

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091760** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.11.23

(51) Int. Cl. *G01N 33/574* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.01.17

---

(54) **АНТИТЕЛО, ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ ИЛИ ЗОНД ПРОТИВ  
ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ**

---

(31) 110526

(32) 2018.01.26

(33) PT

(86) PCT/PT2019/000001

(87) WO 2019/147152 2019.08.01

(71) Заявитель:

**УНИВЕРСИДАДЕ НОВА ДЕ  
ЛИСБОА; ИНСТИТУТУ ПОРТУГЕС  
ДЕ ОНКОЛОЖИА ДО ПОРТУ  
ФГ, ЕПЕ (PT); ХЕЛЬМХОЛЬЦ-  
ЦЕНТРУМ ДРЕЗДЕН-  
РОССЕНДОРФ - ИНСТИТУТ  
ОФ РАДИОФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КЭНСЕР РИСЁРЧ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Видейра Паула Александра Кинтела,  
Нову Карлос Мануэль Мендес,  
Лорейро Лилиана Ракель Родригес,  
Карраскаль Милене Аделаиде до  
Росариу, Феррейра Жозе Александр  
Рибейру де Кастру, Палма Мариа  
Анжелина де Са, Сантос Лусио Лара,  
Лима Луис Карлос Оливейра, Чай  
Вэнан, Бахманн Михаэль (PT)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) В данном изобретении предлагается антитело или его функциональные фрагменты антитела или зонд, направленные против уникальной группы антигенов, идентифицированных в злокачественных опухолях. Настоящее изобретение включает нуклеотидные последовательности, полученные исходя из моноклонального антитела L2A5. Антитело или функциональный фрагмент антитела или зонд включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе. Этот тандем ДНК/аминокислотной последовательности уникален и никогда ранее не описывался. Настоящее изобретение также относится к антителу, или функциональному фрагменту антитела, или к конъюгату, или рекомбинантному белку, используемому для детекции, лечения и профилактики заболеваний человека, включая онкологические заболевания.

---

**A1**

**202091760**

**202091760**

**A1**

## **АНТИТЕЛО, ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ ИЛИ ЗОНД ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

В настоящем изобретении предлагается антитело или функциональные фрагменты антитела или зонд, направленные против группы антигенов, идентифицированных в злокачественных опухолях.

### **Предшествующий уровень техники**

Сиалил Tn (STn) представляет собой короткий O-гликановый антиген, дисахарид, состоящий из сиаловой кислоты, связанной с N-ацетилгалактозамином, то есть Neu5Acα-2,6GalNAc, который, в свою очередь, связан через O с остатками серина или треонина в полипептидной цепи, в альфа-конфигурации через остаток GalNAc. Его важность связана с фактом его отсутствия в нормальных здоровых тканях, и присутствием с различной частотой почти во всех видах карцином (Julien, Videira, & Delannoy, 2012). Кроме того, STn является мишенью для метастатических, устойчивых к лекарствам и высокозлокачественных опухолевых клеток. К его основным характеристикам относятся:

1) ассоциация экспрессии STn с онкогенезом и метастатической способностью злокачественных опухолевых клеток человека и клеток-инициаторов канцерогенеза (Okasaki et al., 2012),

2) корреляция STn с плохим прогнозом у пациентов, сниженной общей выживаемостью и отсутствием ответа на химиотерапию (Choi et al., 2000), и 3) уклонение от иммунной защиты (Carrascal et al., 2014).

Альфа-2,6 сиаловые кислоты обычно являются терминирующими опухолевыми биомаркерами. Короткие альфа-2,6-сиалированные O-гликаны сверхэкспрессируются при нескольких типах онкологических заболеваний. Обычно они участвуют в прогрессии злокачественной опухоли и ее метастазировании. Кроме того, они могут способствовать уклонению от иммунитета благодаря их распознаванию рядом иммунных рецепторов, таких как белки, связывающие сиаловую кислоту (Siglecs) (Crocker, Paulson, & Varki, 2007; Nicoll et al., 2003).

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает антитело, функциональные фрагменты антитела или зонды, которые специфически связываются с опухолевыми биомаркерами. Помимо специфической идентификации опухолевых клеток, эти антитела обладают потенциалом блокировать распознавание таких лигандов рецепторами клеток-хозяев, участвующих в механизме, лежащем в основе прогрессирования опухоли, включая

иммунную толерантность.

Существует релевантное количество антител, одобренных для лечения онкологических больных (<https://www.cancer.org/>). Они включают:

1. Моноклональные антитела (mAb), которые нацелены на специфические (ассоциированные) опухолевые антигены. Рекомбинантное гуманизованное анти-HER2 mAb трастузумаб (Герцептин<sup>TM</sup>), описано в различных научных публикациях, например, *Cancer Res.*, 1998, 58: 2825-2831. Оно нацелено на рецепторы HER2, экспрессируемые почти у 30% пациентов с раком молочной железы. В патенте WO0105425 описана противоопухолевая композиция, содержащая алкилирующий антрациклин, связанный с анти-HER2 антителом трастузумабом. Однако эти способы лечения доступны только для ограниченного числа пациентов (30% пациентов с раком молочной железы). Кроме того, белки HER2, на которые нацелено антитело трастузумаб, также экспрессируются в соответствующих нормальных клетках, таких как клетки сердца, что объясняет связанную с ними кардиотоксичность. Настоящее изобретение позволяет разработать рекомбинантные антитела, которые нацелены на более широкий перечень рецепторов, помимо HER2, экспрессируемых различными типами злокачественных опухолей, которые покрыты STn или группой гликанов, оканчивающихся альфа-2,6 сиаловыми кислотами. Это потенциально позволит разработать способы лечения для более широкой группы онкологических пациентов. Поскольку как STn, так и гликаны, оканчивающиеся альфа-2,6 сиаловой кислотой, сильно сверхэкспрессируются злокачественными опухолевыми клетками, то они также имеют потенциал большей специфичности и пониженной токсичности.

2. MAб, которые блокируют молекулы, останавливающие работу иммунной системы. Они называются ингибиторами иммунных контрольных точек и включают лекарственные средства, блокирующие CTLA-4, PD-1 и PD-L1. Примерами ингибиторов PD-1 являются пембролизумаб (Кейтруда) и ниволумаб (Опдиво), которые одобрены для лечения меланомы кожи, немелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи и лимфомы Ходжкина. Однако иммунные контрольные точки не обеспечивают немедленного противоопухолевого ответа и обычно используются в качестве адъювантной терапии. Кроме того, ингибиторы иммунных контрольных точек могут позволить иммунной системе атаковать некоторые нормальные органы в организме, что может привести к серьезным побочным эффектам у некоторых людей.

3. MAб, которые блокируют передачу сигналов, необходимых для деления злокачественных опухолевых клеток. К ним относятся бевацизумаб (Авастин®), нацеленный на VEGF, влияющий на рост кровеносных сосудов, и цетуксимаб

(Эрбитукс®), антитело, нацеленное на клеточный белок, называемый EGFR, который важен для роста клеток. Однако эти антитела, которые блокируют клеточную передачу сигналов, также влияют на физиологические механизмы и связаны с токсичностью, такой как высокое кровяное давление, кровотечение, образование тромбов и повреждение почек.

В некоторых патентных документах (EP 2014302 A1; WO 2015053871 A4; US 7423126 B2; EP 2993184 A1) заявляются нуклеиновые кислоты, кодирующие человеческие антитела к связанным с опухолью углеводным антигенам; однако ни одно из антител в упомянутых выше патентных документах не распознает антиген STn, который является мишенью антитела по настоящему изобретению.

В патентной заявке EP2680004 (A2) заявляются антитела против сиалированных гликанов, включая антиген STn, которые содержат N-ацетилнейраминовую кислоту (NeuAc) или N-гликолилнейраминовую кислоту (NeuGc), тогда как настоящее изобретение относится к антителу, которое в основном специфично для антигена STn главным образом с NeuAc и для группы гликанов, оканчивающихся альфа-2,6 сиаловой кислотой.

В патентных заявках WO 1998046246 A1 и WO 1995029927 A3 заявлены способы получения O-связанных гликоконъюгатов или гликозидов связанных с опухолью углеводных антигенов, которые включают 2,6-сиалиловый T-антиген. Несмотря на упоминание возможности их применения для разработки антител для лечения онкологических заболеваний, ни одна из этих патентных заявок не предлагает ни последовательности антител для обнаружения 2,6-сиалилового T-антигена, ни группы родственных 2,6-сиалил-содержащих антигенов, которые являются объектом изобретения настоящего патента.

В нескольких патентных заявках заявлены антитела, которые связывают остатки сиаловой кислоты, такие как CA 2743032 A1, которые характеризуют антитело IgM, распознающие остатки сиаловой кислоты, включая NeuGc, или US 20160184450 A1 и US 8148335 B2, в которых заявлены антитела, которые специфически связывают де-N-ацетилированную сиаловую кислоту или патентные заявки EP 2302390 A1 и US 20120142903 A1, которые включают антитела, распознающие структуру NeuGc; тогда как в настоящем изобретении заявлено антитело, которое распознает не только NeuAc, связанный с GalNAc (антиген STn), но также и структуру NeuAc в группе гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

В патентной заявке EP 2261255 A1 описано получение в цыплятах антител, распознающих моносахарид NeuAc, а в патентной заявке США 20110034676 A1 заявлено получение и очистка поликлональных антител как против структур Neu5Ac, так и Neu5Gc.

Тем не менее, в настоящем изобретении заявляются нуклеиновые кислоты, кодирующие mAb, продуцируемые у мышей, которые нацелены на олигосахаридный антиген STn и группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами. Это является преимуществом, поскольку настоящее изобретение позволит различать гликаны, ассоциированные с опухолью, а не только моносахарид NeuAc, который также экспрессируется в нормальных клетках.

Кроме того, патентная заявка US 2010/0034825 A1 заявляет о получении антител против гликопротеина MUC1 с использованием иммунизации гликопептидами с длинными tandemными повторами Tn- или STn-MUC1. Эта работа отличается от настоящего изобретения, поскольку целевая структура другая, то есть нацелена на гликопротеин MUC1, а не на гликановые структуры, STn или гликаны, оканчивающиеся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

Патентные антитела WO2016057916A1 распознают антиген STn, а не гликаны, оканчивающиеся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

Согласно вышесказанному, опухолевые антигены часто не являются опухолеспецифичными из-за их одновременной экспрессии в нормальных клетках. Следовательно, таргетная терапия обычно демонстрирует ассоциированную токсичность из-за нецелевых эффектов. Опухолевые антигены не являются пан-опухолевыми антигенами и относятся к определенным типам или степеням злокачественных опухолей. Таким образом, таргетная терапия обычно ограничивается определенными подгруппами злокачественных опухолей.

Следовательно, существует потребность в разработке антител или их функциональных фрагментов антитела или зондов, направленных против уникальной группы антигенов, идентифицированных только в злокачественных опухолевых клетках.

Уникальная последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет продуцировать антитело или его функциональные фрагменты антитела или зонд для нацеливания на сиалированные гликаны, такие как STn, 2,6-сиалил T, дисиалил T и 2,6-сиало-N-ацетиллактозамин, которые сверхэкспрессируются в различных типах и подтипах злокачественных опухолевых клеток, очень важна.

Настоящее изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим mAb против STn, и группы гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами. Эти антигены представляют собой гликаны с короткой цепью, которые сверхэкспрессируются в злокачественной опухоли, но не экспрессируются нормальными клетками. Эти антигены также являются лигандами для иммунных рецепторов и ослабляют активность иммунной системы против опухолевых

клеток, поэтому их также можно рассматривать как лиганды для иммунных контрольных точек.

### **Описание**

Моноклональное антитело (mAb) относится к антителу, которое продуцируется одним клоном В-клеток. mAb также могут продуцироваться гибридомой, которая представляет собой гибрид между В-клеткой и миеломной клеткой, или клеточными линиями, которые экспрессируют рекомбинантную ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина, и, следовательно, будут продуцировать одно единственное и специфичное антитело.

Антитела экспрессируются во внеклеточную среду, а затем очищаются из нее.

Специфичность антитела - это его способность реагировать с одним антигеном или группой антигенов, которые имеют общий эпитоп. Эпитоп, также известный как антигенная детерминанта, представляет собой часть антигена, которая распознается антителом.

Антитело относится к классу белков иммуноглобулинов и представляет собой сборку двух идентичных тяжелых цепей (~ 50-70 кДа) и двух идентичных легких цепей (~ 25 кДа). На amino-конце каждой тяжелой или легкой цепи имеется последовательность из 100-130 аминокислот, кодирующих переменную область. На карбоксильном конце каждой тяжелой или легкой цепи есть последовательность, кодирующая константную область.

Каждое антитело дважды связывает один и тот же антиген, т.е. является двухвалентным.

Антигенсвязывающий фрагмент (Fab) представляет собой фрагмент антитела, который связывается с антигенами. Каждый Fab состоит из одного константного и одного переменного домена от каждой тяжелой и легкой цепи антитела. Область кристаллизующегося фрагмента (Fc) состоит из 2 или 3 доменов карбокси-конца двух тяжелых цепей. В то время как Fab обеспечивает связывание с антигеном, область Fc гарантирует, что каждое антитело вызовет эффекторный иммунный ответ. Область Fc связывается с различными клеточными рецепторами, такими как рецепторы Fc, и другими молекулами, такими как белки комплемента, опосредуя различные физиологические эффекты, включая опсонизацию для облегчения фагоцитоза фагоцитами, лизис клеток естественными клетками-киллерами и дегрануляцию тучных клеток, базофилов и эозинофилов.

Термин «переменная область» или «переменная область» представляет собой аминоконцевую часть легкой или тяжелой цепи антитела, которая взаимодействует с

антигеном. Он имеет длину от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и от около 100 до 110 аминокислот в легкой цепи. Последовательности каждой из переменных областей существенно различаются, особенно в областях, определяющих комплементарность (CDR), ответственных за взаимодействие со специфическим антигеном. CDR фланкированы менее разнообразными каркасными областями (FR). Количество CDR в каждой из легкой и тяжелой цепей равно трем. CDR L1, L2 и L3 находятся в пределах легкой цепи. CDR H1, H2 и H3 находятся в пределах тяжелой цепи.

Выражение «функциональный антителный фрагмент или зонд» представляет собой часть антитела, которая включает переменную область тяжелой и легкой цепи антитела, или включает либо переменную область тяжелой, либо переменную область легкой цепи антитела. Функциональный антителный фрагмент или зонд сохраняет большую часть или всю связывающую активность исходного антитела, из которого был получен фрагмент или зонд. Такие функциональные фрагменты антитела или зонды могут включать одноцепочечный Fv (scFv), диатело, триатело, тетратело и минитело.

Термин «нуклеотидные последовательности» относится к последовательности нуклеотидов любой длины, будь то дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды или их аналоги.

Нуклеотидная последовательность может быть транскрибирована для получения мРНК, которая затем транслируется в полипептид и/или его фрагмент.

Возможное лечение, вытекающее из настоящего изобретения, относится к применению для лечения, ведения или облегчения заболевания, связанного с экспрессией STn или группы альфа-2,6 сиалированных гликанов. В настоящих воплощениях возможное лечение относится к антителу, функциональному фрагменту антитела или зонду, полученным по изобретению, в его нативной или модифицированной форме.

Возможное лечение также может быть включено в настоящее изобретение в комбинации с агентом, который хорошо известен тем, что полезен для или использовался или используется для лечения, контроля или облегчения заболевания.

Потенциальное применение в качестве диагностического агента относится к веществу, которое при введении объекту поможет в диагностике заболевания. Такие вещества можно использовать для обнаружения и/или определения локализации заболевания процесса, который является следствием прогрессирования заболевания. Он также включает вещество, которое может помочь предсказать реакцию на определенное лечение или прогноз заболевания. В некоторых воплощениях использование диагностического агента подразумевает конъюгацию антитела или функционального фрагмента антитела или зонда по настоящему изобретению с репортерной молекулой,

такой как флуоресценция, фермент или вторичное антитело.

Сиалил Tn, также известный как STn, сиалозил Tn, сиалированный Tn, Neu5Ac- $\alpha$ 2,6GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr или также называемый CD175 в номенклатуре «кластера дифференцировки», является простейшим сиалированным O-гликаном муцинового типа. STn представляет собой усеченный O-гликан, содержащий сиаловую кислоту (Neu5Ac)  $\alpha$ -2,6-связанную (через углерод 6) с N-ацетилгалактозамином (GalNAc) альфа-O-связанный с серином/треонином (Ser/Thr) (Neu5Ac- $\alpha$ 2,6GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr). Сиалирование предотвращает образование различных ядерных структур, которые в других случаях встречаются в O-гликанах муцинового типа.

STn ассоциируется с неблагоприятным исходом и плохим прогнозом у онкологических больных. Биосинтез антигена STn был связан с экспрессией сиалилтрансферазы ST6GalNAc1 и с мутациями или потерей гетерозиготности гена COSMC.

STn экспрессируется более чем в 80% карцином человека и связан с плохим прогнозом у онкологических больных.

Изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим тяжелую или легкую цепь антитела, или функциональный антительный фрагмент, или его зонд, причем фрагмент тяжелой или легкой цепи антитела или функциональный фрагмент антитела или зонд, кодируемый нуклеотидной последовательностью по изобретению, имеет один или несколько из CDR, перечисленных в Таблицах 1 и 2. Антитело или функциональный антительный фрагмент или его зонд, который включает одну или несколько CDR, могут специфически связываться с STn или группой альфа-2,6 сиалированных гликанов. Конкретно связывание включает специфичность, аффинность и/или avidность, как показано в Примере I.

В другом аспекте антитело или его функциональный фрагмент, кодируемый полинуклеотидами по настоящему изобретению, может включать активность комплемент-зависимой цитотоксичности и/или активность антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Способ получения антитела по настоящему изобретению может включать слияние двух клеток, продуцирующих гибридому, введение нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению в клетку-хозяин, культивирование клетки-хозяина в условиях и в течение достаточного времени для продуцирования кодируемой тяжелой и/или легкой цепи антитела или функционального фрагмента по изобретению и очистки тяжелой и/или легкой цепи антитела или функционального фрагмента.

Рекомбинантная экспрессия антитела или функционального фрагмента антитела

или его зонда по изобретению, который связывается с STn или группой альфа-2,6 сиалированных антигенов, может включать конструирование экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь антитела или функционального фрагмента антитела или зонда по изобретению.

Вектор можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Такие векторы могут также включать другие кодирующие нуклеотидные последовательности, образующие химерную последовательность. Например, может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (WO 86/05807 и WO 89/01036), обеспечивающую экспрессию химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность антитела, функционального фрагмента антитела или зонда по настоящему изобретению, за которой следует тяжелая или легкая цепь целиком, или и тяжелая и легкая цепи целиком.

Экспрессирующий вектор может быть перенесен в клетку-хозяин методами трансфекции/трансдукции, и полученные клетки продуцируют антитело или его функциональный фрагмент по настоящему изобретению. Таким образом, изобретение включает клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или функциональный фрагмент антитела или зонд по изобретению.

Клетка-хозяин может быть выбрана для модификации характеристик продукта, полученного из встроенных нуклеотидных последовательностей.

В одном воплощении эти клетки-хозяева могут добавлять сайты гликозилирования или фосфорилирования или другие модификации к кодируемым белкам. В другом воплощении клетки-хозяева могут обеспечивать правильный процессинг и перенос/секрецию белков клетками.

Варибельное антитело с одноцепочечным фрагментом (scFv) относится к функциональному антительному фрагменту, содержащему только области VL и VH, которые соединены посредством линкера, образуя сайт связывания моновалентного антигена. Диатела, триатела и тетратела представляют собой антитела, включая димеры, тримеры или тетрамеры scFv, то есть содержащие две, три и четыре полипептидных цепи соответственно и образующие два, три и четыре антигенсвязывающих сайта соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

Полученное антитело, его функциональные фрагменты или зонды по настоящему изобретению могут иметь один или несколько сайтов связывания. Если они содержат более одного сайта связывания, эти сайты могут быть идентичны друг другу или могут быть разными. В случае двух разных сайтов связывания антитело, функциональный антительный фрагмент или зонд называют «биспецифическим» антителом.

Сайт-направленный и ПЦР-опосредованный мутагенез, который приводит к заменам аминокислот, может использоваться для введения мутаций в области CDR, которые улучшают аффинность, сохраняя при этом специфичность антитела по изобретению.

В некоторых воплощениях антитело, функциональный антительный фрагмент или зонд по изобретению конъюгированы или слиты с одним или несколькими диагностическими средствами, терапевтическими средствами или любой другой искомой молекулой. Полученное конъюгированное антитело, функциональный антительный фрагмент или зонд можно использовать для мониторинга или диагностики начала, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания, связанного с экспрессией STn или альфа-2,6 сиалированных гликанов.

В качестве примера, без ограничения указанным, антитело может быть конъюгировано с терапевтическим агентом для индукции уничтожения клеток или другого эффекта. Терапевтический агент представлять собой химиотерапевтическое лекарственное средство; таксан; антимераболит, алкилирующий агент, антибиотик, антимитотический агент, гормон, аналог нуклеозида, ингибитор киназ, ион радиоактивного металла, токсин, цитокин или антиангиогенный агент.

Антитело или функциональный фрагмент по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения экспрессии STn или альфа-2,6 сиалированных гликанов в любом биологическом образце с использованием классических иммуногистологических способов или иммуноанализов, таких как иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (RIA), проточная цитометрия и иммуноблоттинг.

Антитело, функциональный антительный фрагмент или его зонд по настоящему изобретению могут быть включены отдельно, в конъюгированном виде или в комбинации в фармацевтическую композицию, предоставленную в эффективной концентрации, для получения терапевтически полезного эффекта с минимальными побочными эффектами.

### **Сущность изобретения**

настоящее изобретение обеспечивает антитело, его функциональные фрагменты антитела или зонды, которые специфически связывают сиалил Tn (STn) и группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

Антитело, функциональный фрагмент антитела или зонды связываются с сайтом связывания антигена. Примером нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельные тяжелые и легкие цепи, являются SEQ ID No. 1 и 2, соответственно.

Антитело получали после иммунизации мышей муцинами, содержащими сиалил Tn (STn). Нуклеотидные последовательности были получены из моноклонального

антитела L2A5. Одна нуклеотидная последовательность обеспечивает варибельную тяжелую цепь (VH) (SEQ ID No. 1) и включает H-CDR1 (GGCTACTCCATCACCCAGTGGTTATTAC, аминокислотная последовательность SEQ ID No. 12), H-CDR2 (ATAAACTACGACGGTAGCAAT, аминокислотная последовательность SEQ ID No. 14) и H-CDR3 (GCAAGAGGGGGGGACTAC, аминокислотная последовательность SEQ ID No. 16). Одна нуклеотидная последовательность обеспечивает варибельную легкую (VL) цепь (SEQ ID No. 2), которая включает области, определяющие комплементарность (CDR): L-CDR1 (TCAAGTGTAAGTTAC, аминокислотная последовательность SEQ ID No. 6), L-CDR2 (GACACATCC, аминокислота SEQ ID No. 8) и L-CDR3 (CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCCATGCTCACG, аминокислотная последовательность SEQ ID No. 10).

Комбинация L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 легкой цепи и H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 тяжелой цепи генерирует уникальные последовательности, которые кодируют пептидные последовательности, распознающие не только дисахаридный антиген STn, но неожиданно также распознающие группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6 сиаловыми кислотами, также сверхэкспрессируемыми злокачественными опухолями. Эти пептидные последовательности используются для создания дополнительных антител, функциональных фрагментов антитела или зондов. Эта общая группа гликанов, распознаваемых антителами, функциональными фрагментами или зондами антител, включает:

Сиалил Tn:

NeuAc $\alpha$ -6GalNAc $\alpha$ / $\beta$ 1-

2,6-сиалил T:

Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-

|

NeuAc $\alpha$ 2-6

дисиалил T:

NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-

|

NeuAc $\alpha$ 2-6

2,6-сиало-N-ацетиллактозамин:

NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-

Антитела с такой специфичностью особенно интересны из-за их высокой опухолевой специфичности и низкой или отсутствующей реактивности по отношению к нормальным клеткам, в отличие от современных антител и противоопухолевой терапии на

основе антител.

Выделенный полинуклеотид по изобретению может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует переменный домен тяжелой и легкой цепей антитела, функциональные фрагменты антитела или зонды. Примерами последовательности нуклеиновой кислоты являются SEQ ID No. 1 и 2, соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело, его функциональные фрагменты антитела или зонды, которые специфически связывают STn и группу гликанов, заканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, для применения в способе обнаружения опухоли у объекта.

В некоторых воплощениях изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, функциональные фрагменты антитела или зонды по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом воплощении изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, функциональные фрагменты антитела или зонды, которые блокируют взаимодействия клетка-клетка или рецептор-лиганд.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания у нуждающегося объекта путем введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Без намерения ограничить раскрытие в данном документе, для более легкого понимания это раскрытие представляет прилагаемые чертежи проиллюстрированных воплощений.

### **Описание чертежей**

На Фигуре 1 показаны титр и связывание антитела L2A5 с муцинами животных с использованием непрямого ELISA. Титрование антител проводили с использованием различных концентраций покрытия подчелюстных муцинов крупного рогатого скота (BSM), ранее обработанных или не обработанных сиалидазой. Фосфатный буфер использовали в качестве отрицательного контроля, а связывание анти-STn антитела B72.3 с BSM - в качестве положительного контроля. Связывание mAb L2A5 детектировали с помощью козьего антитела против мышинных IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена.

На Фигуре 2 показано связывание L2A5 с клеточной поверхностью опухолевых клеток. Связывание антитела L2A5 оценивали с помощью проточной цитометрии и с использованием линий злокачественных опухолевых клеток, трансдуцированных или не трансдуцированных (дикий тип) геном ST6GalNAc1 и, таким образом,

сверхэкспрессирующих антиген STn. На фигуре показана репрезентативная гистограмма относительного количества клеток антитела L2A5 в STn-положительной линии клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и клеток рака молочной железы MDA-MB-231 дикого типа. Использовали антитела 3F1 (антитела против STn) или вторичные FITC-конъюгированные антитела против Ig мыши (серый профиль). Для оценки специфичности связывания с сиалированными антигенами линии клеток, экспрессирующие STn, десиалировали обработкой сиалидазой. Сплошные и пунктирные линии представляют гистограммы для необработанных сиалидазой и обработанных клеток соответственно. Ось X представляет флуоресценцию, связанную с экспрессией STn.

На Фигуре 3 показана реактивность антитела L2A5 к мембраносвязанным белкам и к рекомбинантному муцину 1 человека (MUC1). Вестерн-блот-анализ связывания антител 3F1 и L2A5 против STn с мембранными экстрактами экспрессирующей STn клеточной линии MDA-MB-231 и с химерным белком MUC1, значительно покрытыми STn плюс Fc-областью человеческого Ig. Мембранные экстракты MDA-MB-231 STn + (A) и химерный белок MUC1 STn-IgG (B) окрашивали антителами 3F1 и L2A5. В дополнение к блоттингу необработанных мембранных экстрактов и химерного белка (NT) образцы мембранных экстрактов подвергали десиалированию с использованием сиалидазы (T) или использовали негликозилированный белок MUC1 STn-IgG (Ung).

На Фигуре 4 показана реактивность антитела L2A5, измеренная иммуногистохимическим методом в залитых в парафин раках мочевого пузыря, а) Окрашивание L2A5 (слева) демонстрирует высокое распространение и высокую интенсивность, в то время как mAb B72.3 (в центре) и ТКН2 (справа), которые связываются только с STn, проявляют меньшую чувствительность, трансдуцируются с низкой интенсивностью и уменьшенным распространением специфического окрашивания. б) Чувствительность L2A5 по сравнению с доступными антителами. L2A5 (слева) распознает уменьшенное количество антигена (стрелки) в отличие от B72.3 (в центре) и ТКН2 (справа), которые проявляют разную реактивность в одних и тех же областях. С) Влияние обработки сиалидазой тканей злокачественной опухоли на реактивность антител. После обработки сиалидазой и инкубации с L2A5 окрашивание, обеспечиваемое L2A5, полностью исчезает. Слева: без сиалидазы; Справа: с сиалидазой.

На Фигуре 5 показана реактивность антитела L2A5, измеренная иммуногистохимическим методом в залитых в парафин колоректальных раках. На Фигуре показана реактивность L2A5 по сравнению с антителами против антигена STn. L2A5 (слева) демонстрирует повышенную реактивность с точки зрения распространения и интенсивности по сравнению с реактивностью B72.3 (в центре) и ТКН2 (справа).

На Фигуре 6 показана реактивность антитела L2A5, полученная с помощью иммуногистохимии, в залитых в парафин раках мочевого пузыря. На фигурах показаны иммуногистохимические доказательства высокой специфичности антитела L2A5 по сравнению с анти-STn антителами B72.3 и ТКН2. а) - Опухолевая специфичность L2A5 в образце метастатического рака мочевого пузыря. L2A5 в основном присутствует в опухолевых клетках (стрелки), а не в лимфоцитах, сосудах и соединительных тканях. б) - реактивность антител L2A5 (слева) и B72.3 (справа) в нормальных колоректальных тканях. L2A5 проявляет слабую реактивность с энтероцитами (стрелка, слева), тогда как B72.3 реагирует с бокаловидными клетками (справа).

На Фигуре 7 показаны последовательности гликанового антигена, связанные с антителом L2A5. Специфичность гликанов определяли с помощью анализа на гликановом микрочипе.

На Фигуре 8 показана *in vivo* противоопухолевая способность нацеливающего модуля (Target Module, TM), состоящего из фрагмента, содержащего аминокислоты, кодируемые нуклеиновыми кислотами L2A5, объекта настоящего изобретения. TM, полученный из L2A5, представляет собой фрагмент антитела и имеет такую же реактивность, что и L2A5, то есть анти-STn TM. Уничтожение STn-положительных клеток с помощью UniCAR T-клеток было специфичным для мишени и строго зависело от присутствия TM.

На Фигуре 9 показана *in vivo* противоопухолевая способность нацеливающего модуля (TM), состоящего из фрагмента, содержащего аминокислоты, кодируемые нуклеиновыми кислотами L2A5, объекта настоящего изобретения. TM, полученный из L2A5, представляет собой фрагмент антитела и имеет такую же реактивность, что и L2A5, то есть анти-STn TM. Адаптивный перенос анти-STn TM и UniCAR T-клеток (Koristka et al 2014) в животную модель, экспрессирующую опухоли STn+, показывает эффективное и TM-зависимое уничтожение STn-положительных опухолей. На Фигуре 8 показано, что применение UniCAR T-клеток, вооруженных TM, специфичными к антигену STn, убивает опухолевые клетки. Статистический анализ проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Бонферрони (\*\*  $p < 0,01$ ).

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение обеспечивает антитело, его функциональные фрагменты антитела или зонды, которые специфически связывают STn и группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

Антитело, функциональный фрагмент антитела или зонды связываются с сайтом

связывания антигена. Примером нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные тяжелые и легкие цепи, являются SEQ ID No. 1 и 2, соответственно.

Выделенный полинуклеотид по изобретению может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует переменный домен тяжелой и легкой цепей антитела, функциональные фрагменты антитела или зонды.

Настоящее изобретение также относится к композициям для получения антитела, его функциональных фрагментов антитела или зондов, которые специфически связывают STn и группу гликанов, оканчивающуюся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами.

Композиции включают нуклеотидные последовательности, кодирующие сайт связывания антигена антитела, функционального антительного фрагмента или зондов. Композиции включают нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные тяжелые и легкие цепи.

Выделенный полинуклеотид по изобретению может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует переменный домен тяжелой и легкой цепей антитела, функциональных фрагментов антитела или зондов.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело, его функциональные фрагменты антитела или зонды, которые специфически связывают STn и группу гликанов, заканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, для применения в способе обнаружения опухоли у объекта.

В некоторых воплощениях изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело, функциональные фрагменты антитела или зонды по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом воплощении изобретение предоставляет фармацевтические композиции, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело, функциональные фрагменты антитела или зонды, которые блокируют взаимодействия клетка-клетка или рецептор-лиганд.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания у нуждающегося объекта путем введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Способ состоит из следующих стадий:

а) Окрашивание биологического образца, полученного от объекта, возможно имеющего опухоль, антителом, которое специфически связывает STn и группу гликанов,

оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, при этом упомянутое окрашивание проводится в условиях, подходящих для специфического связывания антитела или его функциональных фрагментов антитела или зондов с STn, 2,6-сиалил Т, дисиалил Т или 2,6-сиалолактозамином;

b) и при этом наличие или отсутствие связывания антитела указывает на присутствие или отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих на клеточной поверхности STn, 2,6-сиалил Т, дисиалил Т или 2,6-сиалолактозамин.

Биологический образец, при использовании в данном документе, включает выделенные клетки или белки, полученные из ткани или опухоли.

Сиалированные гликаны чрезмерно экспрессируются в нескольких типах злокачественных опухолевых клеток по сравнению с соответствующими здоровыми клетками, где их экспрессия была незначительной. Самые высокие частоты STn обнаруживаются при раке поджелудочной железы, колоректальном раке и раке яичников, где почти 100% раковых клеток экспрессируют STn (Julien et al 2012). Частота при раке мочевого пузыря составляет 75% (Ferreira et al 2005). Аденокарцинома легкого экспрессирует почти в 80% случаев, а частота при раке шейки матки, холангиокарциноме, раке пищевода, толстой кишки и молочной железы составляют от 50 до 70%. Кроме того, сверхэкспрессия STn происходит при канцерогенезе на более раннем этапе, и потеря дифференцировки клеток, которая часто участвует в классификации высокой степени гистологической дифференцировки, положительно модулирует экспрессию STn (Julien et al).

Сиалированные гликаны могут являться мишенью антитела, функциональных фрагментов антитела или зондов с высокой аффинностью и специфичностью. Настоящее изобретение также относится к композициям для получения антител, функциональных фрагментов антитела или зондов, которые связывают STn и группу гликанов, оканчивающуюся альфа-2,6 сиаловой кислотой.

Эти композиции были получены иммунизацией самок мышей Balb/c в возрасте 6 недель муцинами овечьей сыворотки с использованием способов, таких как описанные в примере I.

Сыворотку мышей, демонстрирующую реактивность в отношении STn-положительных клеточных линий, STn-положительных муцинов или клеточных лизатов, отбирали с помощью способов, таких как те, которые описаны в примерах II, III или VI. Спленоциты от этих иммунизированных мышей, демонстрирующих сыворотку с реактивностью в отношении STn, собирали и сливали с клеткой миеломы (Sp2/0) для получения иммортализованных гибридных клеток, экспрессирующих антитела.

Способы гибридной техники, такие как способ, описанный в примере IV, хорошо описаны в данной области.

Надосадочные жидкости гибридом подвергали скринингу на наличие антител против STn способами, такими как описанные в примерах II, III или VI. Отобранные гибридомы размножали для выработки антител и характеристики.

Из нескольких полученных анти-STn mAb, mAb L2A5 было выбрано в качестве ведущего кандидата и использовано для дальнейшего анализа.

Реактивность против муциновых белков с высоким содержанием STn и титр антител к L2A5 mAb определяли с использованием способов, описанных в примере II и представленных на фигуре 1. Кроме того, проводили десиамирование посредством обработки сиалидазой для оценки распознавания сиалированных структур антителом L2A5. Как показано на фигуре 1, реактивность mAb L2A5 увеличивается с увеличением концентрации mAb логарифмическим образом. Наблюдалась высокая иммунореактивность к BSM, достигающая титра конечной точки 6000. Кроме того, лечение сиалидазой четко продемонстрировало снижение реактивности этого антитела к BSM, показывая специфическое и зависимое связывание с сиалированными структурами. Примечательно, что в способах, аналогичных тем, которые описаны в примере II, но где белки муцина, несущие STn, были заменены десиамированными (асиало) муцинами, антитело L2A5 не проявляло реактивности.

Сиалированные гликаны сверхэкспрессируются в злокачественных опухолевых клетках и могут являться мишенью для антител, функциональных фрагментов антитела или зондов с высокой аффинностью и специфичностью.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции для получения антитела, функциональных фрагментов антитела или их зондов, которые связывают STn и группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6 сиаловой кислотой.

Гликозилирование имеет решающее значение для качества и разработки терапевтических mAb. Паттерны гликозилирования меняются в зависимости от выбранной системы экспрессии или условий культивирования, что существенно влияет на фармакокинетику и фармакодинамику. Следовательно, контроль гликозилирования необходим для обеспечения безопасности и эффективности молекул. Для терапевтического нацеливания на злокачественные опухолевые клетки решающее значение имеют антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и прямой апоптоз клеток.

MAb, продуцируемые в линии клеток мышинной миеломы SP2/0, могут добавлять

сахара, которые в природе не обнаруживаются в нормальном человеческом IgG, что оказывает влияние с точки зрения иммуногенности.

В одном из воплощений настоящего изобретения изменения гликанового состава молекулы IgG осуществляются в сайтах гликозилирования Asn88 и Asn297 посредством манипуляции с остатками маннозы, сиаловой кислоты, фукозы и галактозы для повышения эффективности терапевтического антитела (обзор в Liming Liu 2015).

В одном воплощении нечеловеческие антитела могут быть гуманизированы, что относится к конструированию химерных иммуноглобулинов, содержащих интересующую аминокислотную последовательность, полученную из исходного нечеловеческого антитела (например, мышинового антитела), включенного в человеческий иммуноглобулин (реципиент антитела). В гуманизированных антителах аминокислотные остатки CDR человеческого антитела заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (например, мышинового антитела), обладающих искомой специфичностью, аффинностью и емкостью. В общем, гуманизированные антитела будут содержать по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или почти все области CDR соответствуют таковым у нечеловеческого антитела, а все или часть областей FR являются таковыми человеческого иммуноглобулина.

В одном воплощении иммунные клетки, такие как Т-клетки, модифицированы для экспрессии антитела (всего или части) или рецепторов, которые связывают антитело, то есть химерных антигенных рецепторов (CAR). CAR представляют собой молекулы, которые сочетают в себе специфичность антител к искомому антигену (например, опухолевому антигену) с внутриклеточным доменом, активирующим Т-клеточный рецептор, для создания химерного рецептора, который проявляет специфическую противоопухолевую клеточную иммунную активность. В одном воплощении домен распознавания антигена этих модифицированных Т-клеток связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью. В другом воплощении оно относится к адоптивному переносу Т-клеток, модифицированных для экспрессии CAR.

CAR может быть получен с использованием множества методов, известных в данной области, включая, без ограничения указанным, использование РНК-управляемых эндонуклеаз, в частности системы Cas9/CRISPR, для специфически сконструированных Т-клеток для экспрессии CAR (WO 2014191128 A1). В другом воплощении используется нацеливающий модуль, состоящий из связывающего фрагмента, специфичного для определенного белка клеточной поверхности человека, и метки, причем метка происходит из любого ядерного белка человека, предпочтительно из ядерного белка La человека (WO2016030414 A1).

Кроме того, антитело или функциональный фрагмент по изобретению может быть связан с наночастицами, вставлен в липосомную мембрану для применения в качестве специфического вектора для доставки *in situ* токсичных соединений, вызывающих апоптоз, а также ионов металлов, полезных для гипертермической терапии.

Композиции для продуцирования антитела, его функциональных фрагментов антитела или зондов по настоящему изобретению получали путем иммунизации самок мышей Balb/c в возрасте 6 недель муцинами овечьей сыворотки с использованием способов, таких как описанные в примере I. Сыворотку мышей, демонстрирующую реактивность в отношении STn-положительных клеточных линий, STn-положительных муцинов или клеточных лизатов отбирали с помощью способов, таких как те, что описаны в примерах II, III или VI. Спленоциты от этих иммунизированных мышей, демонстрирующих сыворотку с реактивностью в отношении STn, собирали и сливали с клеткой миеломы, чтобы получить иммортализованную клетку гибридомы, экспрессирующую антитела против STn. Способы гибридомной техники, такие как способ, описанный в примере IV, хорошо описаны в данной области.

Надосадочные жидкости гибридом подвергали скринингу на наличие антител против STn способами, такими как описанные в примерах II, III или VI. Отобранные гибридомы размножали для выработки антител и характеристики.

Из нескольких полученных анти-STn mAb, mAb L2A5 было выбрано в качестве ведущего кандидата и использовано для дальнейшего анализа.

Реактивность против муциновых белков с высоким содержанием STn и титр антител L2A5 mAb определяли с использованием способов, описанных в примере II и представленных на фигуре 1. Кроме того, проводили десалирование посредством обработки сиалидазой для оценки распознавания сиалированных структур антителом L2A5. Как показано на фигуре 1, реактивность mAb L2A5 увеличивается с увеличением концентрации mAb логарифмическим образом.

Наблюдалась высокая иммунореактивность к BSM, достигающая титра конечной точки 6000. Кроме того, лечение сиалидазой четко продемонстрировало снижение реактивности этого антитела к BSM, показывая специфическое и зависимое связывание с сиалированными структурами. Примечательно, что в способах, аналогичных тем, которые описаны в примере II, но где белки муцина, несущие STn, были заменены десалированными (асиало) муцинами, антитело L2A5 не проявляло реактивности.

Связывание mAb L2A5 с жизнеспособными раковыми клетками MDA-MB-231 подтверждали с использованием способов, описанных в примере III. В качестве модели были использованы раковые клетки MDA-MB-231, экспрессирующие антиген STn, из-за

сверхэкспрессии гена ST6GalNAc1. Как показано на фигуре 2, mAb L2A5 демонстрирует высокую реактивность по отношению к 80-88% клеток STn+. Реактивность значительно снизилась после обработки линий раковых клеток сиалидазой. Как также показано на фигуре 2, L2A5 не связывается с раковыми клетками MDA-MB-231 дикого типа, которые не экспрессируют антиген STn. В совокупности эти результаты подтвердили специфичность и селективность mAb L2A5 против антигена STn, представленного на поверхности раковых клеток. Как также представлено на фигуре 2, другие антитела против STn, которые также реагируют с STn, демонстрируют небольшие отличия в профиле связывания по отношению к линии раковых клеток MDA-MB-231.

Для подтверждения специфичности связывания mAb L2A5 с мембранными белками, несущими STn, были проведены анализы, как описано в примере VI. Как показано на фигуре 3, mAb L2A5 реагировало с белками, происходящими из линии клеток MDA-MB-231, которые сверхэкспрессируют ST6GalNAc1 и, следовательно, STn. Профиль показал реактивность по отношению к белкам с молекулярной массой выше 245 кДа и приблизительно 160, 85, 50 и 40 кДа. При десиакировании мембранных белков наблюдается снижение или исчезновение реактивности, что подтверждает связывание mAb L2A5 с сиалированными белками. Мембранные белки, происходящие из раковых клеток дикого типа, которые не экспрессируют антиген STn, не обеспечивали положительной реактивности с mAb L2A5. Как показано также на фигуре 3, L2A5 продемонстрировало надежное связывание с MUC1 STn-IgG (приблизительно 180 кДа), но не с гликозилированным MUC1 STn-IgG. В совокупности результаты показывают, что mAb L2A5 распознает STn-антиген в мембранных экстрактах раковых клеток, экспрессирующих STn, а также на белках-носителях STn, таких как MUC1.

Серия из 30 случаев с 15 опухолями мочевого пузыря (восемь цистэктомий и семь метастазов) и 15 колоректальными опухолями (аденокарциномы и аденомы) были окрашены L2A5 и двумя анти-STn mAb. Как показано на фигуре 4, все опухоли мочевого пузыря были положительными для всех проанализированных mAb в отношении случаев метастазирования. Три из них были положительными, а три - отрицательными для mAb L2A5, B72.3 и TKN2. В одном случае наблюдается снижение окрашивания L2A5, а не других mAb. Обратите внимание на немного более высокую чувствительность обнаружения антигена для L2A5. Как показано на фигуре 4, в то время как TKN2 и B72.3 демонстрируют схожую реактивность, L2A5 проявляет более высокую реактивность в случаях рака мочевого пузыря. Эта специфичность и чувствительность исчезли после ферментативной обработки сиалидазой ткани злокачественной опухоли.

Как показано на фигуре 5, все случаи колоректального рака были положительны в

отношении анти-STn mAb и L2A5, но демонстрировали разные паттерны с точки зрения распространения и интенсивности. Связывание L2A5 (слева) демонстрирует аналогичную интенсивность и распространение для большинства патологических тканей (приблизительно 70%) по сравнению с картиной окрашивания B72.3 (в центре) или ТКН2 (справа).

Как показано на фигуре 6 а), в образце метастатического рака мочевого пузыря L2A5 в основном реагирует с опухолевыми клетками, а не с популяцией лимфоцитов, сосудами или соединительными тканями. На фигуре 6б) нормальные ткани колоректального рака, L2A5 (слева) демонстрирует неспецифическое окрашивание в энтероцитах, в то время как B72.3 (справа) реагирует с бокаловидными клетками.

В модели опухоли мочевого пузыря окрашивание L2A5 является исключительно опухолевым. L2A5 демонстрирует специфическое окрашивание в уротелиальных опухолевых клетках, включая дополнительные пятна в инвазивных участках и участках метастазирования с низкой плотностью STn.

В колоректальных образцах L2A5 реагирует с тканями злокачественной опухоли, но также и с непатологическими тканями. Окрашивание происходит главным образом в энтероцитах, в то время как неспецифическое окрашивание, полученное с помощью B72.3 или ТКН2, присутствует в бокаловидных клетках. В колоректальных образцах нет определенного места окрашивания, хотя L2A5 смог обнаружить присутствие слабого окрашивания в диспластической ткани с помощью L2A5.

Для более подробного изучения специфичности связывания углеводов антитела анализировали с использованием гликановых микрочипов, состоящих из структурно различных гликановых зондов, напечатанных на подходящей твердой поверхности. Результаты подтвердили специфичность с избирательным распознаванием STn, но также наблюдали связывание с:

Сиалил Tn:

NeuAc $\alpha$ -6GalNAc $\alpha$ 1/  $\beta$ 1

2,6-сиалил T:

Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-

|

NeuAc $\alpha$ 2-6

ди-сиалил T:

NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-AO

|

NeuAc $\alpha$ 2-6

2,6-сиалолактозамин:

NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1

и фактическое отсутствие связывания с последовательностями других антигенов, которые присутствовали в микрочипе. Связанные последовательности приведены на фигуре 7.

Для определения аминокислотных последовательностей CDR (SEQ ID No. 6, 8, 10, 12, 14, 16) и FR (SEQ ID No. 5, 7, 9, 11, 13, 15) переменных областей легкой и тяжелой цепей mAb L2A5 использовали способ, описанный в примере IX.

#### Примеры

Представленные ниже примеры предлагаются просто для иллюстрации различных аспектов настоящего раскрытия и никоим образом не должны толковаться как ограничивающие раскрытие. Они относятся к характеристике, отбору и получению антител.

#### ПРИМЕР I.

##### *Получение антител - Иммунизация*

Предлагаются примерные способы получения антител, но можно использовать любой другой стандартный способ.

Получение моноклональных антител (mAb) осуществляли по гибридомной технологии. Самок мышей Balb/c в возрасте 6 недель (Harlan, Великобритания) иммунизировали внутрибрюшинно 10 мкг подчелюстного муцина овцы (OSM), эмульгированного 1:1 (об/об) с помощью полного адъюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich), с последующими 2 дополнительными инъекциями OSM, эмульгированными с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma Aldrich) с интервалами 21 день. Образцы крови собирали с щек мышей, и собранную сыворотку проверяли на специфичность связывания STn с помощью ELISA. Если сыворотка показывала искомый и специфический иммунный ответ, последнюю бустер-инъекцию соответствующим мышам можно было бы провести за три дня до умерщвления и сбора селезенки.

#### ПРИМЕР II.

##### *ELISA*

Титрование сыворотки мышей и скрининг надосадочной жидкости гибридом определяли с помощью ELISA против бычьего подчелюстного муцина (BSM), белка, экспрессирующего STn. Лунки 96-луночного планшета покрывали 50 мкл BSM (3 мкг/мл), растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), и инкубировали в течение ночи при 4°C. Для оценки специфического связывания отобранных надосадочных жидкостей гибридом с сиалированными структурами, 50 мкл сиалидазы из Clostridium

perfringens (Roche) в концентрации 25 мЕд/мл, разбавленной буфером для сиалидаз (10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 6,0), добавляли к подмножеству лунок и инкубировали 90 мин при 37°C. После обработки сиалидазой планшеты трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (PBS-T), с последующей блокировкой 5% сухим обезжиренным молоком в течение 60 мин. После промывок PBS-T в лунки добавляли разбавленную сыворотку мыши или надосадочные жидкости гибридом и инкубировали в течение 90 мин. Планшеты промывали четыре раза PBS-T с последующей инкубацией с козым антителом против мышинных Ig, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (1: 1000) (BD Pharmingen), в течение 60 минут. После трех дополнительных стадий промывки в каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата тетраметилбензидина (ThermoFisher Scientific), планшеты инкубировали в темноте и реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на считывающем устройстве для микропланшетов. Мышь, продуцирующая самый высокий титр представляющих интерес антител, была выбрана для слияния. Для скрининга выработки антител гибридомными клетками применялась та же процедура.

### ПРИМЕР III.

#### *Подготовка и анализ проточной цитометрии*

Связывание антител или надосадочных жидкостей гибридом определяли с помощью проточной цитометрии с использованием линий клеток мочевого пузыря и молочной железы человека, стабильно экспрессирующих STn и не экспрессирующих STn родительских клеток. Приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток собирали для каждого условия и ресуспендировали в буфере PBS. Для оценки специфического связывания отобранных надосадочных жидкостей гибридом и антител с сиалированными структурами образцы обрабатывали сиалидазой в концентрации 100 мЕд/мл в течение 90 минут при 37°C. После обработки сиалидазой клетки промывали и инкубировали в течение 30 мин при 4°C с анти-STn mAb B72.3, 3F1, TKN2 и надосадочными жидкостями гибридом. Проводили последующие стадии промывки, и детектировали первичные антитела с помощью антитела против мышинных Ig, конъюгированного с FITC (Dako; разведение 1:10) в течение 15 минут в темноте. После промывания данные для каждого образца получали с использованием проточного цитометра.

### Пример IV.

#### *Получение антител - гибридомная технология*

Спленоциты иммунизированной мыши смешивали с клетками миеломы Sp2/0 (ATCC, США) в соотношении 3:1 и сливали в присутствии полиэтиленгликоля/диметилсульфоксида, используя стандартный протокол. Затем клетки

высеивали в 96-луночные микропланшеты с плоским дном (Orange Scientific) и поддерживали в среде RPMI с добавлением НАТ ( $1 \times 10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \times 10^{-7}$  М аминоптерин,  $1,6 \times 10^{-5}$  М тимидин, Sigma. -Aldrich), 10% FBS, 2 мМ L-глутамина, 0,2 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 1% (об./об.) незаменимых аминокислот MEM (Gibco) и инкубировали при 37°C в течение 7-12 дней. Клетки гибридомы, продуцирующие антитела, реактивные к BSM, размножали и подвергали скринингу с помощью непрямого ELISA и клонировали способом предельного разведения не менее трех раз для получения стабильных линий клеток с единичными клонами. Отобранные гибридомы культивировали в селективной среде без добавления НАТ при 37°C. Одну гибридому L2A5, специфичную к сиалированным структурам, в частности STn, отбирали и клонировали путем четырехкратного предельного разведения.

#### ПРИМЕР V

##### *Иммуногистохимический анализ экспрессии STn*

В соответствии с местным этическим комитетом, получили серию из 30 случаев с 15 колоректальными опухолями (аденокарциномами и аденомами) и 15 опухолями мочевого пузыря (восемь цистэктомий и семь метастазов). Кроме того, включили пять случаев нормальной колоректальной ткани, прилегающей к опухоли. Фиксированные в формалине, залитые парафином ткани (FFPE) подвергали скринингу на STn иммуногистохимией (ИНС) с использованием системы биотин/стрептавидин. Вкратце, срезы тканей FFPE депарафинизировали с помощью ксилола, регидратировали с помощью серии градиентных промывок спиртом и подвергали индуцированному нагреванию извлечению антигена с использованием цитратного буфера pH 6,0 (Vector, Берлингейм, США) в течение 15 минут в микроволновой печи после предварительного нагревания раствор при максимальной мощности в течение 5 минут. Срезы инкубировали с 0,3% перекисью водорода (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) в течение 25 минут, блокировали UV Block® (Thermo Scientific, Фремонт, США) и инкубировали в течение ночи при 4°C во влажной камере с анти-STn mAb B72.3, ТКН2 (Kjeldsen et al., 1988) и L2A5. После промывания PBS-Tween к срезам ткани перед инкубацией со стрептавидином добавляли вторичные антитела. STn визуализировали путем инкубации с 3,3'-диаминобензидином (ImmPACT™ DAB) (Vector, Берлингейм, США) в течение 4 мин. Наконец, ядра контрастно окрашивали гематоксилином в течение 1 мин. Экспрессию STn оценивали с использованием надосадочной жидкости культуры гибридомы против STn B72.3, ТКН2 и L2A5, разведенной 1: 5; 1: 5 и 1: 3 в 5% BSA в PBS, соответственно. Положительные и отрицательные контрольные срезы тестировались параллельно. Срезы отрицательного контроля выполняли без первичных антител. STn+ опухолевые ткани

использовали в качестве положительного контроля. Опухоли классифицировали как положительные, когда иммунореактивность анти-STn антитела ТКН2 наблюдали по микроскопическому присутствию коричневого хромогенного продукта в опухолевых клетках. Экспрессию STn и окрашивание L2A5 оценивали двойным слепым методом двумя независимыми наблюдателями и подтверждали опытным патологом. При возникновении разногласий стекла проверяли, и достигали консенсус. Для оценки специфичности антитела после инкубации с перекисью водорода проводили обработку сиалидазой, при которой сиаловые кислоты удаляются из антигена STn, тем самым нарушая распознавание антителом. Поэтому положительное окрашивание после этой ферментативной обработки (4 часа при 37°C; 0,2 Ед/мл) считалось неспецифическим.

#### ПРИМЕР VI.

##### *Вестерн-блоттинг (WB)*

Мембранные белки выделяли из клеточных линий с использованием наборов для экстракции мембранных белков в соответствии с инструкциями производителя. Количество полученного белка оценивали с помощью наборов для анализа белков в соответствии с рекомендациями производителя. Экстракты мембранных белков (50 мкг) или очищенные белки, содержащие STn (1 мкг) - BSM и MUC1 STn-IgG-, денатурировали и наносили на 8% градиентный акриламидный гель, подвергали электрофорезу в SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и электрофоретически переносили на поливинилидендифторидные (PVDF) мембраны (Amersham Hybond P 0,2 мкм PVDF, GE Healthcare Life Sciences) в соответствии со стандартными процедурами. Мембраны блокировали 10% сухим обезжиренным молоком в TBS Tween 0,1% (TBS-T) в течение 1 часа с последующей инкубацией с надосадочной жидкостью с первичными анти-STn антителами B72.3, 3F1 или L2A5, разведенным в TBS-T, в течение ночи при 4°C. После промывания TBS-T меченые белки выявляли с использованием конъюгированных с HRP козьих антител против мышиных Ig, разведенных 1: 2500 в TBS-T в течение 1 часа. После промывки меченые белки выявляли с помощью субстрата для вестерн-блоттинга Lumi-Light (Roche), с последующим экспонированием на рентгеновской пленке.

#### ПРИМЕР VII.

##### *Выделение мРНК и синтез кДНК*

Для выделения РНК использовали от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  клеток гибридомы. Клетки центрифугировали 5 мин при  $300 \times g$  и отбрасывали надосадочную жидкость. Осадок клеток промывали PBS и общую РНК выделяли с использованием набора для минипрепаративного выделения общей РНК млекопитающих GenElute™ (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. Суммарную экстрагированную РНК

определяли количественно с помощью Nanodrop, и до 2 мкг использовали для обратной транскрипции, как описано в наборе для транскрипции кДНК в больших объемах (Applied Biosystems). Синтез кДНК осуществляли с использованием следующих условий амплификации: 25°C в течение 10 минут, затем 37°C в течение 120 минут и 85°C в течение 5 секунд. В конце реакции выдерживали и охлаждали до 4°C.

#### ПРИМЕР VIII.

##### *Секвенирование антител - фрагменты scFv*

Вариабельные домены тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей L2A5 mAb амплифицировали из кДНК с использованием пары праймеров VH-прямой (TTTTTGGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG)/VH-обратный (ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGATT) и VL-прямой (TTTTTGAATTCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA)/VL-обратный (TTTTTGGGCCCGGATACAGTTGGTGCAGCATC). Все ПЦР выполняли с помощью набора для ПЦР Advantage HF 2 (Clontech). Использовали следующие условия амплификации: начальное плавление при 94°C в течение 3 минут, затем 95°C в течение 45 секунд, 70°C в течение 1 минуты и 68°C в течение 2 минут. Затем реакции выдерживали при 68°C в течение 5 минут и охлаждали до 4°C. Очищенные продукты ПЦР дополнительно клонировали в клонирующий вектор pGEM-Teasy (Promega) в соответствии с протоколами производителя. Плазмиды выделяли с использованием набора QIAGEN plasmid plus midi (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование выполняли в SeqLab (Геттинген, Германия) с использованием праймера промотора T7 для вектора pGEM-Teasy.

Эти композиции можно производить с постоянным качеством для клинических и диагностических применений.

#### ПРИМЕР IX.

##### *Домены антител*

Нуклеотидные последовательности вариабельной тяжелой (VH) и легкой цепи (VL), кодирующие аминокислотные последовательности доменов FR и CDR из L2A5 mAb, определили при поиске в системе картирования V доменов IMGT (международная база данных ImMunoGeneTics; <http://imgt.cines.fr>) с помощью инструмента анализа последовательности IgBLAST.

#### Пример X

##### *Клонирование нуклеиновых кислот в целевой модуль*

Анти-STn нацеливающий модуль (TM) получали, как описано (Cartellieri et al, 2016), но заменяя области CDR нуклеотидными последовательностями из LA25.

Опосредованное Т-клетками уничтожение опухолей измеряли с помощью стандартных анализов высвобождения хрома. Клеточные линии MDA-MB-231 и MCR STn + инкубировали с Т-клетками, в которые был внедрен либо контрольный вектор (основная цепь вектора, кодирующая только маркерный белок EGFP), либо конструкция UniCAR Stop (без внутриклеточных сигнальных доменов), либо сигнальная конструкция  $\alpha$ -E5B9 (UniCAR 28/ $\zeta$ ) (Mitwasi 2017). Обе клеточные линии культивировали с соответствующими генетически сконструированными Т-клетками в присутствии или в отсутствие 80 нМ анти-STn ТМ (a-STn ТМ) в течение 24 часов в соотношении эффектор-мишень (Е: Т) 5:1.

#### Пример XI

##### *Противоопухолевая активность in vivo*

Клетки MDA-MB-231 STn трансдуцировали для экспрессии люциферазы светлячка (Luc), в результате чего получали клетки MDA-MB-231 STn-Luc. Анти-STn нацеливающий модуль (ТМ) выполняли, как описано (Cartellieri et al, 2016), но заменяя области CDR нуклеотидными последовательностями из LA25. На мышь  $1,5 \times 10^6$  опухолевых клеток смешивали с  $1 \times 10^6$  UniCAR 28/ $\zeta$  Т-клеток и 10 мкг анти-STn ТМ. Клетки MDA-MB-231 STn-Luc ( $1,5 \times 10^6$ ) отдельно или в смеси с  $1 \times 10^6$  UniCAR 28/ $\zeta$  Т-клеток без ТМ использовали в качестве необработанных контролей. Соответствующую смесь вводили подкожно самкам мышей NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu, в результате чего получали три группы животных, каждая из которых состояла из пяти мышей. Люминесцентную визуализацию анестезированных мышей проводили через 10 минут после в.б. инъекции 200 мкл калиевой соли D-люциферина (15 мг/мл), начиная с 0 дня и затем в 1, 3, 6 и 8 день.

В настоящем изобретении предлагаются новые продукты как на рынке антител, так и в области НИОКР в онкологии.

Данное изобретение обеспечивает композиции для получения антитела или его функциональных фрагментов антитела или зондов, направленных против группы антигенов, идентифицированных при онкологических заболеваниях.

В таблице 1 показан пример нуклеотидной последовательности варибельной тяжелой (VH) и варибельной легкой (VL) цепей клона L2A5, идентифицированных как SEQ ID NO. 1 и 2, соответственно, и кодируемая аминокислотная последовательность варибельной тяжелой (VH) и варибельной легкой (VL) цепей, идентифицированной как SEQ ID No. 3 и 4, соответственно.

Таблица 1: Пример нуклеотидной последовательности и кодируемой аминокислотной последовательности вариабельной легкой (VL) и вариабельной тяжелой (VH) цепей клона L2A5.

<b>SEQ ID No.</b>	<b>Цепь (мю)</b>
1	Нуклеотидная последовательность вариабельной тяжелой (VH) цепи
2	Нуклеотидная последовательность вариабельной легкой (VL) цепи
3	Аминокислотная последовательность VH цепи
4	Аминокислотная последовательность VL цепи

Таблица 2 демонстрирует кодируемую аминокислотную последовательность шести каркасных областей (FR) и шести определяющих комплементарность областей (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) для клона L2A5, идентифицированных как нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 5-16.

Таблица 2: Кодируемая аминокислотная последовательность трех каркасных участков (FR) и трех определяющих комплементарность областей (CDR) (H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) для клона L2A5.

<b>SEQ ID No.</b>	<b>Область</b>
5	Аминокислотная последовательность L-FR1
6	Аминокислотная последовательность L-CDR1
7	Аминокислотная последовательность L-FR2
8	Аминокислотная последовательность L-CDR2
9	Аминокислотная последовательность L-FR3
10	Аминокислотная последовательность L-CDR3
11	Аминокислотная последовательность H-FR1
12	Аминокислотная последовательность H-CDR1
13	Аминокислотная последовательность H-FR2
14	Аминокислотная последовательность H-CDR2
15	Аминокислотная последовательность H-FR3
16	Аминокислотная последовательность H-CD3

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, функциональный фрагмент антитела или зонд, отличающиеся тем, что указанное антитело, функциональный фрагмент антитела или зонд происходят из моноклонального антитела L2A5 и специфически связывают STn и группу гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, которые ориентируются на переменные домены легкой и тяжелой цепей, каждый из которых включает области, определяющие комплементарность, где:

а) L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 легкой цепи имеют SEQ ID No. 6, 8 и 10, соответственно;

б) H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 тяжелой цепи имеют SEQ ID No. 12, 14 и 16, соответственно.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что группа гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, включает STn, 2,6-сиалил T или ди-сиалил T или 2,6-сиалолактозамин.

3. Антитело по предыдущим пунктам, отличающееся тем, что антитело, функциональный фрагмент антитела или зонд являются химерными или гуманизированными.

4. Антитело по предыдущим пунктам, отличающееся тем, что антитело, функциональный фрагмент антитела или зонд зависит от изменений гликана в сайтах гликозилирования.

5. Способ обнаружения опухоли у объекта с помощью антитела, функционального фрагмента антитела или зонда, определенных в пп. 1-4, отличающийся тем, что способ включает следующие стадии:

а) окрашивание биологического образца, полученного из объекта, возможно имеющего опухоль, с помощью кодируемого нуклеотидными последовательностями антитела, которое специфически связывается с STn и группой гликанов, оканчивающихся альфа-2,6-связанными сиаловыми кислотами, при этом упомянутое окрашивание проводят в условиях, подходящих для специфического связывания антитела или его функциональных фрагментов или зондов, кодируемых указанными кодирующими нуклеотидными последовательностями, STn, 2,6-сиалил T, дисиалил T или 2,6-сиалолактозамин;

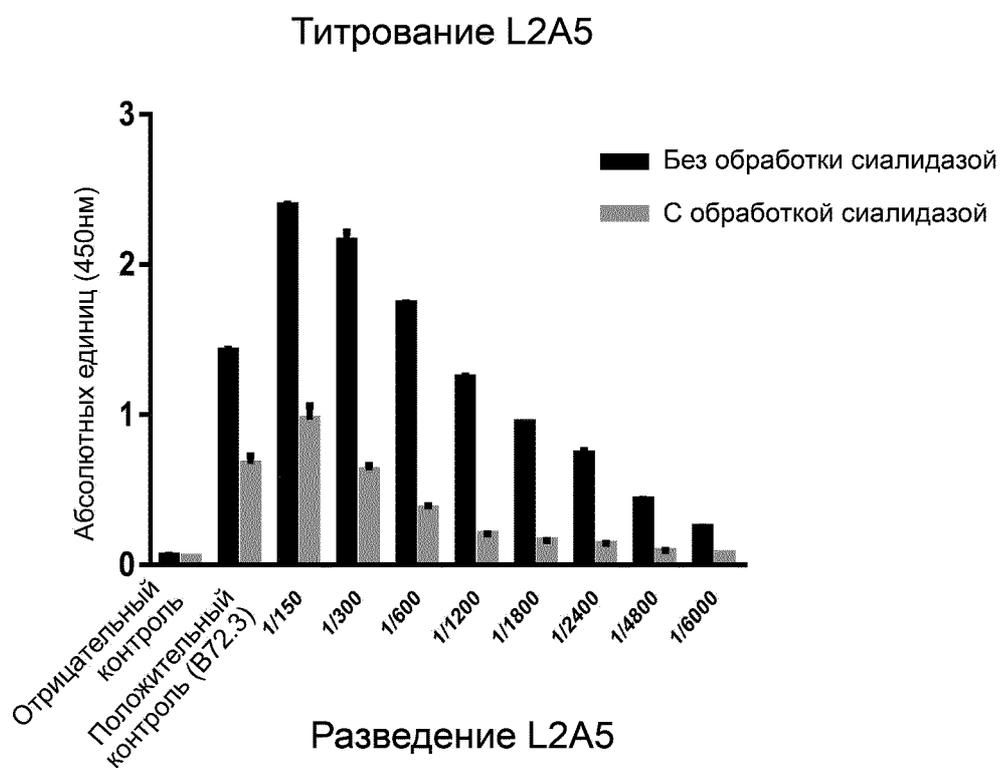
б) и где наличие или отсутствие связывания антитела, кодируемого нуклеотидными последовательностями, указывает на присутствие или отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих на клеточной поверхности STn, 2,6-сиалил T,

дисиалил Т или 2,6-сиалолактозамин.

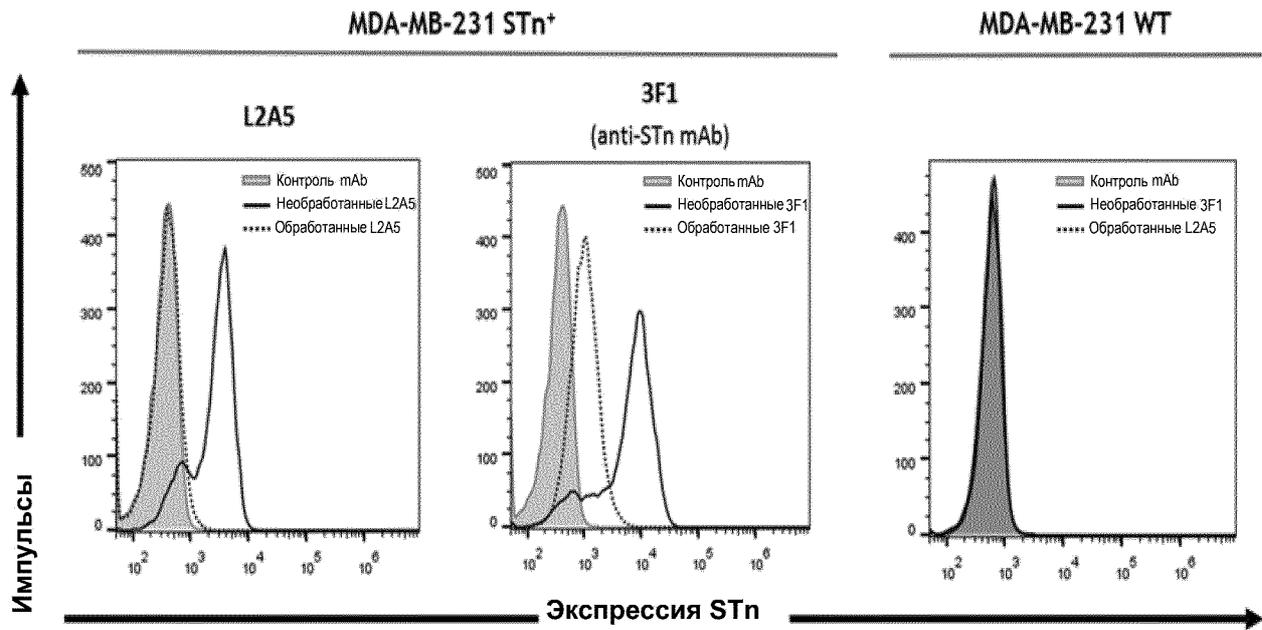
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что биологический образец включает выделенные клетки или ткани, или белки, происходящие из опухоли.

7. Применение антитела, функционального фрагмента антитела или зонда по пп. 1-4, отличающееся тем, что их применяют для лечения опухолей.

8. Фармацевтическая композиция, включающая антитело, функциональный фрагмент антитела или зонд по пп. 1-4, отличающаяся тем, что она дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

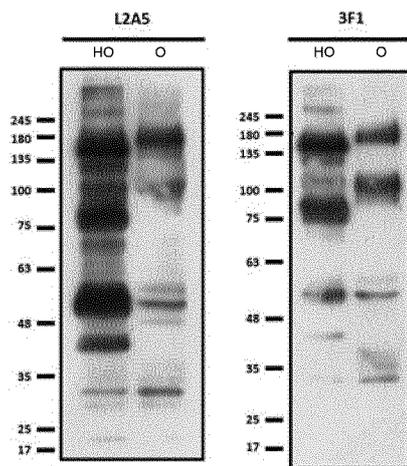


Фиг. 1



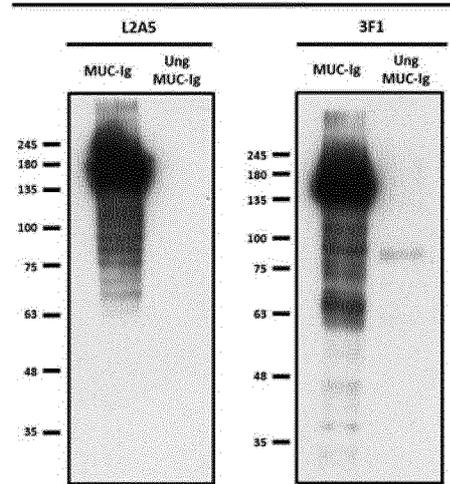
Фиг. 2

А

Мембранные экстракты MDA STn<sup>+</sup>

В

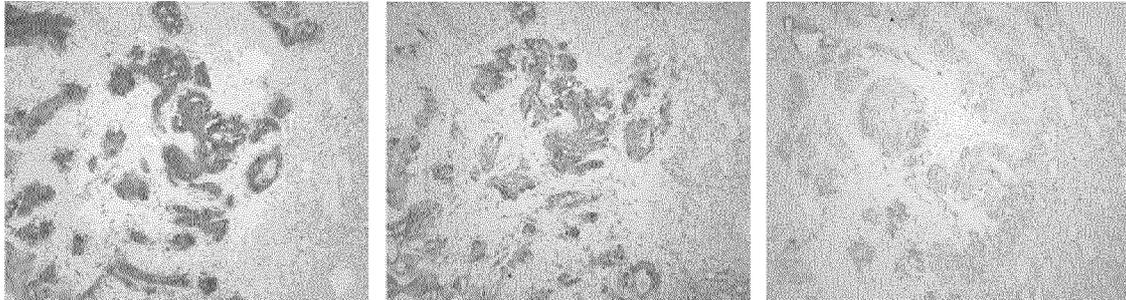
MUC1 STn-IgG



Фиг. 3

# Фиг. 4

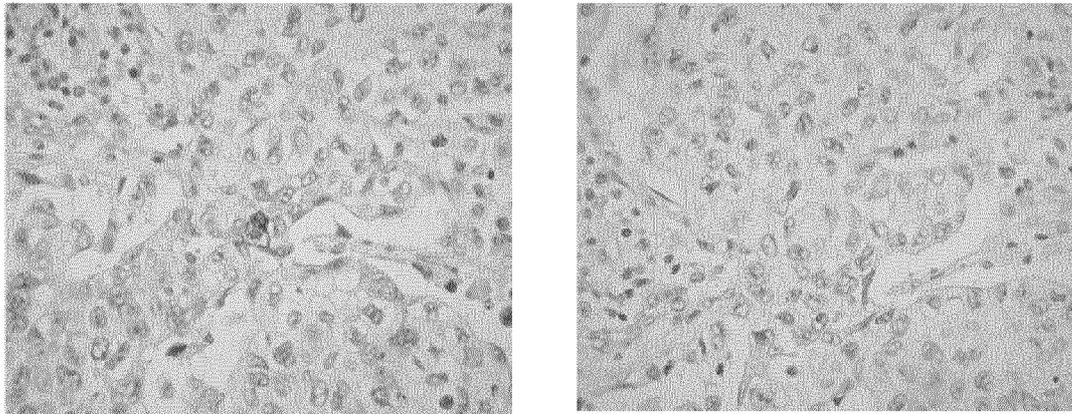
a)



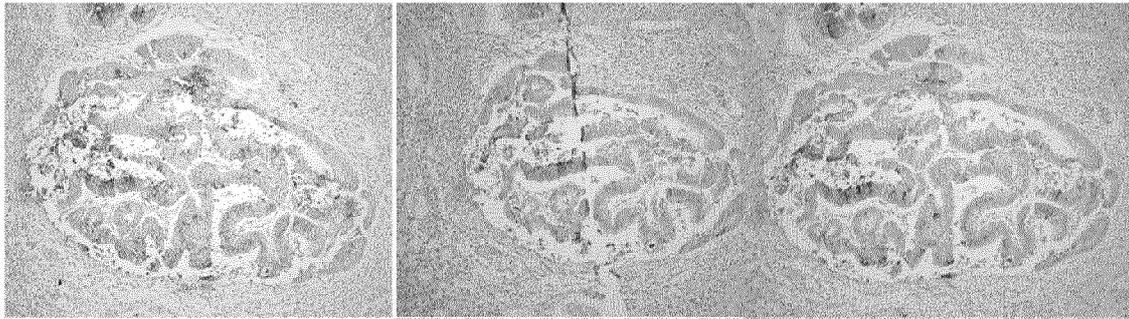
b)



c)

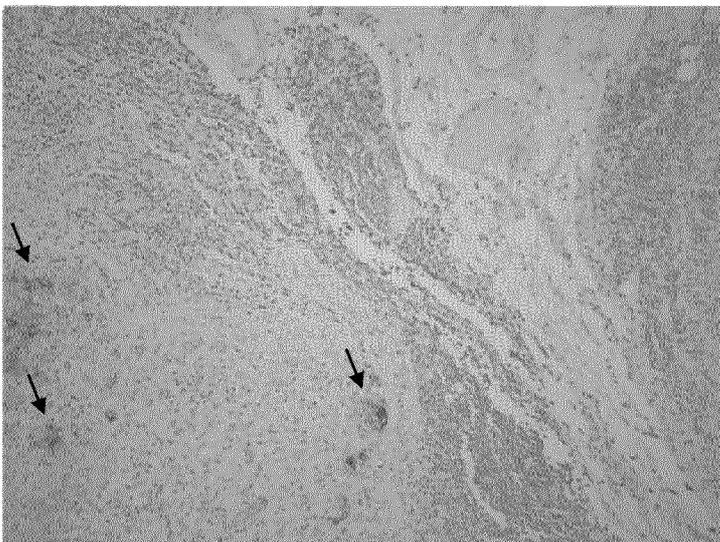


ФИГ. 5

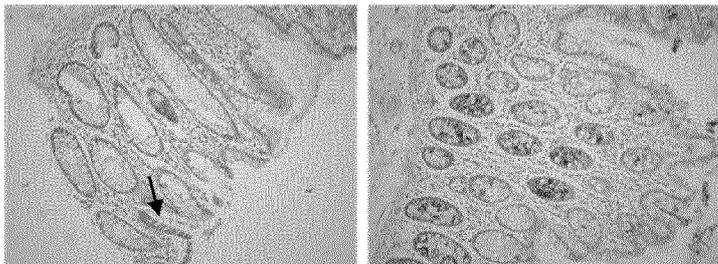


# ФИГ. 6

a)



b)



## Фиг. 7

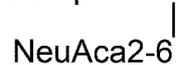
Сиалил Тn:



2,6-сиалил Т:



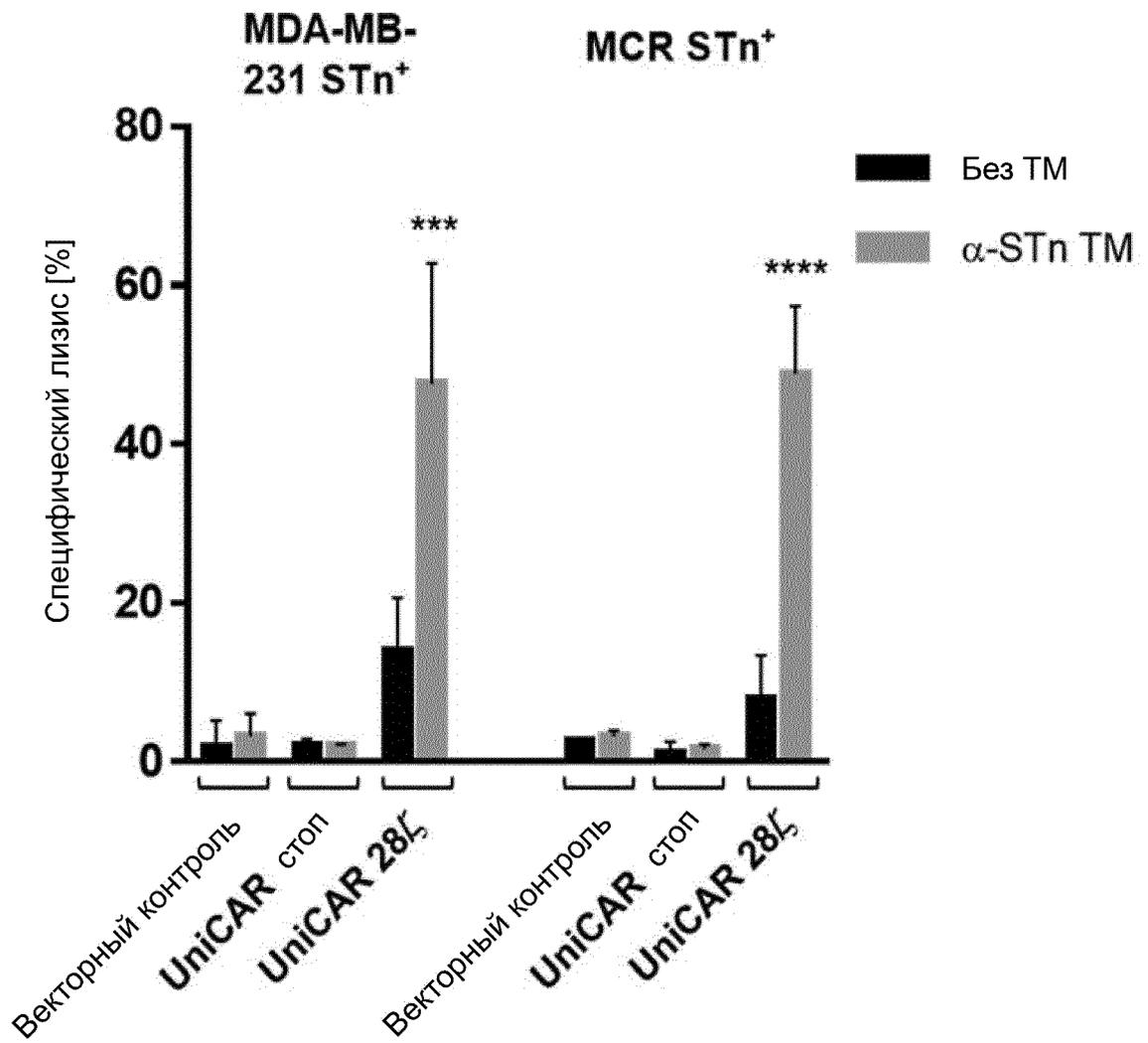
дисиалил Т:



2,6-сиалолактозамин:



Фиг. 8



Фиг. 9

