифицированных, гликозилированных константных областей иммуноглобулина, применимым в подготовке терапевтических решений на основе антител и схожих с ними как, например, содержащих фрагменты Fc и направленных на лиганды поверхности клеток. Предметом данного изобретения является мутант IgG2 Fc с сокращенной способностью связывания с Fc γ R при сохраненной способности связывания с FcRn. Мутанты IgG Fc позволяют терапевтически воздействовать на растворимые антигены или антигены поверхности клеток при минимизации связанной с Fc активации иммунной эффекторной функции и вызванной комплементом цитотоксичности. В одном из вариантов реализации мутант IgG2 Fc состоит из V234A, G237A, P238S по системе нумерации EU. В другом варианте реализации мутант IgG2 Fc состоит из V234A,

G237A, H268Q или H268A, V309L, A330S, P331S по системе нумерации EU. В отдельном варианте реализации мутант IgG2 Fc состоит из V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330, P331S и, возможно, P233S по системе нумерации EU.

В одном из вариантов соединения мутанта IgG2 Fc используются при показаниях, когда сохранение периода полувыведения терапевтического антитела (или Fc-синтеза) обеспечивается посредством взаимодействия с FcRn, а потенциальная токсичность, вызванная активацией FcγRs, связанных с иммунной и эффекторной функциями, как например, i) антителозависимая цитотоксичность (ADCC), ii) комплементозависимая цитотоксичность (CDC), iii) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), iv) опосредованная FcR активация клеток (например, выброс цитокинов посредством опосредованного FcR образования поперечных межмолекулярных связей) и v) опосредованная FcR активация или истощение тромбоцитов, сводится к минимуму или устраняется. В одном из вариантов мутации IgG2 Fc включены в терапевтические антитела или Fc-слияния связующих веществ, как например, поливалентных связующих веществ, нацеленных на лиганды клеток, задействованных в неврологических расстройствах, таких как ганглий базальных клеток; нарушениях иммунной системы, например, связанных с активацией В-клеток или Т-клеток или с клетками, задействованными в восстановлении или заживлении тканей, таких как фибробласты или стволовые клетки.

В другом варианте мутант IgG2 Fc включает фармацевтический состав. В другом варианте мутант IgG2 Fc включает часть фармацевтически активной молекулы. Фармацевтические составы, содержащие мутант IgG2 Fc или активные содержащие мутант IgG2 Fc молекулы, могут быть применимы при лечении заболеваний, охарактеризованных миграцией и концентрацией макрофагов и моноцитов. В одном варианте реализации содержащие мутант IgG2 Fc молекулы применимы для связывания мишени с неврологическими, эндокринными, сосудистыми, синовиальными, кожными тканями, тканями сердца или слизистой оболочкой. Одним из многих примеров использования мутантов IgG2 Fc изобретения является их

использование в борьбе с реакцией «трансплантат-против-хозяина»; реакция «трансплантат-против-хозяина»; отторжение трансплантата органа; отторжение трансплантата костного мозга; аутоиммунные заболевания, такие как васкулит, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунная тромбоцитопения и артрит; аллоиммунные заболевания, такие как аллоиммунная тромбоцитопения плода или новорожденного; астма и аллергии; хронические или острые воспалительные заболевания, такие как болезнь Крона или склеродермия; болезнь Альцгеймера, окклюзия коронарной артерии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фигуре 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей дикого типа IgG2 человека (SEQ ID NO: 1) IgG4 (SEQ ID NO: 2) и IgG1 (SEQ ID NO: 3) с указанием соответствующей EU нумерации для каждого остатка; шарнир IgG2 начинается с остатка EU 218.

На фигуре 2 показана структура фрагмента Fc с указанием положения на поверхности модифицированных остатков (нумерация EU).

На фигурах 3A-C представлены графики, показывающие конкуренцию между каждым из изоформ и мутантов в виде связывающего анти-Her2/neu антитела с антителом изоформ дикого типа IgG1 человека с применением платформы для анализа цепочек гранул AlphaScreen: FcgRI (не показано), FcgRIIa (A), FcgRIIb (B), FcgRIIIa (не показано) и FcRn (C).

На фигурах 4A-C представлены графики, показывающие прямое связывание каждого изоформ и мутанта в виде связывающего анти-Her2/neu антитела с применением анализа цепочек гранул AlphaScreen: FcgRIIIa (A), FcgRI (B) и FcgRIIa (C).

На фигуре 5 показаны результаты анализа ADCC и отдельные изоформы и мутанты в виде связывающего анти-Her2/neu антитела с использованием человеческих МНПК (избыток 25X) и клеток рака молочной железы SK-Br3 в качестве мишеней.

На фигуре 6 показаны результаты анализа CDC отобранных анти-CD20 конструкторов с использованием клеток комплементов человека и лимфомы WIL2-S в качестве мишеней.

На фигуре 7 показаны результаты анализа ADCP из анализа

проточной цитометрии выбранных анти-Her2/neu конструкторов с использованием клеток-мишеней Sk-Br3 и дифференцированных макрофагов GM-CSF.

На фигуре 8 представлен график, показывающий выброс цитокинов (TNF) через 24 часа после стимуляции МНПК гранулами, связанными с изотипами IgG для различных конструкторов, включая IgG2 дикого типа и шесть мутантов.

На фигуре 9 представлен график среднего количества циркулирующих В-клеток по времени в группах яванских макаков, которым вводили связывающий конструктор антитела домена анти-CD20 с различными фрагментами Fc или без фрагмента Fc (Fab')₂.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:	Описание	Особенности
1	IgG2 - Fc; Ig гамма-класса человека, подкласс 2, шарнир, домены CH2 и CH3	остаток 1 соответствует EU 218, остатки 13-17 могут являться PVAGP (wt), PAAAP, PAAAS и SAAAS; остаток 47 может являться H (wt), Q или A; остаток 109-110 может являться AP (wt) или SS.
2	IgG4 - Fc; Ig гамма-класса человека, подкласс 4, шарнир, домены CH2 и CH3	остаток 1 соответствует EU 218
3	IgG1 - Fc; Ig гамма-класса человека, подкласс, шарнир, домены CH2 и CH3	остаток 1 соответствует EU 218
4	PAAAP	константная область мутированного IgG, остатки 233, 234, 235, 237 и 238

5	PAAAS	константная область мутированного IgG, остатки 233, 234, 235, 237 и 238
6	SAAAS	константная область мутированного IgG, остатки 233, 234, 235, 237 и 238

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сокращения

ADCC = антителозависимая клеточная цитотоксичность;

ADCP = антителозависимый клеточный фагоцитоз;

CDC = комплементозависимая цитотоксичность;

IgG = иммуноглобулин G;

ITAM = мотив активации тирозина иммунорецептора;

ITIM = мотив ингибирования тирозина иммунорецептора;

Mab = Моноклональные антитела;

FDCC = зависимый от Fc выброс цитокинов;

FcγR, FcγR или FcγgammaR = рецепторы гамма Fc

Определения и объяснение терминологии

«Антителозависимая клеточная цитотоксичность» или ADCC относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые Ig, привязанные к рецепторам Fc (FcRs), проявляются на некоторых цитотоксических клетках (например, натуральных клетках-киллерах, нейтрофилах и макрофагах), что позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам точно связываться с несущими антиген клетками-мишенями, а затем убивать их цитотоксинами. Высокотропные антитела IgG конкретных лигандов, направленные на поверхность клеток-мишеней, стимулируют цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для уничтожения клеток-мишеней. Лизис клеток-мишеней происходит внеклеточно, требует прямого контакта клетки с клеткой и не требует комплемента.

Способность того или иного антитела вызывать лизис клеток-мишеней посредством ADCC можно проанализировать. Для оценки

работы ADCC анализируемые антитела добавляются к клеткам-мишеням, располагающим лигандом-мишенью в сочетании с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы антителом антигена с последующим цитолизом клетки-мишени. Цитотоксичность, как правило, определяется по выбросу из лизированных клеток метки (например, радиоактивного субстрата, флуоресцентных красителей или натуральных внутриклеточных белков). Для этих тестов подходят такие эффекторные клетки, как, например, мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) и натуральные клетки-киллеры (NK). Конкретные примеры анализов ADCC *in vitro* описаны в Wisecarver et al, 1985, 19:211; Bruggemann et al, 1987, J Exp Med 166:1351; Wilkinson et al, 2001, J Immunol Methods 258:183; Patel et al, 1995 J Immunol Methods 184:29 (каждая из этих публикаций включена в настоящий документ посредством ссылки). Кроме того и в дополнение, работу ADCC необходимого антитела можно оценивать *in vivo*, например, на животных моделях, как описано в публикации Clynes et al, 1998, PNAS USA 95:652, содержание которой в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки.

«Направленная на комплемент цитотоксичность» или CDC описывает тип цитотоксичности, при которой каскад комплемента активируется при связывании компонента комплемента C1q с Fc антитела.

Употребляемые здесь термины «Fc», «Fc-содержащий белок» или «Fc-содержащая молекула» относятся к мономерным, димерным или гетеродимерным белкам с, по крайней мере, одним CH2 и CH3 доменом иммуноглобулина. Домены CH2 и CH3 могут образовывать, по крайней мере, часть димерного фрагмента белка или молекулы (например, антитела).

Употребляемый здесь термин «моноклональное антитело» представляет собой специфическую форму Fc-содержащего белка, включающего, по крайней мере, один лиганд-связывающий домен, в существенной степени гомологичный по отношению, по крайней мере, к одному из переменных доменов антитела тяжелой или легкой цепи, по крайней мере, одного вида животного антитела.

«Fc-фрагмент IgG2 дикого типа человека» относится к Fc-фрагменту IgG человека, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее элемент, относящийся к остаткам тяжелой цепи IgG человека от K218 до K447 по нумерации EU Кабата. Аминокислоты в константной области нумеруются путем сопоставления с антителом IgG1 человека, EU IgG1 (SEQ ID NO: 3) (см. Cunningham et al., 1970 J. Biol. Chem., 9: 3161-70). То есть тяжелые и легкие цепи антитела сопоставляют с тяжелыми и легкими цепями EU для максимизации идентичности последовательностей аминокислот, а каждой аминокислоте в антителе присваивают тот же номер, что и соответствующей аминокислоте в EU. Система нумерации EU традиционно используется в данной области (см. в целом: Kabat et al, Sequences of Protein of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services (1991)). Согласно этой конвенции описанная константная область «IgG2 дикого типа» лишен аминокислоты в 236-й позиции (фиг. 1, SEQ ID NO: 1).

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

Данное изобретение было вызвано интересом к определению домена Fc для использования в производстве терапевтических антител, гибридных Fc и подобных биофармацевтических препаратов повышенной безопасности с точки зрения невозможности вызвать выброс цитокинов, повредить или уничтожить клетки с лигандами-мишенями и ткани вокруг клеток-мишеней.

Антитела изотипа IgG4 человека и белки гибридных Fc не вызывают значительную ADCC (у NK, экспрессирующих только FcγRIIIa), но сохраняют способность вызывать фагоцитоз (ADCP) макрофагами (экспрессирующими FcγRI, IIa и IIIa) и, возможно, активировать моноциты при нахождении в иммунном комплексе и связанном с распределением активирующих FcγRs на конкретных клетках иммунной системы. Усилия по минимизации остаточной активности привели к разработке и использованию мутантов, включающих V234A, L235A (ala/ala) в Fc IgG4 дикого типа (SEQ ID NO: 2).

Армор и соавторы вызывали мутации в нескольких точках

IgG2, чтобы свести к минимуму связывание с FcγRI (Armour et al, 1999) и FcγRIIa и IIIa (Armour et al, 2003). Дополнительные мутации, описанные в патентной заявке Мюллера и соавторов (PCTW097/11971), выводятся из гибридов IgG2/IgG4, состоящих из доменов CH2 IgG2 и CH3 IgG4, в частности, остатки 330 и 331 взяты из IgG4 IgG2 мутантов данного изобретения. Для сокращения иммуностимулирующего воздействия в техниках отключения и заглушения также использовались IgG2, IgG4 или обмен доменами между этими двумя подклассами для получения моноклональных антител с минимальной эффекторной функцией в IgG1 (SEQ ID NO: 3). (Tao et al, 1991). В патентной заявке Стрولا (US2007/0148167) отписываются четыре мутации в IgG2 на позициях остатков EU 268, 309, 330 и 331. Шилдс и соавторы (2001) описывают еще одну замену: H268A.

Данное изобретение впервые демонстрирует замену константных областей IgG2 (Fc) в нескольких позициях с остатками IgG4 H268Q или A, V309L, A330 и P331S по системе нумерации Кабат/EU. Целенаправленный выбор замены нескольких остатков неожиданно предоставил функциональный домен Fc для использования в создании антител, который также можно использовать в качестве гибридного полипептида, а также возможность обеспечения терапевтического средства без измеримой эффекторной функции.

Мутанты IgG2 с несколькими заменами были отобраны на основе их относительной тропности с FcRs человека (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcRn), которая оценивалась посредством конкурентного анализа Alpha Screen и анализа SPR/Biacore. Эти мутанты прошли дополнительное тестирование и были размещены в соответствующих клеточных системах по способности вызывать CDC, ADCC и ADCP, а также вызывать секрецию TNF-α МНПК. В указанном в настоящем документе наборе экспериментальных данных приведены сравнения мутантов IgG2 с известными препаратами или мутантами, включая: IgG1 и IgG4 AG Ala/Ala в дополнение к IgG1 и IgG2 дикого типа. Дальнейший анализ *in vitro* нескольких биопроб этих мутантов показал минимальный или неопределяемый уровень активности и значительно

сокращенное сродство FcRs. На основе проверок был выявлен мутант IgG2 Fc, обозначенный IgG2c4d, без явной тропности или авидности к FcRs (связывание мономерных или би-мультимерных лиганд) и без активности в различных вышеупомянутых эффекторных или иммуностимулирующих биопробах. IgG2c4d Fc содержит элементы, заменяющие аланин, серин и лейцин: V234A, G237A, P238S, H28A, V309L, A330, P331S (нумерация EU). Семь замененных остатков IgG2, IgG2c4d, можно считать первым по-настоящему деактивированным Fc по неспособности связывать FcRs, вызывать эффекторные функции или опосредованный Fc выброс цитокинов.

На основе данного открытия семь мутаций IgG2c4d можно использовать или комбинировать с другими мутантами аминокислот, либо мутации можно использовать в других изотипах IgG для достижения аналогичной или выборочной деактивации эффекторных функций, как объясняется в настоящем документе и в сочетании с известными в данной сфере методами.

Как указано в настоящем документе, замены V234A, G237A, P238S сокращают сродство и авидность FcγRIIa к связыванию и сокращают ADCP и зависимый от Fc выброс цитокинов при сохранении тропности молекулы к связыванию FcRn.

Таблица 1

Относительное сродство к связыванию Biacore. Сводные данные

Изотип/Вариант	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIIa
IgG1	+++++	+++	+++
IgG1 agly (N297A)	+++	-	+/-
IgG4 S>P, ala/ala	+++	-	+/-
IgG2	-	+++	+/-
IgG2m4	-	+++	+/-
IgG2c4a	-	+++	+/-
IgG2c4b	-	-	+/-
IgG2c4d	-	-	-
IgG2c4e	-	-	-

Таблица 2

Относительная avidность. Сводные данные

Изотип/Вариант	Авидность FcγRI	Авидность FcγRIIa	Авидность FcγRIIIa
IgG1	+++++	++++	+++
IgG1 agly (N297A)	+++	–	–
IgG4 S>P, ala/ala	+++	++	–
IgG2	–	+++	–
IgG2m4	–	+++	–
IgG2c4d	–	–	–

Таблица 3

Эффекторные функции и выброс цитокинов (CR). Сводные данные.

Изотип/Вариант	ADCC	ADCP	CDC	Выброс цитокинов
IgG1	+++++	+++++	+++++	+++++
IgG1 agly (N297A)	–	+++	–	++
IgG4 S>P, ala/ala	–	++	–	++
IgG2	–	++	–	+++
IgG2m4	–	++	–	++
IgG2c4d	–	–	–	–

Метод создания молекул, содержащих модифицированные Fc

Места для замены отбирали на основе желания получить состав со структурными особенностями естественного Fc антитела, связываемостью FcRn, стабильностью и сниженной способностью стимулировать каскад комплемента, лизис клеток, фагоцитоз клеток или выброс цитокинов.

Антитела класса As IgG двухвалентны и располагают двумя полными доменами Fv, представляющими функционально связанные между собой тяжелый и легкий переменные домены. Двухвалентность обеспечивает эффекты avidности, а также способность образовывать поперечные межмолекулярные связи между рецепторами антигена или Fc одной или различных клеток, тем самым вызывая движимую связыванием рецепторов биологическую активность

антител, не направленную на конкретные мишени. По этой причине мутанты Fc данного изобретения тестировали в «контексте авидности», что означает, что мутанты Fc IgG мультимеризировали на поверхности и тестировали на взаимодействие с мультимером конкретных рецепторов Fc.

Биологическая характеристика мутантов

Функциональность Fc-содержащих белков можно сравнивать при помощи нескольких хорошо известных анализов *in vitro*. В частности, представляет интерес сродство к членам семейства рецепторов FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Измерения можно производить с использованием рекомбинантных растворимых или клеточно-ассоциированных форм рецепторов. Кроме того, можно измерять сродство к FcRn, рецептору, ответственному за продленный период полувыведения IgG из обращения, например, с помощью связанной с лигандом гранулы формата «ALPHASCREEN» с использованием рекомбинантного растворимого FcRn. Используемая в высокопроизводительном скрининге технология однородного анализа ALPHASCREEN позволяет обнаруживать такие молекулярные изменения, как связывание. В основе технологии анализа находятся покрытые гранулы: «доноры» и «акцепторы». В технологии анализа ALPHASCREEN используются гранулы, взаимодействующие в непосредственной близости, что приводит к каскаду химических реакций, позволяющих значительно усилить итоговый сигнал. Для оценки относительных тропности и авидности среди и между белков можно применять прямые или косвенные измерения, например, конкурентное связывание.

Естественная эволюция изотипов IgG человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) позволило каждому из них проявлять различный спектр возможностей для активации иммунных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC, например, у IgG1 и IgG3), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP, например, у IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и комплементозависимая цитотоксичность (CDC, например, у IgG1, IgG3). Связанное с конкретным изотипом действие этих функций основывается на дифференциальной селективности рецепторов Fc, находящихся на различных клетках иммунной системы, а также

способностью связывать C1q и активировать формирование мембраноатакующего комплекса (MAC) с последующими CDC и CDP (комплементозависимым фагоцитозом) посредством специфических связывающих рецепторы компонентов комплемента на эффекторных макрофагах. Иерархия способности связывать первичный компонент каскада комплемента, C1q, изотипов человека выглядит как: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4, хотя активация комплемента посредством IgG2 и IgG4 при микробных инфекциях хорошо документирована.

Функциональные клеточные анализы, такие как ADCC и CDC, дают представление о вероятных функциональных последствиях определенных вариантных структур. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени, а затем вызывают ее лизис. В одном из вариантов анализ ADCC настроен так, что натуральные клетки-киллеры выступали в качестве основных эффекторных клеток, отражая функциональное воздействие на FcγRIIIA, который по имеющимся данным является единственным рецептором типа Fcγ, который экспрессируется этими клетками.

Для сравнения иммунных эффекторных функций различных мутантов также можно использовать анализ фагоцитоза, а также анализы, измеряющие клеточные реакции, такие как выброс супероксида или воспалительного медиатора. При изучении вариантов Fc оказались полезными модели *in vivo*. Например, использование мутантов антител анти-CD3 для измерения активации Т-клеток у мышей, зависящей от взаимодействия доменов Fc со специфическими лигандами, такими как рецепторы Fcγ. Направляемая антителами активация макрофагов влияет на антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), в результате чего опсонизированные клетки-мишени охватывают и переваривают макрофаги. *In vitro* дифференцированные макрофаги, экспрессирующие высокий уровень FcRc, можно дифференцировать в фенотип M1 с использованием IFNγ или GM-CSF до достижения

экспрессированного повышенного уровня всех FcRc (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa) по отношению к моноцитам. Такие анализы хорошо известны специалистам в области формирования антител.

Метод формирования антитела

Для обеспечения направленных мутаций в последовательностях константных областей IgG2 человека, использовавшихся в качестве отправной точки при создании и тестировании мутантов Fc, использовались обычные рекомбинантные процессы. Специалистам в данной области должно быть понятно, что для создания подходящих векторов для экспрессирования желаемых аминокислотных последовательностей в различных клетках-хозяевах для восстановления и тестирования можно использовать различные методы внесения изменений в последовательности кодирования.

Выбор или создание клеток-хозяев

Как описано в настоящем документе, клетка-хозяин, выбранная для экспрессирования рекомбинантного Fc-содержащего белка или моноклонального антитела, оказывает значительное влияние на окончательный состав, в том числе и на вариации в составе фрагментов олигосахаридов, связанных с белком в домене CH2 иммуноглобулина. Таким образом, один из вариантов изобретения связан с выбором подходящих клеток-хозяев для использования или развития производящей клетки, экспрессирующей желаемый терапевтический белок.

Кроме того, клетка-хозяин может быть взята у млекопитающего или выбрана из клеток COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Нер G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых их производных, immortalized или трансформированных клеток.

Кроме того, клетка-хозяин может быть выбрана из клеток видов или организмов, неспособных производить гликозилированные полипептиды, например, прокариотических клеток или организмов, таких как натуральные или искусственные бактерии *E. coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

Антитела

Описанные в этой заявке антитела могут включать или быть полученными из любого млекопитающего, например: человека, мыши,

кролика, крысы, грызуна, примата, козла или любой их комбинации и включают изолированные антитела человека, приматов, грызунов, млекопитающих, химерные и гуманизированные или обработанные CDR иммуноглобулины, продукты расщепления и прочие указанные части и их варианты.

Описанные антитела, Fc-содержащие белки или фрагменты Fc можно получать несколькими хорошо известными в данной области способами. В одном варианте антитела удобно получать из гибридом, полученных путем иммунизации мыши или другого животного с целевыми пептидами, клетками или экстрактами тканей. Таким образом, антитела можно получать с помощью любого из хорошо известных в данной области методов производства гибридом, например, описанных в издании Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989), полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Белки антител или гибридных Fc или их компоненты и домены можно получить и из библиотек доменов и компонентов, например, библиотеки фагов. Библиотеку фагов можно создать путем введения библиотеки случайных олигонуклеотидов или библиотеки полинуклеотидов содержащие интересующие последовательности, например, из В-клеток иммунизированных животных или человека (Smith, G.P. 1985. *Science* 228: 1315-1317). Библиотеки фагов антител содержат переменные пары фрагментов с тяжелыми (H) и легкими (L) цепями в одном фаге, что позволяет экспрессировать фрагменты Fv с одной цепью или фрагменты Fab (Hoogenboom, et al. 2000, *Immunol. Today* 21(8) 371-8). Разнообразием библиотеки фагемидов можно манипулировать для увеличения или изменения иммуноспецифических свойств моноклональных антител библиотеки для получения и последующего определения дополнительных желательных моноклональных антител человека. Например, кодирующие молекулу иммуноглобулина гены тяжелых (H) и легких (L) цепей можно случайно перемешать для создания новых пар HL в готовой молекуле иммуноглобулина. Кроме того, один или оба кодирующих гена цепей H и L можно мутагенизировать в определяющий комплементарность регион (CDR) переменного фрагмента полипептида иммуноглобулина, а затем проверить на

желаемое сродство и нейтрализацию способностей. Библиотеки антител также можно создавать синтетически путем выбора одной или нескольких последовательностей человека и внедрения кассет CDR, полученных из репертуара антител человека или путем запланированной вариации (Kretzschmar and von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:598-602). Разнообразные позиции не ограничиваются CDR, а могут включать также и сегменты переменных регионов или переменные регионы не только антител, а, например, пептидов.

К другим библиотекам целевых связывающих компонентов, которые могут включать другие регионы, кроме переменных регионов антител, относятся рибосомные, дрожжевые и бактериальные дисплеи. Рибосомный дисплей представляет собой метод перевода мРНК в родственные белки с сохранением белка, прикрепленного к РНК. Последовательность кодирования нуклеиновой кислоты восстанавливается посредством RT-PCR (Mattheakis, L.C. et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022). Дрожжевой дисплей основан на построении гибридных белков связанного с мембраной рецептора связывания альфа-агглютинаина дрожжей, *aga1* и *aga2*, части системы типа спаривания (Broder, et al. 1997. *Nature Biotechnology*, 15:553-7). Бактериальный дисплей основывается на слиянии мишени с экспортированными бактериальными белками, которые связываются с клеточной мембраной или стенкой (Chen and Georgiou 2002. *Biotechnol Bioeng*, 79:496-503).

По сравнению с гибридной технологии фаги и другие методы дисплеев антител дают возможность управлять выбором по антигену-мишени *in vitro* и без ограничения возможности воздействия хозяина на антиген или наоборот.

Данное изобретение также обеспечивает нуклеиновые кислоты, кодирующие составы изобретения в виде отдельных полинуклеотидов или как часть векторов экспрессии, включая векторы, совместимые с экспрессией прокариотических, эукариотических или нитчатых фагов, выделением или отображением составов или их направленных мутагенов.

Использование Fc-содержащих молекул

Составы (антитела, гибриды Fc, фрагменты Fc), созданные любым из описанных выше методов, можно использовать для диагностики, лечения, обнаружения или модулирования заболеваний человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, жидкостей или, в целом, клеток-хозяев. В настоящем документе описывается модификация Fc части антитела, белка гибридного Fc или фрагмента Fc для уменьшения или прекращения связывания гамма рецепторов Fc и указанных эффекторных функций, при которой антитело сохраняет первоначальные свойства нацеливания и обеспечиваются антитела и Fc-конструкции с более широкими возможностями, биофизическими свойствами, стабильностью и способностью сохраняться в организме хозяина.

К заболеваниям и патологиям, лечение которых можно осуществлять с использованием состава, представленного в данном изобретении, относятся в том числе: неврологические расстройства, как например, болезнь Альцгеймера и в том числе нейропатические боли; дерматологические заболевания; метаболические заболевания; остеоартрит; послеожоговые или посттравматические состояния; заболевания сердечно-сосудистой системы, включая инфаркт миокарда, застойную сердечную недостаточность, инсульт, ишемический инсульт, кровоизлияние; а также общие заболевания, опосредованные состоянием иммунной системы, включая ревматические заболевания, псориаз и склеродермию.

Хотя изобретение описано в общем виде, осуществления изобретения будут более подробно рассмотрены в приведенных далее примерах, которые никоим образом не ограничивают действия пунктов формулы изобретения.

ПРИМЕР 1. ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПЫТАНИЕ МУТАНТОВ Fc

С использованием стандартных рекомбинантных методов была сформирована серия конструкторов с мутациями, полученных из антител IgG2 человека, как показано в таблице 4. Для антител с полными переменными доменами использовали известные последовательности CDR антител анти-HER2 и анти-CD20 для формирования изотипа и мутантов Fc согласно приведенным данным.

Мутанты антитела временно экспрессировались в клетках 293Т с использованием стандартных процедур клонирования и экспрессии. МАВ очищали при помощи колонок А белка до однородности более 95% перед дальнейшими экспериментальными исследованиями.

Таблица 4

Подкласс & обозначение	Мутации (нумерация EU)
IgG1	
IgG1 Ag	N297A
IgG4 A/A	S228P, F234A, L235A
IgG2	
IgG2m4	H268Q, P331S, A330S V309L
IgG2c4a	H268A, V309L, A330S, P331S
IgG2c4b	V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S
IgG2c4c	V234A, G237A, H268A, V309L, A330S, P331S
IgG2c4d	V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S
IgG2c4e	P233S, V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S

Исследования тропности Biacore

Эксперименты по определению поверхностного плазменного резонанса проводились с использованием оптического биосенсора Biacore 3000 (Biacore AB, Упсала, Швеция; в настоящее время часть GE Healthcare). Эксперименты проводились при температуре 25°C в буферном растворе D-PBS, содержащем 3 мМ EDTA и 0,01% поверхностно-активного вещества P20. Для анализа взаимодействия рецепторов с мутантами Fc была подготовлена поверхность захвата путем ковалентного сопряжения мышиного анти-His IgG (R&D системы кат. №MAB050) к сенсорному устройству CM-5. Анти-His Ab разбавили в 10 мМ буферного раствора ацетата натрия pH 4,5 (Biacore AB) и связали с карбоксиметилированной поверхностью декстрана сенсора CM-5 (~3000 RU) с применением инструкций производителя в отношении химических процессов сопряжения аминов. Оставшиеся реакционноспособные группы на поверхности дезактивировали при помощи этаноламина-HCl. Для выполнения

кинетических экспериментов на этой поверхности были захвачены 165, 351 и 208 реакционных единиц (RU) из FcγRI, FcγRII и FcγRIII, соответственно. После захвата рецепторов был произведен ввод серийного раствора дикого типа или мутантов Fc (от 4000 нМ до 3,9 нМ в 4 этапа разведения) при 30 мкл/мин. За фазой ассоциации наблюдали в течение 3 минут. За этим следовал поток буферного раствора в течение 20 минут для контроля диссоциации связей. Поверхность захвата регенерировали при помощи девятисекундного пульса 100 мМ фосфорной кислоты при 100 мкл/мин с последующим вводом текущего буферного раствора.

Для коррекции влияния буферного раствора на сигнал и шум прибором применялось вычитание данных с двумя ссылками (Myszka 1999) при помощи программного обеспечения Scrubber версия 1.1g (BioLogic Software) для ссылок. После первичной обработки проводился кинетический анализ данных при помощи оценочного программного обеспечения BIA, версия 4.0.1 (Biacore, AB) с использованием простой модели связывания 1:1.

Исследования AlphaScreen и связывания

Конкуренция и прямое связывание IgG различных FcγRs оценивали при помощи анализа связывания на основе однородных гранул, AlphaScreen™ (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс). Вкратце, эксперименты проводились, как описано выше (Lazar et al 2006 Proc Natl Acad Sci USA 103(11): 4005-10) с незначительными изменениями. FcγRI, IIa, были приобретены у R&D systems. FcγRIIIa и FcRn были клонированы, экспрессированы и очищены. Мутанты IgG Fc были протестированы в конкурентном связывании против биотинилированного CNT06234 (неспецифического контрольного антитела человека подкласса IgG1) или анти-Her2/neu (антитела IgG2 человека), которые были биотинилированы с помощью NLS-биотина, Pierce, отношение 2:1.

В исследованиях конкурентного связывания к итоговой тестовой концентрации 200 нг/мл добавляли биотинилированные антитела, а затем конкурирующие тестовые антитела в установленных итоговых концентрациях, указанных на каждой иллюстрации эксперимента. FcγRs добавили в 96-луночные пластины

при итоговой концентрации 200 нг/мл, а затем последовательно добавляли донор стрептавидина и гранулы акцептора Ni-хелата. После закупоривания пластин и встряхивания при комнатной температуре результаты считывали с помощью считывающего устройства, а данные отражали на графике и вносили в GraphPad Prism. Были проведены исследования авидности аналогичные исследованиям завершения, с тем исключением, что тестовые молекулы IgG биотинилировали в соотношении 2:1, а прямую связь FcR проверяли в отсутствие конкуренции по сравнению с контрольным антителом.

Результаты

Относительное сродство вариантов IgG для FcRc (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa), оцененная в ходе анализа SPR/Biacore и полученная из сенсограм, представлена в таблице 5.

Таблица 5

Данные Biacore по взаимодействию Fc мутантов с Fc рецепторами

Fc	Fcγ RI K _D (uM)	Fcγ RIIa K _D (uM)	Fcγ RIIIa K _D (uM)
huIgG1	0,013*	1,7	0,16*
huIgG1 - Ag	3,7	>170	>95
huIgG4 Ala-Ala, Ser-Pro	15	150	55
huIgG2	120	1	41
huIgG2m4	210	2,7	95
huIgG2c4a	160	2,2	85
huIgG2c4b	38	170	>95
huIgG2c4c	0,044*	19	0,64*
huIgG2c4d	>210	>170	>95
huIgG2c4e	>210	>170	>95

Эти цифры соответствуют параметрам, выведенным для глобального соединения одного эксперимента.

Для этих 4 наборов данных показатели тропности получали путем простого кинетического соединения по простой модели связывания 1:1. Для всех остальных показатели тропности получали путем соединения на основе анализа тропности в готовом

состоянии простого связывания 1:1.

Относительное сродство мутантов IgG к FcRc человека (FcγRIIa, FcγRIIb и FcRn) в контексте авидности, то есть для двухвалентных антител, связывающихся с плотным целевым полем, измеренная при помощи конкурентных анализов Alpha Screen™ IgG1 человека (CNT06234), показана на рис 3А-С, соответственно.

Экспериментальные данные показали, что у мутантов IgG2, а также IgG1 ag и IgG4 Ala/Ala значительно сокращается сродство к связыванию с рецепторами Fc гамма по сравнению с IgG1, при сохранении способности связываться с FcRn (неонатальный рецептор Fc, обеспечивающий полувыведение в условиях *in vivo*). В частности, в конкурентном связывании против IgG2 и в связывании с FcγRIIa от высокой до низкой тропности, последовательность выглядит следующим образом: IgG1>IgG2c4a>IgG2m4>IgG2=IgGc4c>IgG2c4b>IgG4 ala/ala>IgG4 agly>IgG2c4d. Эта последовательность постоянно связывается с FcγRIIb в конкуренции с IgG1 (CNT06234). Дальнейший анализ конкурентного связывания против IgG1 (CNT06234) в связывании с FcRn при pH 6,4 показал, что все изотипы и мутанты связываются с FcRn относительно одинаково. Важно отметить, что IgG2c4d и IgG1 agly демонстрируют минимальное или вообще не демонстрируют связывания с FcγRIIa и FcγRIIb.

ПРИМЕР 2 ADCC и CDC

CDC инициируется по трем категориям путей: антителозависимый (классический путь), полисахаридозависимый (лектинозависимый) и чужеродные поверхностные структуры (альтернативный путь), все из которых формируют каскад протеолитических шагов, ведущих к появлению мембраноатакующего комплекса, действие которого приводит к лизису клетки-мишени или микроба (см.: W.E. Paul Immunology). Изотипы и мутанты Fc, описанные в примере 1, были получены с использованием переменных доменов анти-CD20 антител, после чего оценивалась их способность лизировать клетки-мишени WIL2-S В-клеточной лимфомы в присутствии сыворотки крови человека. В качестве положительного контроля для лизиса использовался доступный на рынке препарат Ритуксан®, терапевтическое анти-CD20 средство,

способное влиять на CDC в клетках WIL2-S. Для CDC анализа клетки-мишени Wil2-S посеяли в 96-луночные пластины, инкубировали с комплементом сыворотки человеческой крови (раствор 1/6), а относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью AlamarBlue.

Анализ ADCC проводили с использованием переменного домена анти-HER2/neu в сочетании с различными доменами Fc различных изотипов или вариантов IgG, как описано в примере 1 и клетками рака молочной железы SkBr3 в качестве мишеней. Анализы проводили, как описано выше, методом обнаружения клеточного лизиса EuTDA (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс). Загруженные TDA клетки-мишени рака груди SkBr3 посеяли в 96-луночные пластины с U-образным дном, опсонизированные назначенными концентрациями антител и выращивали вместе с 25-кратно превосходящим количеством МНПК, изолированных из лейкопакетов при температуре 37°C. Через 3 часа пластины центрифугировали, а супернатанты проанализировали на предмет выброса TDA в соответствии с инструкциями производителя. Исходные данные нормализовали и отображали на графике при помощи GraphPad Prism. Для CDC анализа клетки-мишени Wil2-S посеяли в 96-луночные пластины по 50000 на лунку, инкубировали с комплементом сыворотки человеческой крови (раствор 1/6), а относительную жизнеспособность клеток оценивали с помощью AlamarBlue.

Результаты

ADCC, которая в основном затрагивает FcγRIIIa на натуральных клетках-киллерах, не обнаруживалась для ряда прошедших испытания конструкторов, среди которых IgG2, IgG2m4, IgG2c4d и e, IgG1 agly и IgG4 ala/ala (фиг. 5), что совпадает с сокращением связывающих характеристик, продемонстрированным для более высокой тропности рецепторов FcγRIIIa (V), а также отсутствием связывания авидности по результатам анализа AlphaScreen™ (фиг. 4A). Использование в данном исследовании мишеней высокой плотности, таких как HER2/neu на клетках рака молочной железы, показало, что сродство Fc к FcγRIIIa (ниже 40 мкМ) оказывается недостаточной, чтобы вызвать лизис клетки-

мишени. Кроме того, ни одно из антител или Fc-мутантов, помимо IgG1, не продемонстрировало значительный уровень CDC против клеток-мишеней WIL2-S в анти-CD20 конструктах, на которых проводились испытания (фиг. 6). Среди тестируемых подклассов и мутантов IgG только IgG1 продемонстрировал заметные уровни CDC, что позволяет предположить, что независимо от связывания C1q, ни один из прочих мутантов не может вызвать CDC (фиг. 6). В то время предыдущие исследования показывали, что IgG2 вызывает минимальный CDC посредством связывания C1q и активации классического пути, мы не наблюдали значительной активности в анти-CD20 контексте, что совпадает с предыдущими наблюдениями (Idusogie, Presta et al. 2000 J Immunol 164(8): 4178-84). Кроме того, указывавшиеся ранее признаки наличия остаточной активности комплемента IgG1 agly также не были обнаружены с помощью анти-CD20 и сыворотки крови человека (Dorai, Mueller et al. 1991 Hybridoma 10(2): 211-7). Одно из объяснений этого несоответствия заключается в том, что, хотя IgG2 вызывает низкий уровень активации комплемента, активации может быть недостаточно, чтобы вызвать формирование мембраноатакующего комплекса (MAC), достаточного для лизиса опсонизированных клеток.

Эти данные свидетельствуют о том, что, независимо от уровня активации комплемента, формирование мембраноатакующих комплексов, завершающееся лизисом клеток-мишеней, является неполным или недостаточным для изотипов антител, помимо IgG1.

ПРИМЕР 3 АНТИТЕЛОЗАВИСИМЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ФАГОЦИТОЗ

Связывающие анти-HER2/neu мутанты Fc оценивали по способности вызывать антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) с применением опсонизированных клеток-мишеней рака молочной железы, SK-Br3 и макрофагов.

Антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP)

Периферические мононуклеары крови выделили из лейкопакетов стандартным методом градиента плотности Фикол-Пака (GE Healthcare) (Biological Specialty Corporation), а клетки разделили на аликвоты и поместили в азот. МНПК разморозили, а CD14-положительные клетки выделили отрицательным истощением при

помощи изоляционного набора CD14 без истощения CD16 (Stem Cell Technologies) согласно инструкциям производителя. Клетки высевали в $0,1 \times 10^6$ лунки/см² в RPMI/5% инактивированный теплом FBS/50 мкг/мл гентимицин в присутствии 20 нг/мл GM-CSF (R&D Systems) на 7 дней для получения моноцитарных макрофагов. Опухолевые клетки SK-BR-3 были помечены PKH67 (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки-мишени промыли и инкубировали с моноцитарными макрофагами в соотношении 1 клетка-мишень к 4 клеткам-эффекторам в присутствии антител в течение 4 часов при температуре 37°C в 5% CO₂инкубаторе. После инкубации клетки отделили при помощи Accutase (Millipore), а макрофаги поместили антителами анти-CD11b (BD Biosciences), конъюгированными с AlexaFluor-647 (Invitrogen). Клетки проанализировали посредством проточной цитометрии для отделения раковых клеток (PKH67^{поз}, CD11b^{нег}), макрофагов (PKH67^{нег}, CD11b^{поз}) и фагоцитированных опухолевых клеток (PKH67^{поз}, CD11b^{поз}). Процент фагоцитоза определяли по следующей формуле: (фагоцитированные опухолевые клетки) / (фагоцитированные опухолевые клетки и отдельные опухолевые клетки) $\times 100\%$. Клетки получили на FACS Calibur (Becton Dickinson), а результаты проанализировали при помощи FloJo Software (Tree Star).

Изолированные моноциты дифференцировали *in vitro* с использованием GM-CSF, а затем характеризовали для уровней экспрессирования FcRc методом анализа потоковой цитометрии. Как отмечалось в предыдущих исследованиях других авторов, активированные GM-CSF макрофаги экспрессировали повышенные уровни всех FcRc (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa) по сравнению с исходными моноцитами (данные не представлены). Конструкты анти-HER2/neu IgG мутантов Fc впоследствии протестировали в анализах фагоцитоза с использованием макрофагов M1.

Результаты

После 4 часов совместного культивирования с клетками в присутствии каждого mAb для IgG1 были установлены значительные уровни ADCP, однако минимальные уровни ADCP также наблюдались и для агликозилированных IgG1, IgG2, IgG2m4 и IgG4 Samp; gt; P

ala/ala при более высокой концентрации антител (фиг. 7). При этом для IgG2c4d не были выявлены заметные уровни ADCP. Это наблюдение согласуется с ранее продемонстрированными профилями связывания различных IgG по сравнению с FcRc. Например, в то время как для IgG1, IgG и IgG4 agly ala/ala было продемонстрировано связывание с FcγRI при использовании нескольких лигандов с гранулами (например, в системе AlphaScreen®), все три также демонстрировали и ADCP. IgG2, IgG2M4 и IgG4 ala/ala продемонстрировали минимальный ADCP при более высоких концентрациях. Взаимодействие с FcγRIIa со стороны IgG2 и IgG2m4, как показали исследования авидности, предполагает, что влияния FcγRIIa самого по себе может быть недостаточно для развития значительных уровней ADCP. Результаты Biacore и AlphaScreen™ (таблица 5 и фиг. 4B и 4C) также указывают на то, что, хотя IgG agly сохраняет связи с FcγRI, IgG4 ala/ala демонстрирует авидность по отношению к FcγRI и FcγRIIa, при этом, ADCP сравнительно более стабилен для IgG1 agly чем для IgG4 ala/ala. Так как у IgG1 agly отмечается минимальное или вообще не отмечается связывание с FcγRIIa, а следовательно, и с очень похожим ингибиторным FcγRIIb (на основе идентичности последовательности >95% во внеклеточном домене), активации ITAM посредством сигнализации FcγRI не противодействует сигнализация посредством ITIM, связанных с активацией FcγRIIb. При этом, у IgG4 S>P ala/ala отмечается сокращенный фагоцитоз, скорее всего, вследствие активации FcγRIIb. Наконец, полное отсутствие наблюдаемого мономерного или основанного на авидности связывания IgG2c4d с различными FcRc также подтверждает уникальность отсутствия фагоцитарных способностей у этой основы Fc.

ПРИМЕР 4. ОПОСРЕДОВАННЫЙ АНТИТЕЛАМИ ВЫБРОС ЦИТОКИНОВ

Взаимодействие FcR с Fc на клетках иммунной системы способствует выбросу цитокинов при образовании поперечных межмолекулярных связей. Для имитации основанного на авидности взаимодействия FcRc с клетками иммунной системы моноклональные антитела связали с полистиролом.

Выброс цитокинов с использованием анти-HER2/neu мутантов

IgG осуществили после прямого связывания IgG с латексовыми гранулами после инкубации в течение ночи. Промытые гранулы добавляли в изолированные МНПК человека в различных указанных концентрациях от 1500 до 250000 на мл и инкубировали в течение ночи перед удалением супернатанта совместной культуры для измерения выделившегося TNF α при помощи стандартного набора AlphaELISA от PerkinElmer (Волтем, Массачусетс).

Проверенные изотипы IgG и Fc мутанты обладают дифференциальной способностью стимулировать выброс цитокинов через опосредованное рецептором Fc выделение TNF α из МНПК (фиг. 8). Таким образом, уровень секреции TNF различных изотипов и их Fc мутантов в порядке от наибольшего до наименьшего следующий:

IgG1>IgG2>IgG2m4>IgG2c4a>IgG1agly>IgG4ala/ala>IgG2c4b>IgG2c4c>IgG4c4d и е. Следует отметить, что оба мутанта Fc, IgG4d и е, вызывают минимальный или вообще не вызывают заметный выброс цитокинов (TNF).

ПРИМЕР 5. ИСТОЩЕНИЕ В-КЛЕТОК *Ex vivo*

Для лучшего понимания потенциала изотипов и мутантов по уровню противодействия *in vivo* был определено истощение В-клеток WIL2-S *ex vivo* в присутствии гепаринизированной цельной человеческой крови. Так как известно, что анти-CD20 IgG1 взаимодействует со всеми эффекторными функциями (ADCC, CDC, ADCCP), вся система кровообращения, включая наличие PMN (нейтрофилов, базофилов и др.), комплемента человека и избытка IgG, считалась типичной для уровня противодействия каждого варианта.

Вкратце, эффекторные клетки брались из всей человеческой крови, а клетки WIL2-S служили клетками-мишенями для анализов ADCC. Клетки-мишени предварительно пометили BATDA (PerkinElmer в течение 30 минут при 37°C, дважды промыли и вновь поместили в DMEM/5% инактивированный теплом FBS; затем 50 мкл мишеней (2×10^4 клеток на лунку) добавили в лунки 96-луночных пластин с U-образным дном. Еще 50 мкл добавили с антителами различной концентрации или без, а клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем в лунки добавили целую

человеческую кровь (100 мкл). Все образцы были получены в трех экземплярах. Планшеты центрифугировали при 200g в течение 3 минут, выдерживали в инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ в течение 3 часов, а затем снова центрифугировали при 200g в течение 3 минут. В общей сложности было удалено 20 мкл супернатанта на лунку, а лизис клеток измеряли путем добавления 200 мкл реагента DELPHIA на основе европия (PerkinElmer). Флуоресценцию измеряли при помощи считывающего устройства Envision 2101 Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные нормализовали до максимальной цитотоксичности, полученной путем обработки клеток с помощью Triton X-100 (Sigma Aldrich), и минимального контроля, который определялся спонтанным выбросом BATDA только из клеток-мишеней. Данные адаптировали к сигмоидальной модели «доза-реакция» при помощи GraphPad Prism v5.01.

Совместное культивирование WIL2-S в присутствии крови человека показало значительное опосредованное эффекторами истощение помеченных WIL2-S посредством IgG1 и в некоторой степени IgG2 и IgG2M4. Следует отметить, что фрагменты (Fab')₂ и Fab анти-CD20 оба вызывали определенный уровень истощения WIL2-S, который может указывать на наличие расщепленных антител IgG в сыворотке крови (см., например, Breski et al. 2008 J Immunol 181:3183-3192), способных восстановить эффекторную функцию. В соответствии с предыдущими данными по ADCC, CDC и ADCP с IgG2c4e существенных или заметных уровней выброса цитокинов не наблюдалось.

ПРИМЕР 6. ВЫЖИВАЕМОСТЬ В-КЛЕТОК *in vivo* С НАЦЕЛИВАНИЕМ НА CD20

Связанную с IgG2c4e эффекторную функцию оценивали *in vivo* с помощью установленной модели истощения анти-CD20 в В-клетках яванских макак (Reff et al, 1994, Blood 83:435-445).

Яванским макакам (n=3/группу) вводили физиологический раствор за 7 дней до одной болюсной внутривенной дозы IgG1 или IgG2Σ в количестве 0,2 мг/кг или 2 мг/кг. В назначенные дни после инъекции уровни В-клеток в цельной крови определяли методом проточной цитометрии В- и Т-клеток с использованием анти-CD20 и анти-CD3 в качестве маркеров, соответственно.

Средний уровень В-клеток (CD20+/CD3-) для каждой группы отражали на графике в течение трех недель после инъекции (фиг. 9). В то время как низкие дозы IgG1 (0,2 мг/кг) вызывали почти полное истощение всех В-клеток через 1 день после инъекции (99%), анти-CD20 IgG2c4e не вызвал значительных нарушений (в среднем 15% в группе). Уровни В-клеток оставались относительно нормальными для подопытных животных, обрабатывавшихся анти-CD20 IgG2c4e в течение последующих дней, после чего в течение последующих недель установилась постепенная тенденция к восстановлению уровня В-клеток у обработанных IgG1 обезьян. Следует отметить, что, как IgG2c4e, так и IgG1, вызывают почти полное истощение В-клеток при более высокой дозе 2 мг/кг.

Полагается, что истощение В-клеток, опосредованное анти-CD20 может вызываться несколькими механизмами, в том числе ADCC, CDC и апоптозом. В связи данными об истощении В-клеток у обезьян, указывающими на истощение В-клеток при более высоких дозах (2 мг/кг) IgG2c4e, механистическую основу истощения В-клеток оценили дополнительно путем измерения уровня апоптоза, вызываемого антителами в изолированных В-клетках.

Изолированные В-клетки обрабатывали IgG1, IgG2c4e (Fab')₂ и IgG2 в концентрациях 0, 0,26, 2,6 и 26 мкг/мл, а также несвязывающим контрольным количеством mAb (BM21) в течение 4 часов, а количество положительных на Annexin V и отрицательных на 7AAD клеток установили при помощи проточной цитометрии. Специфические итоговые концентрации 2,6 и 26 мкг/мл выбрали с учетом оценки максимальной концентрации IgG в сыворотке *in vivo* после болюсных инъекций 0,2 и 2 мг/кг.

Для всех трех связывающих антител наблюдалась зависящая от дозы индукция апоптоза всех IgG, включая (Fab')₂, что указывает на достаточность опосредованного анти-CD20 установления перекрестных молекулярных связей для вызова смерти клеток при более высоких дозах, но не при минимальной дозе IgG2c4e. Следует отметить, что (Fab')₂ также продемонстрировал значительный апоптоз в отсутствии Fc, что подтверждает предположение о возможности вызова опосредованного анти-IgG апоптоза независимо от опосредованного Fc установления

перекрестных молекулярных связей, как наблюдалось ранее.

Таким образом, нормальные функции, связанные с формированием перекрестных молекулярных связей антигенов-мишеней в клетках, не пропадают под воздействием модифицированного варианта Fc.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная Fc-содержащая молекула, содержащая мутированный домен Fc, содержащий мутации L235A, G237A и P238A, и имеющая сниженное связывание по меньшей мере с одним рецептором Fcγ (FcγR) по сравнению с Fc-содержащей молекулой с доменом Fc дикого типа.

2. Молекула по п.1, где мутированный домен Fc представляет собой IgG1 и также включает мутацию L234A.

3. Молекула по п.2, где мутированный домен Fc представляет собой IgG1 и также включает мутации H268A, A330S и P331S.

4. Молекула по п.3, где аминокислотная последовательность домена Fc по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности домена Fc человека.

5. Молекула по п.1, где мутированный домен Fc представляет собой IgG4 и также содержит мутацию F234A.

6. Молекула по п.5, где мутированный домен представляет собой IgG4 и также содержит мутацию S228P.

7. Молекула по п.6, где мутированный домен Fc представляет собой IgG1 и также содержит мутацию Q268A.

8. Молекула по п.1, содержащая домен Fc антитела с мутированной областью IgG1, содержащей мутации L234A, L235A, G237A, P238A, H268A, A330S и P331S.

9. Молекула по п.1, содержащая домен Fc антитела с мутированной областью IgG4, включающий мутации S228P, F234A, L235A, G237A, P238A и необязательно делецию G236.

10. Молекула по п.1, содержащая домен Fc антитела с мутированной областью IgG4, включающей мутации S228P, F234A, L235A, G237A, P238A, Q268A и необязательно делецию G236.

11. Молекула по п.1, в котором по меньшей мере один FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa or FcγRIIIb.

12. Молекула по п.11, в котором молекула представляет собой антитело, фрагмент антитела или область Fc.

13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий молекулу по любому из пп.1, 8 или 9.

14. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.13 .

15. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.14.

16. Способ получения молекулы, содержащей мутант Fc, обладающей сниженным связыванием по меньшей мере с одним рецептором Fcγ (FcγR) по сравнению с Fc-содержащей молекулой с доменом Fc дикого типа, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, при которых молекула, содержащая мутант Fc, экспрессируется, и очистку экспрессированной молекулы, содержащей мутант Fc.

17. Выделенный рекомбинантный полипептид, содержащий

a. связывающий домен, способный связывать молекулу-мишень; и

b. домен Fc, содержащий

i. мутированный константный домен IgG1, содержащий мутации L234A, L235A, G237A, P238A, H268A, A330S и P331S; или

ii. мутированный константный домен IgG4, содержащий мутации S228P, F234A, L235A, G237A, P238A и необязательно делецию G236,

где полипептид способен связываться с молекулой-мишенью, не вызывая значительный комплементозависимый лизис или опосредованную клеткой деструкцию молекулы-мишени.

18. Полипептид по п.17, где связывающий домен выбран из группы, состоящей из связывающего участка антитела, фермента, гормона, внеклеточного домена рецептора, цитокина, поверхностного антигена клетки иммунной системы, лиганда и молекула адгезии.

19. Полипептид по п.18, где домен Fc по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности человеческого IgG1 или IgG4 константного домена.

20. Полипептид по п.19, где связывающий домен представляет собой связывающий участок антитела.

21. Полипептид по п.20, где связывающий домен специфически связывает мишень в неврологической ткани, эндокринной ткани, сосудистой ткани, ткани сердца? синовиальной ткани, кожной ткани или ткани слизистой оболочкой.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая Fc-содержащую молекулу по п.1 или полипептид по п.17 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

По доверенности

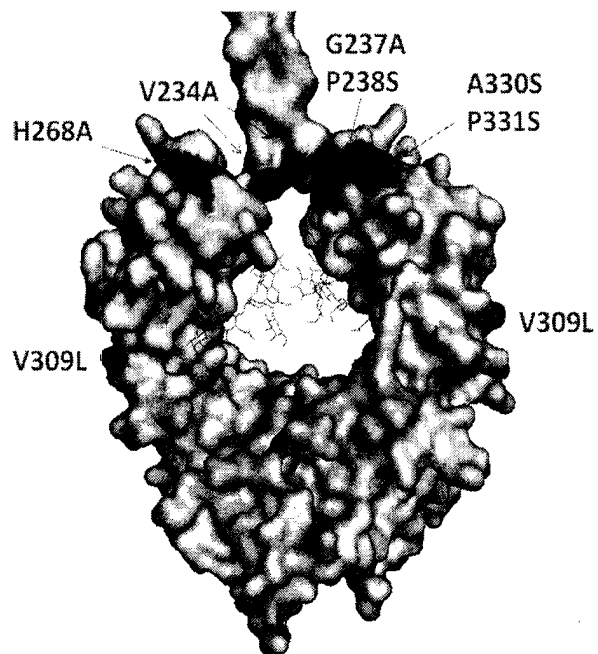
Фиг. 1

```

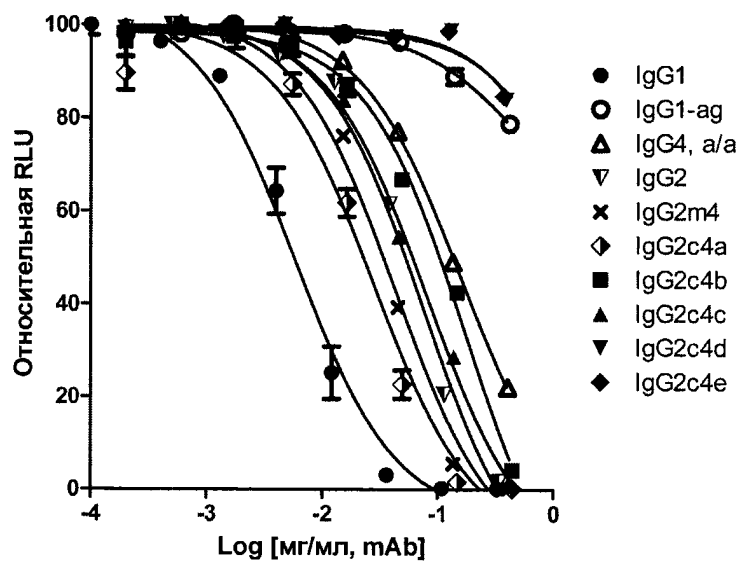
218                                     267
hIgG2 KCC---VECPPCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
hIgG4 KYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
hIgG1 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
      *          **      *          *
268                                     317
hIgG2 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK
hIgG4 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
hIgG1 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
      ***** **      *****
318                                     367
hIgG2 EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
hIgG4 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC
hIgG1 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
      ***** **      ***** * *****
368                                     417
hIgG2 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
hIgG4 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
hIgG1 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
      ***** *****
418                                     447
hIgG2 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
hIgG4 QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
hIgG1 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
      * ***** **

```

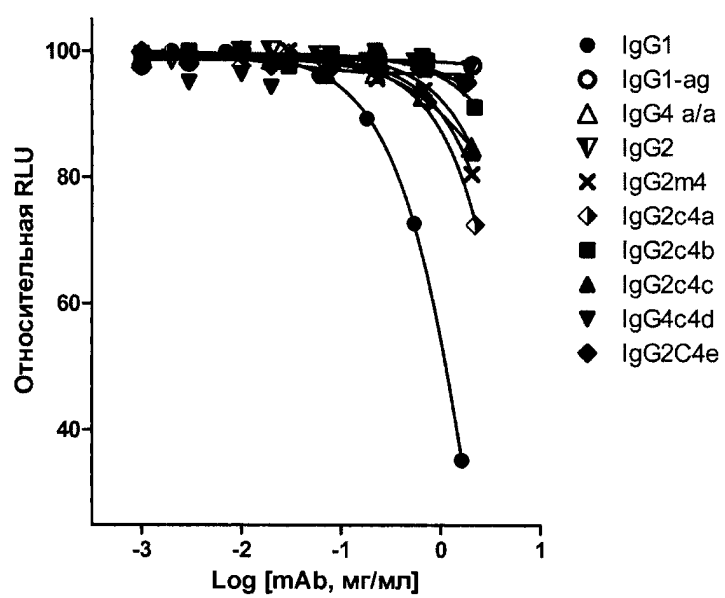
Фиг.2



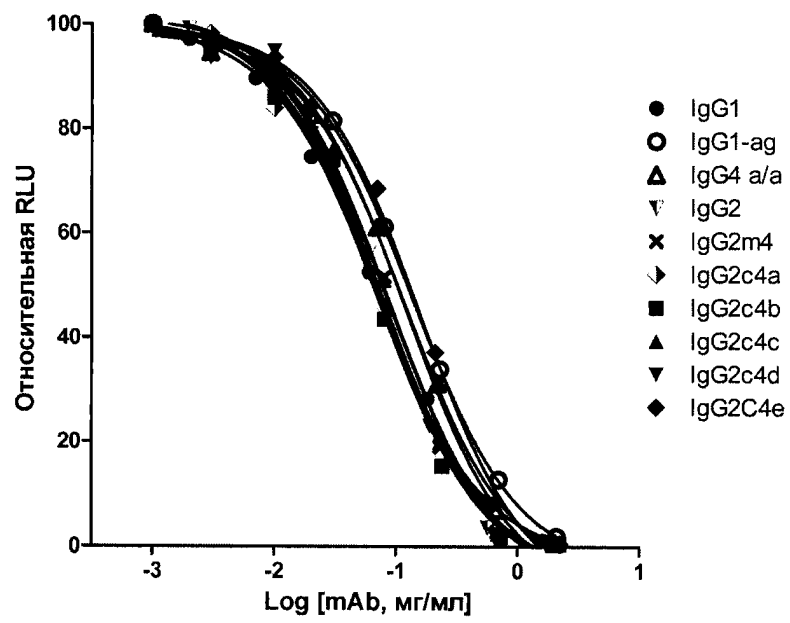
Фиг.3А



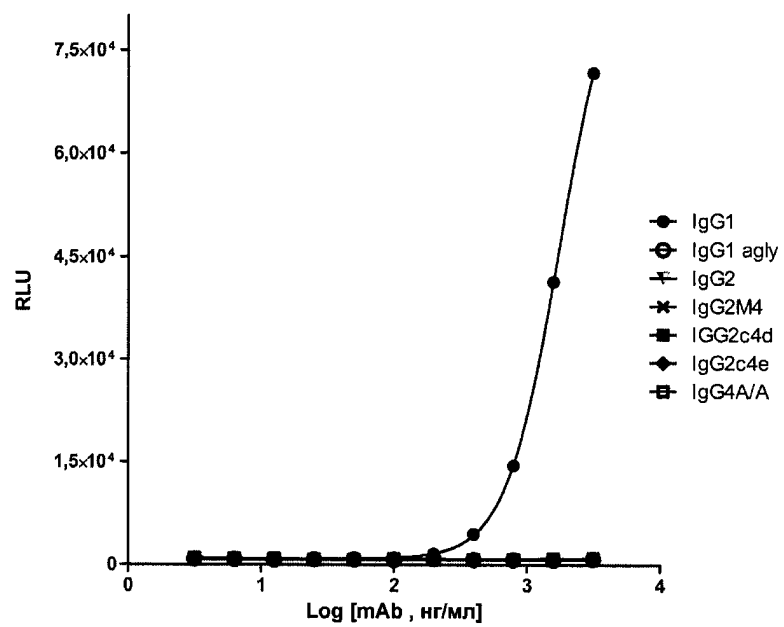
Фиг.3В



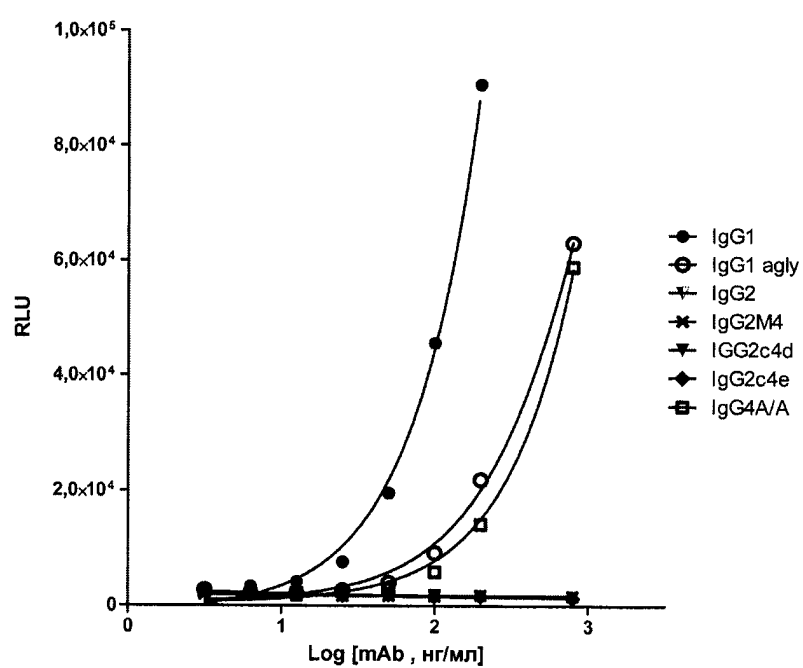
Фиг.3С



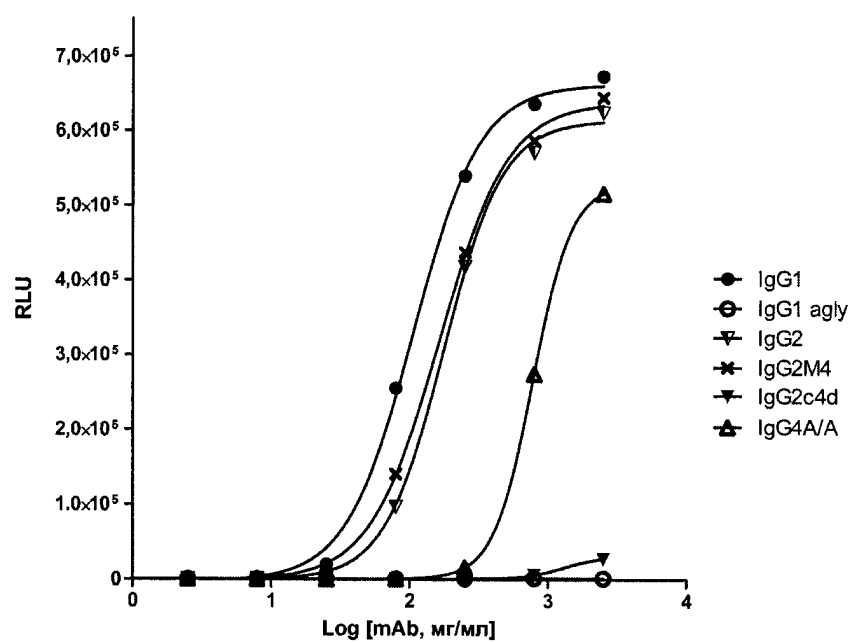
Фиг.4А



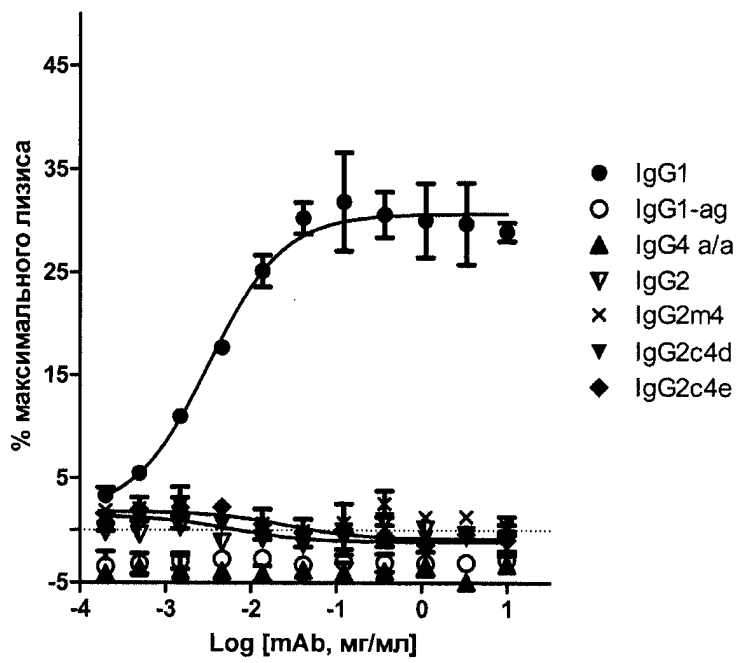
Фиг.4В



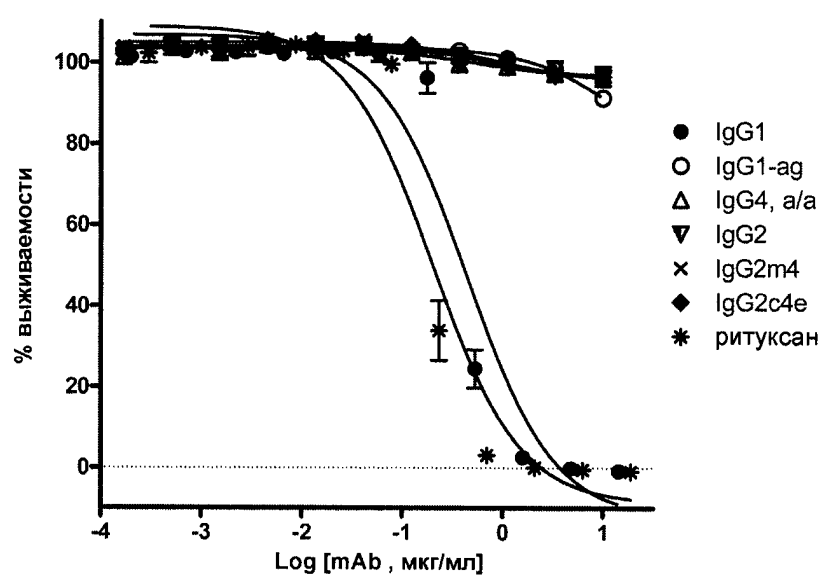
Фиг.4С



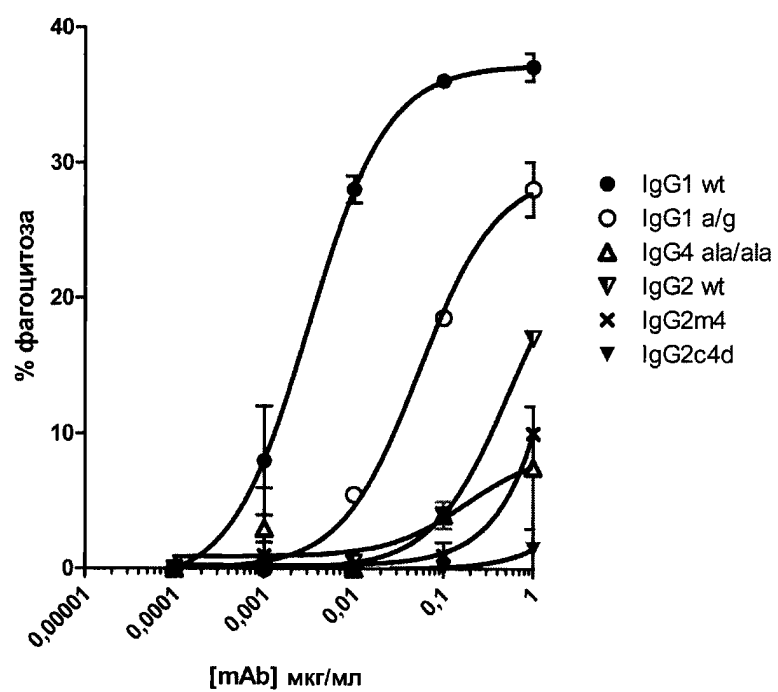
Фиг.5



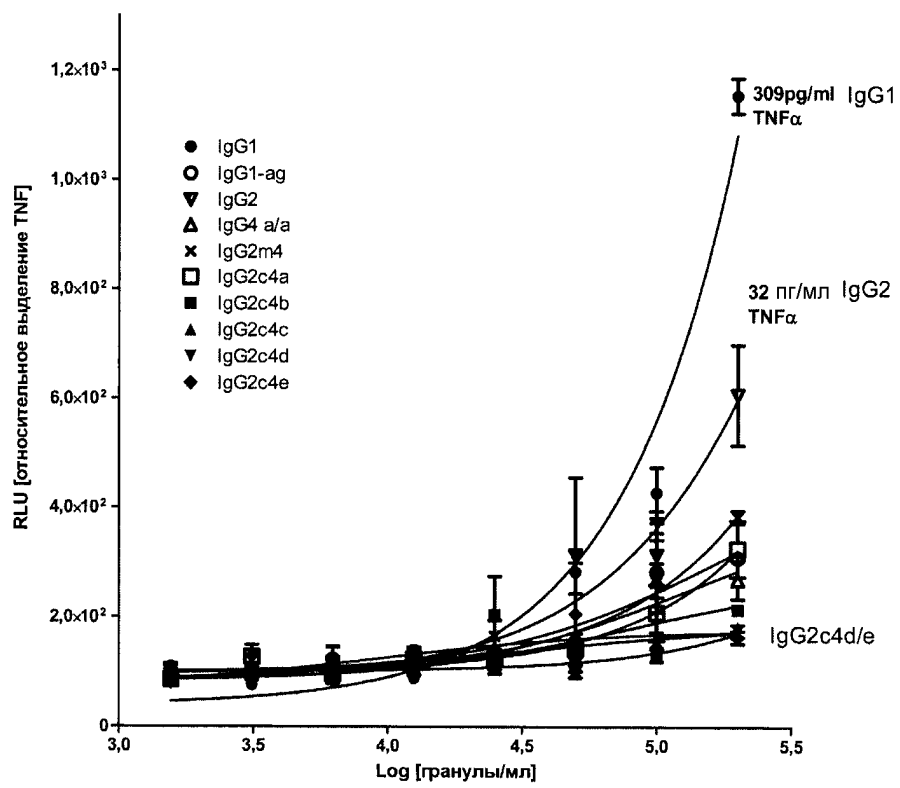
Фиг.6



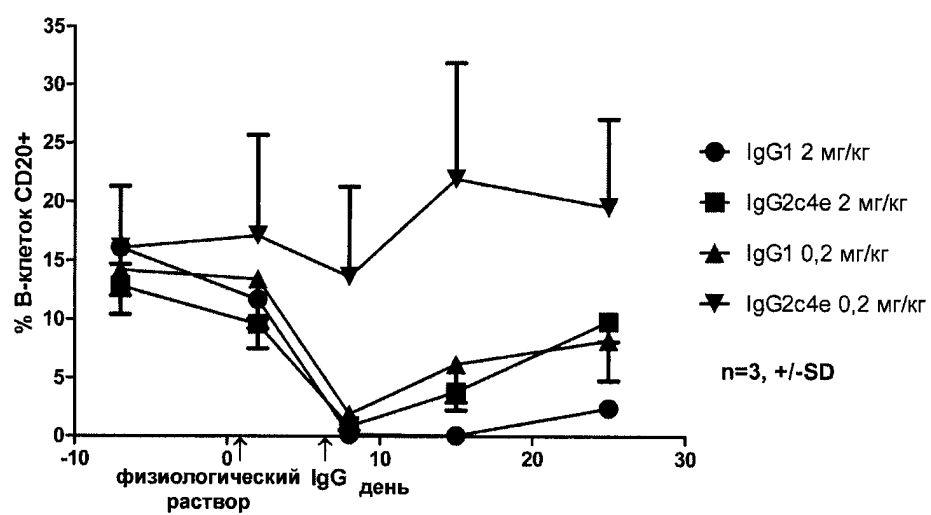
Фиг.7



Фиг.8



Фиг.9



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201890907

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 16/00, 16/28, 16/32, 2/00, C12P 21/00, 21/08, C12N 15/63, A61K 39/395

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y A	WO 2009/052439 A2 (ELAN PHARMA INTERNATIONAL LIMITED и др.) 23.04.2009, формула, таблицы 10, 11, абзацы [0079], [0226], [0236], [0277], [0278], [0359], [0382], [0421]	1-6, 8, 9, 11-22 7, 10
Y	SHIELDS ROBERT L. et al. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR. The Journal of Biological Chemistry. 2001 Mar 2; 276 (9): 6591-6604, doi: 10.1074/jbc.M009483200, таблицы I, II	1-6, 8, 9, 11-22
Y	XU DANLIN et al. In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies. Cellular Immunology. 2000 Feb 25; 200 (1): 16-26, doi.org/10.1006/cimm.2000.1617, реферат, с. 23	5

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

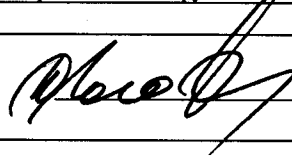
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **03/03/2020**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин