

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036904

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.13

(21) Номер заявки
201891445

(22) Дата подачи заявки
2016.12.14

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С TNF-АЛЬФА

(31) 1522394.4

(32) 2015.12.18

(33) GB

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/080984

(87) WO 2017/102833 2017.06.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Адамс Ральф, Бхатта Паллави, Дейв
Эмма, Хейвуд Сэм Филип, Хамфриз
Дэвид Пол, Маршалл Диана, Лайтвуд
Дэниел Джон (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2006056779
WO-A2-2008144753

(57) Изобретение относится к молекулам антител, имеющим специфичность к TNF-альфа, терапевтическому применению молекул антител и способам получения указанных молекул антител.

036904 B1

036904 B1

036904

B1

Изобретение относится к антителам, специфичным к TNF, содержащим их составам, их применению в терапии, способам экспрессии и, необязательно, к препаратам указанных антител, ДНК, кодирующим антитела, и хозяевам, содержащим указанные ДНК.

Уровень техники

Суперсемейство факторов некроза опухолей (TNF) представляет собой семейство белков, общей основной функцией которых является регулирование выживаемости и гибели клеток. Представители TNF-суперсемейства имеют общий базовый мотив, который состоит из двух антипараллельных β -складчатых листов с антипараллельными β -тяжами, образующими "рулетную" β -структуру. Другим признаком, общим для всех представителей TNF-суперсемейства, является образование гомо- или гетеротримерных комплексов. Именно эти тримерные формы представителей TNF-суперсемейства связываются и активируют специфичные рецепторы TNF-суперсемейства.

TNF α является классическим представителем TNF-суперсемейства, образуя симметричный гомотример. Нарушенная регуляция синтеза TNF α относится к ряду патологических состояний, весьма значимых с медицинской точки зрения. Например, TNF α задействован в ревматоидном артрите, воспалительных заболеваниях кишечника (включая болезнь Крона), псориазе, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), боли, эпилепсии, остеопорозе, астме, системной красной волчанке (SLE) и множественном склерозе (MS).

Известные антагонисты представителей TNF-суперсемейства являются макромолекулами и действуют путем ингибирования связывания представителя TNF-суперсемейства с его рецептором. Примеры таких антагонистов включают анти-TNF α антитела, в частности моноклональные антитела, такие как инфликсимаб (REMICADE®), адалимумаб (Humira®) и Certolizumab pegol (Cimzia®) или слитые белки растворимых рецепторов TNF α , такие как этанерцепт (ENBREL®). Они ингибируют как растворимый TNF α и его взаимодействие с TNFR1-рецептором (ответственным за воспаление), так и мембраносвязанный TNF α и его взаимодействие с TNFR2-рецептором (участвующим в иммунном ответе).

Роль TNF α в качестве ключевого фактора развития заболевания у пациентов с ревматоидным артритом (RA) хорошо известна. Фактически, анти-TNF α антитела радикально изменили схему лечения, и анти-TNF α препараты с метотрексатом в настоящий момент представляют золотой стандарт лечения пациентов с RA.

Сущность изобретения

Таким образом, в одном аспекте предложено анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи, имеющие вариабельную область, где указанная вариабельная область содержит одну, две или три CDR, независимо выбранных из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, например, где CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, и/или CDR-H3 является SEQ ID NO: 3.

Таким образом, в одном варианте осуществления CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, и CDR-H2 является SEQ ID NO: 2; или CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, и CDR-H3 является SEQ ID NO: 3; или CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, и CDR-H3 является SEQ ID NO: 3.

В одном варианте антитело или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие вариабельную область, например, содержащую одну, две или три CDR, независимо выбранных из SEQ ID NO: 4-10, в частности, где CDR-L1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 или 5, CDR-L2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, и CDR-L3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

Таким образом, в одном варианте осуществления CDR-L1 является SEQ ID NO: 4, и CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9; CDR-L1 является SEQ ID NO: 5, и CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9; или CDR-L1 является SEQ ID NO: 4 или 5, и CDR-L3 является SEQ ID NO: 10; или CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9; или CDR-L1 является SEQ ID NO: 10.

В одном варианте антитела или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1-10, например, где CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, CDR-H3 SEQ ID NO: 3; CDR-L1 является SEQ ID NO: 4 или 5, CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, и CDR-L3 является SEQ ID NO: 10.

Также предложены антитело или связывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или связывающий фрагмент, прямо описанные в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретения предложены антитело или связывающий фрагмент, которые перекрестно блокируют связывание антитела или связывающего фрагмента, прямо описанных в настоящем документе, с TNF человека, или их связывание с TNF человека перекрестно блокируется указанными антителами.

Изобретение также относится к полинуклеотиду, такому как ДНК, кодирующему антитело или фрагмент, описанные в настоящем документе, например, где ДНК встроена в вектор.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей указанный полинуклеотид.

В настоящем документе предложены способы экспрессии антитела или фрагмента, а также способы конъюгации антитела или фрагмента с полимером, таким как ПЭГ.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела и фрагменты.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, фрагмента или композиции, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, фрагмент или композицию по настоящему изобретению для применения в лечении, в частности в лечении иммунологического, аутоиммунного заболевания и/или воспалительных заболеваний, например артрита, такого как воспалительный артрит, в частности ревматоидного артрита или анкилозирующего спондилита.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны различные последовательности, относящиеся к антителам и связывающим фрагментам по настоящему изобретению.

На фиг. 2 показаны кривые титрования для CA2109 мышиных Fab (fwk18 FAB) IgG1 (fwk18 IgG).

На фиг. 3 и 4 показаны различные выравнивания последовательностей, относящихся к антителам и связывающим фрагментам по настоящему изобретению.

Подробное описание изобретения

Термин TNF, используемый в данном документе, относится к цитокину - фактору некроза опухоли-альфа, для которого аминокислотная последовательность человека приведена в UniProt под номером P01375.

Молекула антитела, используемая в данном документе, относится к антителу или его связывающему фрагменту.

Термин "антитело", используемый в настоящем документе, в общем, относится к интактным (целым) антителам, т.е. включающим в качестве составляющих две тяжелые цепи и две легкие цепи. Антитело может еще содержать дополнительные связывающие домены, например, как в молекуле DVD-Ig, описанной в WO 2007/024715, или в так называемом (FabFv)₂Fc, описанном в WO 2011/030107. Таким образом, антитело в контексте настоящего документа включает в себя би-, три- или тетравалентные полноразмерные антитела.

Связывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (т.е. полноразмерные тяжелую цепь и легкую цепь), Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, dsScFv, би-, три- или тетравалентные антитела, бис-scFv, диатела, тритела, триатела, тетратела и эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы создания и получения этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Формат Fab-Fv был впервые раскрыт в WO 2009/040562, а стабилизированная дисульфидом их версия, Fab-dsFv, была впервые раскрыта в WO 2010/035012. Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Поливалентные антитела могут иметь несколько специфичностей связывания, например они могут быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO 92/22583 и WO 05/113605). Одним примером последних является Tri-Fab (или TFM), описанный в WO 92/22583.

В одном варианте осуществления предложен Fab-фрагмент.

В одном варианте осуществления предложен Fab'-фрагмент.

Молекула типичного Fab'-фрагмента содержит пару тяжелой и легкой цепей, где тяжелая цепь содержит переменную область V_H, константный домен C_{H1} и природную или модифицированную шарнирную область, а легкая цепь содержит переменную область V_L и константный домен C_L.

В одном варианте осуществления предложен димер Fab' по настоящему изобретению, образующий F(ab')₂, например, димеризация может обеспечиваться шарнирной областью.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его связывающий фрагмент содержат связывающий домен. Связывающий домен, в общем, содержит 6 CDR - три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. В одном варианте осуществления CDR окружены каркасной областью и вместе образуют переменную область. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело или связывающий фрагмент содержат специфичный к антигену связывающий домен, содержащий переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи.

Следует иметь в виду, что одна или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, добавлений и/или делеций могут быть введены в CDR или в другие последовательности (например, переменные домены), предложенные в настоящем изобретении, без значительного изменения способности антитела связываться с TNF. Влияние каких-либо аминокислотных замен, добавлений и/или делеций может быть легко проверено специалистом в данной области техники, например, с использованием способов, описанных в настоящем документе, в частности в примерах, для определения связывания/блокирования TNF.

Кроме того, одна или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеций могут быть сделаны в каркасной области тяжелой и/или легкой цепи, исполь-

зуемой в антителе или фрагменте, предложенных в настоящем изобретении, и где аффинность связывания с TNF сохраняется или повышается.

Остатки в переменных доменах антител обычно пронумерованы в соответствии с системой, разработанной Кабатом с соавт. Эта система изложена в Rabat et al., 1987, in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Rabat et al. (supra)"). Эта система нумерации используется в настоящем описании, если не указано иное.

Нумерация остатков по системе Кабата не всегда непосредственно соответствует линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее число аминокислот или дополнительные аминокислоты, чем в точной нумерации Кабата, отражая сокращение последовательности или вставку в структурном компоненте (будь-то каркасная область или определяющая комплементарность область (CDR)) основной структуры переменного домена. Правильная нумерация остатков по системе Кабата может быть определена для данного антитела путем выравнивания гомологичных остатков в последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по системе Кабата.

CDR переменного домена тяжелой цепи соответствуют остаткам 31-35 (CDR-H1), остаткам 50-65 (CDR-H2) и остаткам 95-102 (CDR-H3) в соответствии с системой нумерации Кабата. Тем не менее, в соответствии с системой нумерации Чотии (Chothia, C. and Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)) петля, эквивалентная CDR H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, то "CDR H1" в контексте данного изобретения обозначает остатки 26 до 35, определенные комбинацией системы нумерации Кабата и топологического определения петель по Чотии.

CDR переменного домена легкой цепи соответствуют остаткам 24-34 (CDR-L1), остаткам 50-56 (CDR-L2) и остаткам 89-97 (CDR-L3) в соответствии с системой нумерации Кабата.

Антитела и фрагменты по настоящему изобретению блокируют связывание с TNF и/или сигнальный путь TNF. Блокирование в данном описании относится к физическому блокированию, такому как перекрывание рецептора, но также будет включать такие варианты, в которых указанное антитело или его фрагменты связывают эпитоп, который вызывает, например, конформационное изменение, что приводит к тому, что природный лиганд с рецептором больше не связывается. Молекулы антитела по настоящему изобретению связываются с TNF и тем самым уменьшают или предупреждают (например, ингибируют/подавляют) связывание TNF с его мишенью/рецептором.

Антитела для применения в настоящем изобретении могут быть получены с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Для получения антител, которые специфично распознают TNF, могут быть использованы полипептид/белок TNF, включая слитые белки, клетки (рекомбинантно или природно), экспрессирующие полипептид (например, активированные Т-клетки). Полипептид может представлять собой "зрелый" полипептид или его биологически активный фрагмент или производное.

Полипептиды, используемые для иммунизации хозяина, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники, из генетически модифицированных клеток-хозяев, содержащих системы экспрессии, или они могут быть выделены из природных биологических источников. В настоящей заявке термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Они используются взаимозаменяемо, если не указано иное. Полипептид TNF в некоторых случаях может являться частью более крупного белка, такого как слитый белок, например слитый с аффинной меткой или аналогичным соединением.

Если необходима иммунизация животного, антитела, вырабатываемые против полипептида TNF, могут быть получены путем введения полипептидов животному, предпочтительно любому животному, кроме человека, с использованием хорошо известных и рутинных протоколов (см., например, *Handbook of Experimental Immunology*, D.M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Многие теплокровные животные, такие как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи, могут быть иммунизированы. Однако мыши, кролики, свиньи и крысы, в общем, подходят лучше всего.

Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, таким как метод получения гибридом (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), метод получения триом, метод получения гибридом с В-клетками человека (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) и метод получения EBV-гибридом (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения в настоящем изобретении также могут быть получены с использованием способов получения антител из единичных лимфоцитов путем клонирования и экспрессии кДНК переменных областей иммуноглобулина, вырабатываемого отдельными лимфоцитами, отобранными для получения специфичных антител, например с помощью способов, описанных в Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (15):7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 и в международной патентной заявке № WO 2004/106377.

Скрининг на антитела может быть выполнен с использованием методов анализа для измерения связывания с TNF человека и/или методов анализа для измерения способности блокировать связывание TNF с рецептором. Примером анализа связывания является твердофазный ИФА (ELISA). Примеры подходя-

ших методов анализа антагонистического и блокирующего действия описаны в примерах в данном описании ниже.

Термин "специфичное", используемый в данном описании, предназначен для обозначения антитела, которое распознает только антиген, к которому оно является специфичным, или антитела, которое имеет значительно более высокую аффинность связывания с антигеном, к которому оно является специфичным, по сравнению со связыванием с антигенами, к которым оно не является специфичным, например имеет аффинность связывания по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз выше. Аффинность связывания может быть измерена с помощью таких методов, как BIAcore, описанный в настоящем документе ниже.

Аминокислотные последовательности и полинуклеотидные последовательности определенных антител по настоящему изобретению приведены и образуют аспект изобретения.

Таким образом, в одном аспекте предложено анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи, имеющие вариабельную область, где указанная вариабельная область содержит одну, две или три CDR, независимо друг от друга выбранных из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, например, где CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, CDR-H2 является SEQ ID NO: 2 и/или CDR-H3 является SEQ ID NO: 3.

Таким образом, в одном варианте осуществления CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, и CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, или CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, и CDR-H3 является SEQ ID NO: 3, или CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, и CDR-H3 является SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие вариабельную область, например, содержащую одну, две или три CDR, независимо выбранных из SEQ ID NO: от 4 до 10, в частности, где CDR-L1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 или 5, CDR L2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, и CDR-L3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения CDR-L1 является SEQ ID NO: 4, и CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, CDR-L1 является SEQ ID NO: 5, и CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, или CDR-L1 является SEQ ID NO: 4 или 5, и CDR-L3 является SEQ ID NO: 10; или CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, или CDR-L1 является SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления антитела или связывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: от 1 до 10, например, где CDR-H1 является SEQ ID NO: 1, CDR-H2 является SEQ ID NO: 2, CDR-H3 является SEQ ID NO: 3, CDR-L1 является SEQ ID NO: 4 или 5, CDR-L2 является SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, и CDR-L3 является SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, имеющую 3 CDR тяжелой цепи, и последовательность CDR-H1 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-H2 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-H3 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит легкую цепь, имеющую три CDR легкой цепи, и последовательность CDR-L1 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, последовательность CDR-L2 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, и последовательность CDR-L3 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающие фрагменты по настоящему изобретению полностью принадлежат человеку, например, являются полученными из фаговой библиотеки или аналогичным образом.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его фрагменты по настоящему изобретению являются гуманизированными.

Гуманизированные антитела (которые включают в себя антитела с пересаженными CDR) представляют собой молекулы антител, имеющих одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из антител животных и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, US 5585089, WO 91/09967). Следует иметь в виду, что может быть необходимо перенести только определяющие специфичность остатки в CDR, а не всю CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела, необязательно, могут дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков из антитела животного, из которого были взяты CDR. Последние часто называют донорными остатками.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения термин "гуманизированная молекула антитела", используемый в настоящем документе, относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепи содержат одну или несколько CDR (включая, если желательно, одну или несколько модифицированных CDR) из донорного антитела (например, антитела животного, такого как мышинное

моноклональное антитело), пересаженных в каркасную область вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, антитела человека), необязательно, дополнительно содержащую один или несколько каркасных остатков из антитела животного, из которого были получены остатки CDR (донора). Обзор см. в Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. В одном варианте осуществления изобретения в каркасную область антитела человека переносят не всю CDR, а только один или несколько определяющих специфичность остатков из любой одной CDR, описанной в настоящем документе (см., например, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). В одном варианте осуществления изобретения в каркасную область антитела человека переносят только определяющие специфичность остатки из одной или нескольких CDR, описанных в настоящем документе выше. В другом варианте осуществления изобретения в каркасную область антитела человека переносят только определяющие специфичность остатки из каждой CDR, описанной в настоящем документе выше.

При пересадке CDR или определяющих специфичность остатков можно использовать любую подходящую последовательность акцепторной каркасной области вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого взяты CDR, включая каркасные области мышей, приматов и человека.

Соответственно гуманизованное антитело по настоящему изобретению имеет вариабельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также одну или несколько CDR, предложенных в данном документе. Таким образом, в одном варианте осуществления предложено блокирующее гуманизованное антитело, которое связывается с TNF человека, где вариабельный домен содержит акцепторные каркасные области антитела человека и донорные CDR из антитела животного.

Примерами каркасных областей антитела человека, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEL, LAY и POM (Rabat et al., *supra*). Например, KOL и NEWM могут быть использованы для тяжелой цепи, REI может быть использована для легкой цепи, и ЕС, LAY и POM могут быть использованы как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. В качестве альтернативы могут быть использованы последовательности из зародышевой линии человека; они доступны по ссылке <http://www.imgt.org/>.

В гуманизованном антителе по настоящему изобретению акцепторные тяжелые и легкие цепи, необязательно, должны быть получены из одного антитела и могут, при желании, содержать составные цепи, имеющие каркасные области из разных цепей.

Одна такая подходящая каркасная область тяжелой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению получена из акцепторной каркасной области VK1 2-1(U) A20 JK2 из VH3 1-3 3-21 JH4 антитела человека (SEQ ID NO: 25 и 26 соответственно).

Соответственно в одном примере предложено гуманизованное антитело, содержащее одну или несколько CDR, выбранных из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2, и последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3, где каркасная область тяжелой цепи получена из акцепторной каркасной области VH3 1-3 3-21 JH4 антитела человека (SEQ ID NO: 26).

Соответственно в одном примере предложено гуманизованное антитело, содержащее последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3, где каркасная область тяжелой цепи получена из акцепторной каркасной области VH3 1-3 3-21 JH4 антитела человека (SEQ ID NO: 26).

В одном примере вариабельный домен тяжелой цепи антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, 16 или 28, например 12 или 16.

Подходящая каркасная область легкой цепи гуманизованного антитела по настоящему изобретению получена из акцепторной каркасной области VK1 2-1(U) A20 JK2 антитела человека (SEQ ID NO: 25).

Соответственно в одном примере предложено гуманизованное антитело, содержащее последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 или 5, для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9, для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, для CDR-L3, где каркасная область легкой цепи получена из акцепторной каркасной области VK1 2-1(U) A20 JK2.

В одном примере вариабельный домен легкой цепи антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, 15 или 27, например 11 или 15. В одном примере вариабельный домен легкой цепи антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 29.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 16 и последовательность вариабельной области легкой

цепи SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или связывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 28 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 27.

В гуманизированном антителе по настоящему изобретению каркасные области не должны иметь точно такую же последовательность, как у акцепторного антитела. Так, например, необычные остатки могут быть заменены на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи. В альтернативном варианте отдельные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть изменены таким образом, чтобы они соответствовали остатку, находящемуся в той же позиции в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения должны быть сведены к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые потенциально должны быть изменены, приведен в WO 91/09967.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков в каркасной области тяжелой и/или легкой цепи заменены альтернативными аминокислотными остатками.

Соответственно в одном примере предложено гуманизированное антитело, в котором по меньшей мере один из остатков в позициях 24, 48, 49, 71, 73, 78 и 93 вариабельного домена тяжелой цепи (нумерация по системе Кабата) является донорным остатком, см., например, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 24 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например треонином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 48 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например изолейцином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 49 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например глицином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 71 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например валином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 73 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например лизином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 78 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например аланином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 93 вариабельного домена тяжелой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например треонином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 48 представляет собой изолейцин, остаток 49 представляет собой глицин, остаток 71 представляет собой валин, остаток 73 представляет собой лизин, остаток 78 представляет собой аланин, и остаток 93 представляет собой треонин в гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи по настоящему изобретению.

Соответственно в одном примере предложено гуманизированное антитело, в котором, по меньшей мере, остатки в каждой из позиций 48, 49, 71, 73, 78 и 93 вариабельного домена тяжелой цепи (нумерация по системе Кабата) являются донорными остатками, см., например, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В одном примере предложено гуманизированное антитело, в котором, по меньшей мере, остатки в каждой из позиций 24, 48, 49, 71, 73, 78 и 93 вариабельного домена тяжелой цепи (нумерация по системе Кабата) являются донорными остатками, см., например, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28.

В одном примере предложено гуманизированное антитело, в котором один или несколько из остатков в позициях 65, 71 и 87 вариабельной области легкой цепи (нумерация по системе Кабата) являются донорными остатками, см., например, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 27.

В одном примере предложено гуманизированное антитело, в котором, по меньшей мере, остатки в каждой из позиций 65, 71 и 87 вариабельного домена легкой цепи (нумерация по системе Кабата) являются донорными остатками, см., например, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 65 вариабельного домена легкой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например треонином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 71 вариабельного домена легкой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например тирозином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 87 вариабельного домена легкой цепи заменен альтернативной аминокислотой, например фенилаланином.

В одном варианте осуществления изобретения остаток 65 представляет собой треонин, остаток 71 представляет собой тирозин, и остаток 87 представляет собой фенилаланин в гуманизированной вариабельной области легкой цепи по настоящему изобретению.

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
 лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
 аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);
 аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и
 цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи). Степени идентичности и подобия можно легко вычислить (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программное обеспечение BLAST™ доступно в NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

Молекулы антител по настоящему изобретению могут содержать полноразмерную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или ее фрагмент, и могут представлять собой, но не ограничиваются ими, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH) , scFv, dsScFv, би-, три- или тетравалентные антитела, бис-scFv, димеры, тритела, тетратела и эпитопсвязывающие фрагменты любой из указанных выше молекул (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews -Online 2(3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в международных патентных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Поливалентные антитела могут включать несколько специфичностей связывания, например могут являться биспецифичными, или могут быть моноспецифичными (см., например, WO 92/22853, WO 05/113605, WO 2009/040562 и WO 2010/035012).

В одном примере осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифичному антителу, содержащему любое из анти-TNF антител или их связывающих фрагментов, описанных в данном документе. Полиспецифичное антитело может иметь любой подходящий формат антитела, который способен связывать два или несколько антигенов. Примеры полиспецифичных форматов антител известны в данной области и могут включать и могут быть выбраны, например, из одноцепочечного дитела, тритела, tandemного scFv, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsScFv, Fab-(dsScFv)₂, FabFvFv, FabFvFc, diFab, diFab', тритела, tandemного scFv-Fc, scFv-Fc-ScFv, одноцепочечного дитела-Fc, одноцепочечного дитела-CH3, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, дуотела и DVD-Ig. В одном примере полиспецифичное антитело представляет собой дисульфидно стабилизированное антитело, описанное в WO 2015/197772.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена полиспецифичная молекула антитела в виде димера, содержащего или состоящего из:

a) полипептидной цепи по формуле (I)

$V_{H1}-C_{H1}-X-V_1$; и

b) полипептидной цепи по формуле (II)

$V_{L1}-C_L-Y-V_2$;

где

V_{H1} представляет собой переменный домен тяжелой цепи;

C_{H1} представляет собой домен константной области тяжелой цепи, например ее домен 1;

X представляет собой связь или линкер;

Y представляет собой связь или линкер;

V_1 представляет собой dsFv, sdAb, scFv или dsScFv;

V_{L1} представляет собой переменный домен легкой цепи;

C_L представляет собой домен из константной области легкой цепи, такой как C-каппа;

V_2 представляет собой dsFv, sdAb, scFv или dsScFv;

где V_{H1} и V_{L1} вместе образуют связывающий домен, специфичный к первому антигену, а каждый из V_1 и V_2 связывают второй и третий антиген соответственно, и где по меньшей мере одним из антигенов является TNF.

В одном примере молекула антитела представляет собой scFv, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21.

В одном примере молекула антитела содержит одну или несколько молекул scFv, содержащих последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 15 и 16, и/или последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент антитела, содержащие переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 11 и 12, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент антитела, содержащие переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 15 и 16, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент антитела, содержащие переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 27 и 28, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

Следует иметь в виду, что молекулы scFv и Fab по изобретению могут быть включены в любую подходящую полиспецифичную молекулу антитела, описанную в настоящем документе выше, например в полиспецифичную молекулу антитела, имеющую формулу I и II выше.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG1, содержащее переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 11 и 12, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG1, содержащее переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 15 и 16, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG1, содержащее переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 27 и 28, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерный IgG4-формат. В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерный IgG4P-формат.

В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело IgG4 или IgG4P, содержащее переменные области, приведенные в SEQ ID NO: 11 и 12, например, для легкой и тяжелой цепи соответственно.

Термин IgG4P, используемый в данном описании, описывает мутацию дикого типа IgG4-изотипа, где 241-я аминокислота заменена на пролин, см., например, замену серина в позиции 241 на пролин, описанную в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30(1), 105-108.

В одном варианте осуществления изобретения предложено антитело по настоящему изобретению в виде белка, слитого со связывающим TNF антителом, который содержит иммуноглобулиновый фрагмент, например Fab- или Fab'-фрагмент, и один или два однодоменных антитела (dAb), связанных с ними напрямую или непрямо, например, как описано в WO 2009/040562, WO 2010035012, WO 2011/030107, WO 2011/061492 и WO 2011/086091, которые все включены в настоящее описание путем ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения слитый белок включает два доменных антитела, например, в виде пары переменной тяжелой (VH) и переменной легкой (VL) областей, необязательно, связанных дисульфидной связью.

В одном варианте осуществления изобретения Fab- или Fab'-фрагмент в слитом белке имеет одинаковую или аналогичную специфичность с однодоменным антителом или антителами. В одном варианте осуществления изобретения Fab- или Fab'-фрагмент имеет различную специфичность с однодоменным антителом или антителами, то есть слитый белок является поливалентным. В одном варианте осуществления поливалентный слитый белок по настоящему изобретению имеет сайт связывания альбумина, например, VH/VL-пара в нем обеспечивает сайт связывания альбумина.

В одном варианте осуществления Fab или Fab' по настоящему изобретению конъюгированы с молекулой ПЭГ или сывороточного альбумина человека.

Домены константной области молекулы антитела по настоящему изобретению, если присутствуют, могут быть выбраны с учетом предлагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константной области могут представлять собой домены IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В частности, могут быть использованы домены константной области IgG человека, в особенности, из изотипов IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей, и необходимы эффекторные функции антитела. В качестве альтернативы могут быть использованы изотипы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей, и не требуются эффекторные функции антитела. Следует понимать, что также могут быть использованы варианты последовательности этих доменов константной области. Например, могут использоваться молекулы IgG4, в которых серин в 241-й позиции заменен на пролин, как описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Также специалисту в данной области техники будет понятно, что антитела могут претерпевать различные посттрансляционные модификации. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, используемой для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать в себя изменения в гликозилировании, окислении метионина, образовании diketопиперазинов, аспаргатиновой изомеризации и деамидировании аспарагина. Частой модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (например, лизина или аргинина) вследствие действия карбоксипептидазы (как описано в Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Соответственно C-концевой лизин тяжелой цепи антитела может отсутствовать.

В одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, например последовательность CH1, представленную в SEQ ID NO: 34, а легкая цепь антитела содержит домен CL, каппа или лямбда, например последовательность CL, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит полноразмерную константную область, содержащую домены CH1, CH2 и CH3, например последовательность константной области гамма-1, представленную в SEQ ID NO: 35, или последовательность константной области гамма-4, представленную в SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, а легкая цепь антитела содержит домен CL, каппа или лямбда, например последовательность CL, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном варианте осуществления С-концевая аминокислота в молекуле антитела отщепляется в ходе посттрансляционных модификаций.

В одном варианте осуществления N-концевая аминокислота в молекуле антитела отщепляется в ходе посттрансляционных модификаций.

Кроме того, настоящее изобретение относится к области специфичности или эпитопу TNF человека, которые связываются с антителом по настоящему изобретению, в частности с антителом или его связывающим фрагментом, содержащими

последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 11,

последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 16 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 15 или

последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 28 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 27.

Эта область специфичности или эпитоп TNF-полипептида человека могут быть идентифицированы с помощью любого подходящего способа картирования эпитопов, известного в данной области техники, в сочетании с любым одним из антител по настоящему изобретению. Примеры таких способов включают в себя скрининг пептидов различной длины, полученных из TNF, на связывание с антителом по настоящему изобретению, причем наименьший фрагмент, который может специфично связываться с антителом будет содержать последовательность эпитопа, распознаваемого антителом. TNF-пептиды могут быть получены синтетическим путем или протеолитическим расщеплением TNF-полипептида. Пептиды, которые связываются с антителом, могут быть идентифицированы, например, масс-спектрометрическим анализом. В другом примере ЯМР-спектроскопия или рентгеновская кристаллография могут быть использованы для идентификации эпитопа, связывающегося с антителом по настоящему изобретению. В одном примере, где используется рентгеновская кристаллография, эпитоп определяют как такие остатки в TNF-полипептиде, которые находятся в пределах 4 Å от антитела. В одном примере эпитоп определяют как такие остатки на TNF-полипептиде, которые находятся в пределах 5 Å от антитела. После идентификации эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, может быть использован при необходимости в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связываются с этим же эпитопом.

В одном варианте осуществления антитела, которые связываются с эпитопом, описанным в настоящем документе выше, по настоящему изобретению являются полностью человеческими. В одном варианте осуществления они являются гуманизированными. В одном примере они имеют аффинность к TNF человека 150 pM или ниже, как правило, 130 pM или ниже.

Антитела, которые перекрестно блокируют связывание молекулы антитела по настоящему изобретению, в частности молекулы антитела, содержащей

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 12, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 11,

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 16, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 15, или

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 28, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 27,

также могут быть полезны для блокирования активности TNF.

Соответственно настоящее изобретение также относится к молекуле анти-TNF антитела, которая перекрестно блокирует связывание любой одной из молекул антител, описанных в настоящем документе выше, с TNF человека, и/или ее связывание с TNF человека перекрестно блокируется любым из этих антител. В одном варианте осуществления изобретения такое антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в настоящем документе выше. В другом варианте осуществления перекрестно блокирующее нейтрализующее антитело связывается с эпитопом, который граничит и/или перекрывается с эпитопом, связывающимся с антителом, описанным в настоящем документе выше.

Перекрестно блокирующие антитела могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего способа в данной области техники, например, с помощью методов конкурентного анализа ELISA или BIAcore, в которых связывание перекрестно блокирующего антитела с TNF человека предотвращает связывание антитела по настоящему изобретению, или наоборот. В таких методах анализа перекрестной блокировки может использоваться выделенных природный или рекомбинантный TNF или подхо-

дющий слитый белок/полипептид. В одном примере связывание и перекрестное блокирование измеряют с использованием рекомбинантного TNF человека.

В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела по настоящему изобретению ингибируют связывание антитела, содержащего

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 12, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 11,

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 16, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 15, или

последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 28, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 27,

более чем на 80%, например более чем на 85%, например более чем на 90%, в частности, путем ингибирования более чем на 95%.

В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела по настоящему изобретению являются полностью человеческими. В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела по настоящему изобретению являются гуманизированными. В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела по настоящему изобретению имеют аффинность к TNF человека 150 пМ или ниже, 130 пМ или ниже или 100 пМ или ниже. В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела по настоящему изобретению имеют аффинность к TNF человека 50 пМ или ниже. Аффинность может быть измерена с использованием способов, описанных в настоящем документе ниже.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, тем самым давая молекуле общий положительный или отрицательный заряд. Величина общего "наблюдаемого" заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности молекулы, локального окружения заряженных групп в трехмерной структуре и условий окружающей молекулу среды. Изoeлектрической точкой (pI) является pH, при котором конкретная молекула или ее доступная растворителю поверхность не несет никакого общего электрического заряда. В одном примере, анти-TNF-антитела и фрагменты по изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь соответствующую изoeлектрическую точку. Это может обеспечить антитела и/или фрагменты с лучшими свойствами, в частности с подходящей растворимостью и/или профилем стабильности и/или улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к гуманизированному TNF-антителу, модифицированному таким образом, чтобы оно имело изoeлектрическую точку, отличную от таковой у первоначально идентифицированного антитела. Антитело может, например, быть модифицировано путем замены аминокислотного остатка, такие как замена аминокислотного остатка кислотного характера одним или несколькими основными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте могут быть введены основные аминокислотные остатки или кислотные аминокислотные остатки могут быть удалены. В альтернативном варианте, если молекула имеет неприемлемо высокое значение pI, то могут быть введены кислотные остатки, чтобы снизить pI по мере необходимости. Важно, чтобы при манипулировании pI были приняты меры для сохранения желаемой активности антитела или его фрагмента. Таким образом, в одном варианте осуществления модифицированное антитело или фрагмент имеет такую же или, по существу, такую же активность, как "немодифицированные" антитело или фрагмент.

Такие программы, как ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html и http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, могут быть использованы для прогнозирования изoeлектрической точки антитела или фрагмента. В альтернативном или дополнительном варианте pI может быть измерена с использованием любой подходящей стандартной лабораторной методики.

Предпочтительно, чтобы молекулы антител по настоящему изобретению имели высокую аффинность связывания, в частности, в наномолярном диапазоне. Аффинность может быть измерена с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, включая BIAcore, как описано в настоящем документе в примерах, с использованием выделенного природного или рекомбинантного TNF либо подходящего слитого белка/полипептида. В одном примере аффинность измеряется с использованием рекомбинантного TNF человека.

Соответственно молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания выделенного TNF человека около 1 нМ или ниже. В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 500 пМ или ниже (т.е. более высокую аффинность). В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 250 пМ или ниже. В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 200 пМ или ниже. В одном варианте осуществления изобретения молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 150 пМ или ниже. В одном варианте осуществления настоящего изобретения относится к анти-TNF антителу с аффинностью связывания около 100 пМ или ниже. В одном варианте осуществления настоящего изобретения относится к гуманизированному анти-TNF антителу с аффинностью связывания около 100 пМ или ниже. В одном варианте осуществления настоящего изобретения относится к анти-TNF антителу с аффинностью связывания около 50 пМ или ни-

же.

Аффинность антитела или связывающего фрагмента по настоящему изобретению, а также степень, с которой связывающий агент (такой как антитело) ингибирует связывание, могут быть определены средним специалистом в данной области техники с использованием обычных методик, например, тех, которые описаны Scatchard et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672 (1949)) или с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы, такой как BIAcore. Для поверхностного плазмонного резонанса молекулы-мишени иммобилизуют на твердой фазе и подвергают воздействию лигандов в подвижной фазе, проходящей через них в проточной ячейке. Если происходит связывание лиганда с иммобилизованной мишенью, то изменяется локальный показатель преломления, что приводит к изменению угла SPR, который можно регистрировать в масштабе реального времени путем детекции изменений в интенсивности отраженного света. Степени изменения сигнала SPR могут быть проанализированы, позволяя получить кажущиеся константы скорости для фаз ассоциации и диссоциации в реакции связывания. Соотношение этих величин дает кажущуюся константу равновесия (аффинность) (см., например, Wolff et al., *Cancer Res.* 53:2560-65 (1993)).

Следует иметь в виду, что аффинность антител по настоящему изобретению может быть изменена любым подходящим способом, известным в данной области техники. Настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антител по настоящему изобретению, которые имеют более высокую аффинность к TNF. Такие варианты могут быть получены с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутагенез CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование мутирующих штаммов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), ДНК-перетасовку (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и имитирующий генетическую рекомбинацию при половом процессе ПЦР-мутагенез ("половая ПЦР") (Crameri et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). В статье Vaughan et al. (*supra*) обсуждаются способы созревания аффинности.

В одном варианте осуществления изобретения молекулы антитела по настоящему изобретению блокируют активность TNF человека. Анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать TNF, известны в данной области техники.

При желании, антитело для применения в настоящем изобретении может быть конъюгировано с одной или несколькими эффекторными молекулами. Следует иметь в виду, что эффекторная молекула может содержать одну молекулу эффектора либо две или несколько таких молекул, связанных между собой и образующих единый элемент, который может быть присоединен к антителам по настоящему изобретению. Если желательно получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, он может быть получен с использованием стандартных химических процедур или технологий рекомбинантных ДНК, где фрагмент антитела присоединен либо напрямую, либо через связывающий агент к эффекторной молекуле. Способы конъюгации таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области техники (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. В альтернативном варианте, если эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, присоединение может быть осуществлено с использованием процедур рекомбинантных ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Термин "эффекторная молекула", используемый в настоящем документе, включает, например, антинеопластические агенты, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоактивные изотопы йода, радиоизотопы, хелатные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть обнаружены с помощью ЯМР- или ЭПР-спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который является вредным для клеток (например, убивает их). Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидрокситестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломусти (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дифломманитол, стрептозотозин, митомицин C, и цис-дихлорамид платины (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее, дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее, актиномицин), блеомицин, митра-

мицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимицотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут-213, калифорний-252, иридий-192 и вольфрам-188/рений-188; или лекарственные средства, такие как, но не ограниченными ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты включают, но не ограничиваются ими, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин псевдомонад или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухолей, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или активатор тканевого плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой ростовой фактор и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, полезные, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, позитронизлучающие металлы (для использования в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. В отношении ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования в качестве диагностических средств, см., в общем, патент США № 4741900. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают в себя умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают в себя ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере эффекторная молекула может увеличить период полужизни антитела *in vivo*, и/или снизить иммуногенность антитела, и/или улучшить доставку антитела через эпителиальный барьер к иммунной системе. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин, связывающие альбумин белки или связывающие альбумин соединения, такие как те, которые описаны в WO 05/117984.

Если эффекторная молекула представляет собой полимер, он может, в общем, являться синтетическим или природным полимером, например необязательно замещенным линейным или разветвленным полиалкиленгликолем, полиалкениленом или полиоксиалкиленовым полимером, или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или несколько из гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные линейные или разветвленные полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт или их производные, в частности необязательно замещенный полиэтиленгликоль, такой как метоксиполиэтиленгликоль или его производные.

Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном варианте осуществления полимер представляет собой альбумин или его фрагмент, такой как сывороточный альбумин человека или его фрагмент.

Термин "производные", используемый в настоящем документе, подразумевает включение реакционноспособных производных, например тиол-селективных реакционноспособных групп, таких как малеймиды и т.п. Реакционноспособная группа может быть присоединена к полимеру напрямую или через линкерный сегмент. Следует иметь в виду, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в качестве соединительной группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера может варьировать по желанию, но, в общем, будет находиться в среднем диапазоне молекулярных масс от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, например от 20000 до 40000 Да. Размер полимера может, в частности, выбираться на основе предполагаемого применения продукта, например, способности к локализации в определенных тканях, таких как опухоли, или продления периода полужизни в кровотоке (обзор см. в Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Так, например, когда продукт должен покидать кровоток и проникать в ткань, например, для применения в противоопухолевой терапии, предпочтительным может быть использование низкомолекулярного полимера, например с молекулярной массой около 5000 Да. Для вариантов применения, где продукт остается в циркулирующей крови, может быть предпочтительным использовать более высокомолекулярный

полимер, например, имеющий молекулярный вес в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как полиэтиленгликоль или, в особенности, метоксиполиэтиленгликоль или его производное и, в особенности, с молекулярной массой в диапазоне от примерно 15000 до примерно 40000 Да.

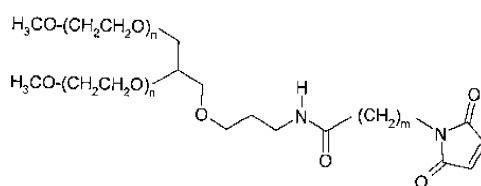
В одном примере антитела для применения в настоящем изобретении присоединены к молекулам полиэтиленгликоля (ПЭГ). В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, и молекулы ПЭГ могут быть присоединены через любую доступную функциональную группу боковых цепей аминокислот или концевой аминокислоты, находящуюся в фрагменте антитела, например через любую свободную amino-, imino-, thiol-, hydroxyl- или carboxyl-группу. Такие аминокислоты могут являться природными в фрагменте антитела или могут быть введены во фрагмент с использованием способов рекомбинантных ДНК (см., например, US 5219996, US 5667425, WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном примере молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, где модификация представляет собой добавление на C-конец его тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот, позволяющих присоединение эффекторной молекулы. Соответственно дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Для присоединения двух или нескольких молекул ПЭГ можно использовать несколько сайтов.

Соответственно молекулы ПЭГ ковалентно присоединены через thiol-группу по меньшей мере одного остатка цистеина, находящегося в фрагменте антитела. Каждая молекула полимера, присоединенная к фрагменту модифицированного антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы цистеинового остатка, расположенного во фрагменте. Ковалентная связь, в общем, является дисульфидной связью или, в частности, сероуглеродной связью. Если thiol-группа используется в качестве точки присоединения, то могут использоваться соответствующим образом активированные эффекторные молекулы, например, thiol-selective производные, такие как maleimides и производные цистеина. Активированный полимер может быть использован в качестве исходного материала при получении полимер-модифицированных фрагментов антител, описанных выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий thiol-реакционноспособную группу, такую как α -halogenocarboxylic acid или сложный эфир, например йодоацетамид, имид, например maleimide, vinylsulfone или дисульфид. Такие исходные материалы доступны в продаже (например, от компании Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов с использованием обычных химических процедур. Конкретные молекулы ПЭГ включают 20K метокси-ПЭГ-амин (доступен от компании Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (доступен от компании Nektar, ранее Shearwater).

В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или diFab, который является пэгиллированным, т.е. содержит ПЭГ (полиэтиленгликоль), ковалентно присоединенный к нему, например, в соответствии со способом, описанным в EP 0948544 или EP 1090037 (см. также "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. В одном примере ПЭГ присоединен к цистеину в шарнирной области. В одном примере ПЭГ-модифицированный Fab-фрагмент имеет maleimide-группу, ковалентно связанную с одной thiol-группой в модифицированной шарнирной области. Остаток лизина может быть ковалентно связан с maleimide-группой, и к каждой amino-группе в остатке лизина может быть присоединен метоксиполиэтиленгликолевый полимер, имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Поэтому общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы ПЭГ включают модифицированный 2-[3-(N-maleimido)пропионамидо]этиламин N,N'-бис-(метоксиполиэтиленгликоля) (мол.вес 20000 Да) лизин, также известный как PEG2MAL40K (доступен от Nektar, ранее Shearwater).

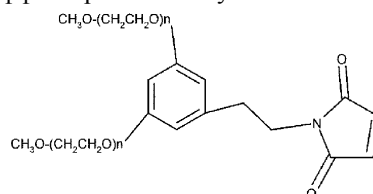
Альтернативные источники ПЭГ-линкеров включают компанию NOF, которая поставляет GL2-400MA3 (где m в приведенной ниже структуре равняется 5) и GL2-400MA (где m равняется 2), и n равняется приблизительно 450



m равно 2 или 5

То есть каждая молекула ПЭГ имеет вес около 20000 Да. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения ПЭГ представляет собой 2,3-бис-(метилполиоксиэтилен-окси-1-[[3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси]гексан (двухцепочечный Y-образный разветвленный PEG, $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_5-MAL$, мол.вес 40000 Да, известен как SUNBRIGHT GL2-400MA3).

Другие альтернативные ПЭГ-эффекторные молекулы имеют следующий тип:



доступны от компаний Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном варианте осуществления изобретения предложено антитело, которое является ПЭГилированным (например, с помощью ПЭГ, описанного в настоящем документе), причем ПЭГ присоединен через цистеиновый аминокислотный остаток в позиции 232 или в близлежащей позиции в цепи, например через 232-ю аминокислоту тяжелой цепи (при последовательной нумерации).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле Fab'-PEG, содержащей один или несколько ПЭГ-полимеров, например 1 или 2 полимера, таких как полимер или полимеры 40 кДа.

Fab'-PEG молекулы по настоящему изобретению могут быть особенно предпочтительны в том, что они имеют время полужизни, независимое от Fc-фрагмента. В одном примере осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, облегчаемого путем блокирования TNF человека, включающему введение терапевтически эффективного количества анти-TNF антитела или его связывающего фрагмента, где антитело или его связывающий фрагмент имеют период полужизни, который не зависит от связывания Fc-фрагмента с TNF.

В одном варианте осуществления предложен Fab', конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном варианте осуществления предложен scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его фрагмент конъюгированы с молекулой крахмала, например, чтобы увеличить период полужизни. Способы конъюгации крахмала с белком, описанные в патенте США 8017739, включены в данное описание путем ссылки.

Настоящее изобретение также относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую и/или легкую цепи молекулы антитела по настоящему изобретению. Соответственно последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению. Последовательность ДНК по настоящему изобретению может содержать синтетическую ДНК, например полученные химическим синтезом кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, которые кодируют молекулу антитела по настоящему изобретению, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Так, например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все тяжелую и легкую цепи антитела, могут быть синтезированы, при желании, из установленных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующие акцепторные каркасные последовательности, являются легко доступными специалистам в данной области техники и могут быть легко синтезированы на основе их известных аминокислотных последовательностей.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антитела по настоящему изобретению, могут быть использованы стандартные методы молекулярной биологии. Желаемые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов олигонуклеотидного синтеза. Сайт-направленный мутагенез и полимеразная цепная реакция (ПЦР), могут быть использованы при необходимости.

Примеры подходящих последовательностей ДНК приведены в данном описании.

Примеры подходящих последовательностей ДНК, кодирующих переменную область легкой цепи 2109 gL18, представлены в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 17.

Примеры подходящих последовательностей ДНК, кодирующих переменную область тяжелой цепи 2109 gH2, представлены в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18.

Соответственно в одном примере настоящее изобретение относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую цепь Fab- или Fab'-фрагмента антитела по настоящему изобретению, которая включает последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, 17, 14 или 18 (например, 13 и 14 или 17 и 18).

В одном примере настоящее изобретение относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь IgG4(P)-антитела по настоящему изобретению, где ДНК, коди-

рующая тяжелую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 17, а ДНК, кодирующая легкую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14 или 18.

В одном примере настоящее изобретение относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь IgG1-антитела по настоящему изобретению, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 17, а ДНК, кодирующая легкую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14 или 18.

В одном примере настоящее изобретение относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь FAb-dsFv-антитела по настоящему изобретению, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 17, а ДНК, кодирующая легкую цепь, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14 или 18.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Соответственно предложены клонирующий или экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Соответственно клонирующий или экспрессионный вектор содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению соответственно, и соответствующие сигнальные последовательности. В одном примере вектор содержит межгенную последовательность между тяжелой и легкой цепями (см. WO 03/048208).

Общие способы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, способы трансфекции и способы культивирования хорошо известны специалистам в данной области техники. Для этих способов приведена ссылка на "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York и Maniatis Manual, выпускаемый Cold Spring Harbor Publishing.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессионных векторов, содержащих одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Соответственно настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину для экспрессии антитела по настоящему изобретению, содержащей:

- i) последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь указанного антитела, и
- ii) последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь указанного антитела,

где ДНК-последовательности представлены в одном или нескольких клонирующих или экспрессионных векторах.

Любая подходящая система клетки-хозяина/вектора может быть использована для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Могут быть использованы бактериальные, например E.coli, и другие микробные системы (в частности, для экспрессии фрагментов антител) или могут также использоваться эукариотические экспрессионные системы, например, с клетками-хозяевами млекопитающих (в частности, для экспрессии полноразмерных антител). Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки CHO, клетки миеломы или клетки гибридомы.

Подходящие типы клеток яичника китайского хомячка (CHO) для применения в настоящем изобретении могут включать клетки CHO и CHO-K1, включая dhfr- CHO клетки, такие как клетки CHO-DG44 и клетки CHO-DXB11, которые могут быть использованы с DHFR-селективным маркером, или клетки CHO-K1-SV, которые могут быть использованы с глутаминсинтетазным селективным маркером. Другие типы клеток для применения в экспрессии антител включают лимфоцитарные клеточные линии, например клетки миеломы NSO и клетки SP2, клетки COS.

Настоящее изобретение также относится к способу получения молекулы антитела по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор или векторы по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для запуска экспрессии белка с ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, в случае чего для трансфекции клеток-хозяев должна использоваться последовательность, кодирующая только полипептид тяжелой или легкой цепи. Для получения продуктов, содержащих как тяжелую, так и легкую цепи, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, где первый вектор кодирует полипептид легкой цепи, а второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. В качестве альтернативы может быть использован один вектор, где вектор включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой и тяжелой цепей.

В клетках-хозяевах антитела и их фрагменты по настоящему изобретению экспрессируются на хорошем уровне. Таким образом, свойства антител и/или фрагментов создают основу для промышленного получения.

Таким образом, предложен способ культивирования клетки-хозяина и экспрессии антитела или его фрагмента, выделения последнего и необязательную очистку его же, чтобы получить выделенное антитело или его фрагмент. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию конъюгации эффекторной молекулы с выделенным антителом или фрагментом, например конъюгации с ПЭГ-полимером, в частности, описанным в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предложен способ очистки антитела (в частности, антитела или его фрагмента по изобретению), включающий стадии выполнения анионообменной хроматографии в несвязывающем режиме таким образом, что примеси задерживаются на колонке, и элюции антитела.

Таким образом, хроматографическая стадия или стадии могут включать одну или несколько стадий промывки при необходимости.

Способ очистки может также включать одну или несколько стадий фильтрации, таких как стадия диафильтрации.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложено очищенное анти-TNF антитело или его фрагмент, например гуманизированное антитело или его фрагмент, в частности антитело или его фрагмент по изобретению, по существу, в очищенной форме, в частности, свободной или в значительной степени свободной от эндотоксинов и/или белка или ДНК клеток-хозяев.

Термин "очищенная форма", используемый выше, обозначает по меньшей мере 90% чистоты, например на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 вес.% или более чистое вещество.

В общем предполагается, что термин "по существу, свободно от эндотоксинов" обозначает содержание эндотоксина 1 EU на мг продукта антитела или менее, например 0,5 или 0,1 EU на мг продукта.

В общем предполагается, что термин "по существу, свободно от белка или ДНК клеток-хозяев" обозначает содержание белка и/или ДНК клеток-хозяев 400 мкг на мг продуцируемого антитела или менее, например, 100 мкг на мг или менее, в частности 20 мкг на мг, в зависимости от обстоятельств.

Молекулы антител по настоящему изобретению также могут быть использованы в диагностике, например в диагностике *in vivo* и для визуализации заболеваний, связанных с TNF.

Поскольку антитела по настоящему изобретению являются полезными для лечения и/или профилактики патологического состояния, настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, включающей молекулу антитела по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательным веществом, разбавителем или носителем. Соответственно предложено применение молекулы антитела по изобретению для изготовления лекарственного средства. Композиция будет обычно поставляться как часть стерильной фармацевтической композиции, которая, как правило, включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической или диагностической композиции, включающему добавление и смешивание молекулы антитела по настоящему изобретению вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, разбавителем или носителем.

Молекула антитела может быть единственным действующим ингредиентом в фармацевтической или диагностической композиции либо может быть скомбинирована с другими действующими ингредиентами, включая другие антитела или не относящиеся к антителам ингредиенты, такие как стероиды или другие лекарственные молекулы, в частности лекарственные молекулы, чей период полужизни не зависит от связывания TNF.

Фармацевтические композиции предпочтительно содержат терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество", используемый в настоящем документе, относится к количеству терапевтического агента, необходимому для лечения, ослабления или предупреждения заболевания или состояния или для достижения детектируемого терапевтического или профилактического эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может быть определено первоначально либо в анализах на клеточных культурах, либо на животных моделях, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Животная модель также может быть использована для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация может быть затем использована для определения подходящих доз и способов введения у человека.

Точное терапевтически эффективное количество для человека будет зависеть от тяжести состояния заболевания, общего состояния здоровья субъекта, возраста, веса и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, комбинаций лекарственного средства, чувствительности ответа и переносимости/ответа на терапию. Это количество может быть определено с помощью обычных экспериментов и устанавливается лечащим врачом. В общем, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 до 500 мг/кг, например от 0,1 до 200 мг/кг, например 100 мг/кг.

Фармацевтические композиции обычно могут быть представлены в виде стандартных лекарственных форм, содержащих заданное количество действующего агента по изобретению на дозу.

У терапевтических доз антител по настоящему изобретению отсутствуют очевидные токсические эффекты *in vivo*.

Композиции можно вводить пациенту по отдельности или их можно вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами.

Термин "агенты", используемый в настоящем документе, относится к объекту, который при введе-

нии имеет физиологический эффект.

Термин "лекарственное средство", используемый в данном описании, относится к химической молекуле, которая в терапевтической дозе имеет соответствующий физиологический эффект.

В одном варианте осуществления изобретения антитела или фрагменты по настоящему изобретению используются с иммуносупрессивной терапией, такой как стероидная терапия, в частности преднизолоном.

В одном варианте осуществления изобретения антитела или фрагменты по настоящему изобретению используются с ритуксимабом или другими вариантами анти-В-клеточной терапии.

В одном варианте осуществления изобретения антитела или фрагменты по настоящему изобретению используются с каким-либо модулирующим агентом или иммуномодулятором В-клеток или Т-клеток. Примеры включают метотрексат, микофенолят и азатиоприн.

Вводимая дозировка молекулы антитела по настоящему изобретению зависит от природы состояния, подлежащего лечению, степени присутствующего воспаления и от того, используется ли молекула антитела профилактически или для лечения существующего состояния.

Частота введения будет зависеть от периода полужизни антитела, его мишень-опосредованного расположения, длительности его воздействия и от присутствия антител к лекарственному средству. Если антитело имеет короткий период полужизни (несколько часов) или ограниченную активность, и/или, если желательна доставка небольших объемов лекарственного средства (например, для подкожных инъекций), может быть необходимо частое введение, например один или большее число раз в день. С другой стороны, если антитело имеет продолжительный период полужизни, имеет большую продолжительность активности или может вводиться в больших объемах (например, путем инфузии), то частота введения может снижаться до одного раза в день или в несколько дней, недель или месяцев. В одном варианте осуществления изобретения оставляют достаточное время между введениями, чтобы снижался уровень антител против лекарственного средства.

Термин "период полужизни", используемый в данном описании, обозначает время, которое молекула находится в кровотоке, например в сыворотке/плазме.

Термин "фармакодинамика", используемый в данном описании, относится к профилю и, в частности, к продолжительности биологического действия молекулы по настоящему изобретению.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен сам по себе вызывать выработку антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Могут использоваться фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, или pH-буферные вещества могут присутствовать в таких композициях. Такие носители позволяют представить фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема внутрь пациентом.

Подходящие формы для введения включают в себя формы, пригодные для парентерального введения, например путем инъекции или инфузии, например путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Там, где продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В альтернативном варианте молекула антитела может находиться в высушенной форме для восстановления перед использованием в соответствующей стерильной жидкости.

После приготовления композиции по изобретению можно вводить непосредственно субъекту. Субъекты, подлежащие лечению, могут быть животными. Однако в одном или нескольких вариантах осуществления изобретения композиции адаптированы для введения человеку.

Соответственно в составах по настоящему изобретению pH конечного состава не аналогичен значению изоэлектрической точки антитела или фрагмента, например, если pI белка находится в диапазоне 8-9 или выше, то может быть целесообразным состав с pH 7. Без привязки к какой-либо конкретной теории полагают, что это может в итоге обеспечить конечный состав с улучшенной стабильностью, например, где антитело или его фрагмент остаются в растворе.

В одном примере фармацевтический состав при pH в диапазоне от 4,0 до 7,0 содержит от 1 до 200 мг/мл молекулы антитела по настоящему изобретению, от 1 до 100 мМ буфера, от 0,001 до 1% поверхностно-активного вещества, а) от 10 до 500 мМ стабилизатора, б) от 10 до 500 мМ стабилизатора и от 5 до 500 мМ обеспечивающего тоничность агента или с) от 5 до 500 мМ обеспечивающего тоничность агента.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены любыми способа-

ми, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO 98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный. Также для введения фармацевтических композиций по изобретению могут быть использованы гипоспреи. Как правило, терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде препаратов для инъекций либо в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть изготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямая доставка композиций обычно достигается с помощью подкожной, внутрибрюшинной, внутривенной или внутримышечной инъекции или путем доставки в интерстициальное пространство ткани. Также композиции могут быть введены в рану. Схема лечения может включать однократное введение или многократное введение.

Следует иметь в виду, что действующим ингредиентом в композиции будет молекула антитела. Как таковая, она будет подвержена деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композиция предназначена для введения через желудочно-кишечный тракт, то состав должен будет содержать агенты, которые защищают антитело от деградации, но которые высвобождают антитело после его всасывания из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей находится в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном варианте осуществления изобретения состав представлен в виде состава для местного применения, включая ингаляцию.

Подходящие ингаляционные препараты включают ингаляционные порошки, дозирующие аэрозоли, содержащие пропелленты, или ингаляционные растворы, свободные от пропеллентов. Ингаляционные порошки по изобретению, содержащие действующее вещество, могут состоять только из вышеуказанных действующих веществ или смеси указанных выше действующих веществ с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Эти ингаляционные порошки могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Как правило, используются моно- и дисахариды, причем лактоза или глюкоза используются, в частности, но не исключительно, в форме гидратов.

Чтобы частицы осаждались в легких, их размер должен быть менее 10 мкм, например 1-9 мкм, например от 1 до 5 мкм. Размер частиц действующего ингредиента (такого как антитело или его фрагмент) имеет первостепенное значение.

Пропеллентные газы, которые могут быть использованы для получения ингаляционных аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие пропеллентные газы выбирают из группы, включающей углеводороды, такие как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенированные углеводороды, такие как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные пропеллентные газы могут использоваться сами по себе или в виде смеси газов.

Особенно подходящими пропеллентными газами являются галогенированные производные алканов, выбранные из группы TG11, TG12, TG134a и TG227. Из вышеприведенных галогенированных углеводородов особенно подходят TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

Содержащие пропеллентный газ ингаляционные аэрозоли могут также содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (ПАВ), антиоксиданты, смазывающие вещества и средства для регулирования pH. Все эти компоненты известны в данной области техники.

Содержащие пропеллентный газ ингаляционные аэрозоли по изобретению могут содержать до 5 мас.% действующего вещества. Аэрозоли по настоящему изобретению содержат, например, от 0,002 до 5 вес.%, от 0,01 до 3 вес.%, от 0,015 до 2 вес.%, от 0,1 до 2 вес.%, от 0,5 до 2 вес.% или от 0,5 до 1 вес.% действующего ингредиента.

В альтернативном варианте местное применение в легких также может быть осуществлено путем введения композиции жидкого раствора или суспензии, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например распылитель, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), подключаемый к компрессору Pari Master(R) производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Антитело по изобретению может быть доставлено диспергированным в растворителе, например, в виде раствора или суспензии. Оно может быть суспендировано в соответствующем физиологическом растворе, например солевом растворе или других фармакологически приемлемом растворителе или буферном растворе. Примеры буферных растворов, известных в данной области техники, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг динатрий эдетата, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30

мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды так, чтобы получить pH приблизительно от 4,0 до 5,0. В суспензии можно использовать, например, лиофилизированное анти-тело.

Терапевтические суспензии или растворы могут также содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав обычно представлен, по существу, в стерильной форме с использованием стерильных способов изготовления.

Они могут включать в себя изготовление и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для изготовления, асептическое ресуспендирование антитела в стерильном забуференном растворителе/растворе и фасовку состава в стерильные сосуды способами, известными специалистам в данной области техники.

Может быть предложена распыляемая композиция по настоящему изобретению, например, в виде единичных стандартных доз (например, в запечатанных пластиковых контейнерах или флаконах), упакованных в фольгу. Каждый флакон содержит единичную дозу в объеме, например, 2 мл, растворителя/буферного раствора.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть пригодны для доставки путем распыления.

Также предполагается, что антитело по настоящему изобретению может быть введено с использованием генной терапии. Для достижения этого последовательность ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи молекулы антитела под контролем соответствующих компонентов ДНК, вводят пациенту таким образом, что антитела цепи экспрессируются с последовательностями ДНК и собираются *in situ*.

TNF α является основополагающим представителем суперсемейства TNF. TNF α представляет собой плейотропный цитокин, который опосредует регуляцию иммунного ответа и воспалительные реакции. Также известно, что *in vivo* TNF α участвует в ответе на бактериальные, паразитарные и вирусные инфекции. В частности, TNF α , как известно, играет определенную роль в ревматоидном артрите (RA), воспалительных заболеваниях кишечника (включая болезнь Крона), псориазе, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), болевом ответе, эпилепсии, остеопорозе, бронхиальной астме, сепсисе, лихорадке, системной красной волчанке (SLE) и рассеянном склерозе (MS), а также в раковых заболеваниях. Также известно, что TNF α играет определенную роль в боковом амиотрофическом склерозе (ALS), ишемическом инсульте, опосредованном иммунными комплексами гломерулонефрите, волчаночном нефрите (LN), ассоциированном с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA-) гломерулонефрите, болезни минимальных изменений, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (AKI), обструктивной уропатии, отторжении аллотрансплантата почки, цисплатин-индуцированной AKI и обструктивной уропатии.

Соответственно антитело или композиция по настоящему изобретению могут быть использованы (прямо или непрямо) для лечения, профилактики или облегчения любого состояния, которое можно лечить, предупредить или облегчить с использованием других антагонистов TNF α .

Антитела и композиции по настоящему изобретению соответственно пригодны для лечения и/или профилактики различных заболеваний человека. К ним относятся аутоиммунные и воспалительные расстройства, неврологические и нейродегенеративные расстройства, боли и болевые расстройства и сердечно-сосудистые заболевания.

Воспалительные и аутоиммунные расстройства включают системные аутоиммунные заболевания, аутоиммунные эндокринные расстройства и органспецифичные аутоиммунные расстройства. Системные аутоиммунные расстройства включают системную красную волчанку (SLE), псориаз, васкулит, полимиозит, склеродермию, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит и синдром Шегрена. Аутоиммунные эндокринные расстройства включают тиреоидит. Аутоиммунные расстройства включают болезнь Аддисона, гемолитическую или пернициозную анемию, гломерулонефрит (включая синдром Гудпасчера), болезнь Грейвса, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, инсулинзависимый сахарный диабет, ювенильный диабет, увеит, воспалительное заболевание кишечника (включая болезнь Крона и язвенный колит), пузычатку, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз печени, аутоиммунный пневмонит, аутоиммунный кардит, миастению, спонтанное бесплодие, остеопороз, астму и мышечную дистрофию (включая мышечную дистрофию Дюшенна).

Неврологические и нейродегенеративные расстройства включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, инсульт, боковой амиотрофический склероз, травмы спинного мозга, травмы головы, судороги и эпилепсию.

Сердечно-сосудистые расстройства включают тромбоз, гипертрофию сердца, гипертонию, нерегулярные сердечные сокращения (например, при сердечной недостаточности) и сексуальные расстройства

(включая эректильную дисфункцию и женскую сексуальную дисфункцию).

В частности, антитело из композиций по настоящему изобретению может быть использовано для лечения или профилактики воспалительных заболеваний, расстройств ЦНС, иммунных расстройств и аутоиммунных заболеваний, боли, остеопороза, лихорадки и отторжения трансплантированного органа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело или композиция по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, эпилепсии, астмы, сепсиса, системной красной волчанки, рассеянного склероза, астмы, ринита, рака и остеопороза. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело или композиция по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики ревматоидного артрита (RA), неспецифического воспалительного артрита, эрозивного заболевания костей, хондрита, дегенерации и/или разрушения хряща, ювенильного воспалительного артрита, болезни Стилла (ювенильной и/или с началом во взрослом возрасте), ювенильного идиопатического артрита, ювенильного идиопатического артрита (в обоих олигосуставной и полисуставной формах), воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона, язвенный колит, неопределенный колит, поучит), псориаза, псориатической артропатии, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Шегрена, болезни Альцгеймера (AD), болезни Бехчета, болезни Паркинсона (PD), бокового амиотрофического склероза (ALS), ишемического инсульта, боли, эпилепсии, остеопороза, остеопении, анемии хронического заболевания, кахексии, диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, астмы, хронического обструктивного заболевания дыхательных путей (или легких), сепсиса, лихорадки, респираторного дистресс-синдрома, системной красной волчанки (SLE), множественного склероза (MS), опосредованного иммунными комплексами гломерулонефрита, волчаночного нефрита (LN), связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA-) гломерулонефрита, болезни минимальных изменений, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (AKI), обструктивной уропатии, отторжения аллотрансплантата почки, цисплатин-индуцированной AKI и обструктивной уропатии, глазных болезней (включая диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, ретинопатию недоношенных, возрастную макулярную дегенерацию, макулярный отек, пролиферативную и/или непролиферативную ретинопатию, васкуляризацию роговицы, включая неоваскуляризацию, окклюзию вен сетчатки, различные формы увеита и кератита), тиреоидита, фиброзных расстройств, включая различные формы фиброза печени, различные формы фиброза легкого, системный склероз, склеродермию, рак и раковые осложнения (включая скелетные осложнения, кахексию и анемию).

Антитела и их фрагменты по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения концентрации нежелательных антител у индивидуума, включающему стадии введения индивидууму терапевтически эффективной дозы анти-TNF антитела или его связывающего фрагмента, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к применению молекулы антитела по настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики патологического расстройства, описанного в настоящем документе, такого как аутоиммунное заболевание.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает применение антител или их фрагментов в качестве реагента для диагностики, например, конъюгированных с молекулой-репортером. Таким образом, предложено антитело или фрагмент по изобретению, которые являются мечеными. В одном аспекте предложена колонка, содержащая антитело или его фрагмент по изобретению.

Термин "содержащий" в контексте настоящего описания означает "включающий".

При технической возможности варианты осуществления настоящего изобретения могут быть объединены.

Варианты осуществления описаны в данном документе, как содержащие определенные признаки/элементы. Изобретение также распространяется на отдельные варианты осуществления, состоящие или, по существу, состоящие из указанных признаков/элементов.

Технические ссылки, такие как патенты и заявки, включены в настоящее описание путем ссылки.

Настоящее изобретение далее описано (только в качестве иллюстрации) в нижеследующих примерах, в которых даны ссылки на прилагаемые фигуры.

Примеры

Пример 1. Выделение нейтрализующих анти-TNF-альфа человека переменных областей.

Иммунизацию по следующей схеме выполняли с целью получения материала для культуры В-клеток и скрининга антител:

5 крыс Sprague Dawley иммунизировали 3 раза TNF-альфа человека в комплексе с низкомолекулярным бензимидазольным соединением, соединение 1 (описанное в WO 2013/186229 и PCT/EP 2015/074527). Собирали сыворотку и тестировали на связывание с TNF-альфа человека с помощью ELISA. Получаемые титры соответствовали 100000-кратному разбавлению и поэтому были признаны приемлемыми для культивирования В-клеток.

В-клеточные культуры были приготовлены с использованием способа, аналогичного тому, который

описан Zubler et al. (1985) и Lightwood et al. (2013). Вкратце, спленоциты, содержащие В-клетки, с плотностью приблизительно 5000 клеток на лунку культивировали в штрих-кодированных 96-луночных культуральных планшетах в 200 мкл/лунку RPMI 1640 (Gibco BRL) с добавлением 10% FCS (PAA Laboratories Ltd), 2% HEPES (Sigma Aldrich), 1% L-глутамин (Gibco BRL), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco BRL), 0,1% β -меркаптоэтанола (Gibco BRL), 2-5% супернатанта из культуры активированных спленоцитов и гамма облученных клеток мышинной тимомы (5×10^4 /лунку) в течение семи дней при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. За время этого проекта было проскринировано более 70 млн В-клеток.

Присутствие антител, специфичных к TNF человека, в клеточных культуральных супернатантах определяли с использованием гомогенного флуоресцентного анализа связывания с использованием 10-микронных SuperAvidinTM-полимерных шариков (Bangs Laboratories), покрытых биотинилированным TNF человека в качестве источника антигена-мишени. 10 мкл супернатанта переносили из штрих-кодированных 96-луночных культуральных планшетов в штрих-кодированные аналитические 384-луночные планшеты с черными стенками, содержащие 5000 покрытых шариков с использованием роботизированной системы Matrix Platemate Liquid Handler. Связывание выявляли с использованием Cy5-конъюгированных козьих антител, специфичных к крысиным или мышинным IgG-Fc γ (Jackson). Поглощение в планшетах измеряли с помощью системы детекции Applied Biosystems 8200.

В качестве альтернативы для выявления положительных лунок использовали анализ ELISA. 384-луночные планшеты для ELISA покрывали 2 мкг/мл TNF перед добавлением 10 мкл супернатанта В-клеточной культуры в блокированный планшет. После инкубации в течение 1 ч планшеты промывали и связывание выявляли с использованием HRP-конъюгированных козьих антител против крысиных Fc (Jackson).

После первичного скрининга положительные супернатанты были объединены в штрих-кодированных 96-луночных мастер-планшетах с использованием робота Aviso Onyx, и В-клетки в клеточных культуральных планшетах замораживали при -80°C. Затем мастер-планшеты скринировали с использованием анализа Biacore с целью выявления лунки, содержащей антитела с высокой аффинностью.

С целью идентификации антител, способных нейтрализовать биологическую активность TNF α , авторы провели клеточный на TNF α -репортерный анализ с использованием В-клеточных культуральных супернатантов в мастер-планшетах. В анализе использовали клетки HEK-293-CD40-BLUE (Invivogen), которые были созданы, чтобы секретировать щелочную фосфатазу в ответ на ряд стимулов, действующих через NFKB-путь, включая TNF α человека. Содержащие антитела супернатанты использовали напрямую в этом анализе в одном разведении 1:2,5. Лунки, содержащие высокоаффинные блокирующие антитела (меньше 100 пМ аффинность согласно данным Biacore и показывающие 90%-е ингибирование в репортерном анализе) были отобраны для дальнейшей работы.

Чтобы выделить гены переменных областей антител в выбранных лунках, представляющих интерес, необходимо было выполнить стадию деконволюции для того, чтобы идентифицировать антиген-специфичные В-клетки в данных лунках, которые содержали гетерогенную популяцию В-клеток. Это было достигнуто с использованием способа флуоресцентной фокусировки. Вкратце, иммуноглобулин-секретирующие В-клетки из положительной лунки смешивали со стрептавидиновыми шариками (New England Biolabs), покрытыми биотинилированным TNF человека и конечным разведением 1:1200 FITC-конъюгата козьих антител против крысиного Fc γ -фрагмента (Jackson). После статической инкубации при 37°C в течение 1 ч антигенспецифичные В-клетки могут быть идентифицированы по присутствию флуоресцентного ореола, окружающего эту В-клетку. Эти индивидуальные В-клетки, идентифицированные с помощью микроскопа Olympus, затем отбирали микроманипулятором Eppendorf и помещали в ПЦР-пробирку.

Гены переменных областей для четырех различных антител, известных как 2102, 2101, 2109 и 2111, были выделены из одиночных клеток путем ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к переменным областям тяжелой и легкой цепей. Два раунда ПЦР проводили с помощью робота Aviso Onyx, используя "гнездовую" ПЦР, включающую сайты рестрикции на 3'- и 5'-концах, которые позволяют клонировать крысиную переменную область в мышинные γ 1-IgG или Fab-(VH), либо в мышинную каппа(VL) в векторе для экспрессии в клетках млекопитающих. Конструкции для экспрессии тяжелой и легкой цепей совместно трансфицировали в клетки HEK-293 с использованием Fectin 293 (Invitrogen), и рекомбинантное антитело экспрессировали в 48-луночных планшетах в объеме 1 мл. После экспрессии в течение 5-7 дней собирали супернатанты и проводили дальнейший скрининг антител.

Проводили скрининг рекомбинантных химерных крыса/мышь IgG- и Fab-молекул в репортерном анализе с использованием клеток HEK-293-CD40-BLUE в серии концентраций, чтобы получить возможность расчета значений EC₅₀ и определить максимальный процент ингибирования. Fab-фрагменты были протестированы с целью доказательства активности антитела в одновалентном формате. IgG также были проанализированы в эксперименте на установке Biacore для определения аффинности связывания с TNF человека. Формат анализа в эксперименте на Biacore был следующим: захват мышинных IgG на иммобилизованных антителах против мышинных IgG-Fc с последующим титрованием TNF человека над поверх-

ностью с захваченными антителами. Анализ взаимодействия биомолекул (BIA) проводили с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Аффинно-очищенный F(ab')₂-фрагмент козьих антител против мышинных IgG, специфичный к Fc-фрагменту (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью реакции сочетания аминов до уровня приблизительно 5000 ед. отклика (RU). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% Surfactant-P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера при скорости потока 10 мкл/мин. Впрыскивали 10 мкл мышинных IgG с концентрацией 0,5 мкг/мл для захвата иммобилизованным антителом против мышинных IgG-Fc. TNF человека с концентрацией 20 нМ впрыскивали к захваченным мышинным IgG дважды при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали 2-кратным впрыскиванием по 10 мкл 40 mM HCl, чередуя с впрыскиванием 5 мкл 5 mM NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычтенным фоном анализировали с использованием программного обеспечения T200evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам.

Таблица 4

Антитело	EC50 (нг/мл)	% ингибирования	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	KD (пМ)
CA2109 IgG	0,31	100	4,70E+06	1,19E-04	25
CA2109 Fab	3,8	100	Не определено	Не определено	Не определено

Нейтрализацию определяли с использованием репортерного анализа HEK-293-CD40-BLUE (Invivo-gen). Приведены EC₅₀ и % нейтрализации. Анализ Biacore проводили для определения кинетики связывания. Приведены константа скорости ассоциации (k_a), константа скорости диссоциации (k_d) и константа аффинности (KD).

На фиг. 2 показаны кривые титрования для CA2109 в формате крысиного/мышинного Fab (fwk18 FAB) и IgG1 (fwk18 IgG). Данные определяли с использованием репортерного анализа на клетках HEK-293-CD40-BLUE (Invivo-gen), как описано выше.

Все четыре антитела (2101, 2109, 2111 и 2102), выделенные, как описано выше, скринировали в формате химерных (крыса/человек) Fab-фрагментов на перекрестную реактивность к TNF яванского макака и человека с использованием TNF человека (hTNF) и TNF яванского макака (cTNF), как показано в табл. 4а ниже.

Формат анализа эксперимента на Biacore был следующим: захват химерных (крыса/человек) Fab-фрагментов иммобилизованным антителом к F(ab') человека с последующим титрованием TNF человека над поверхностью с захваченными антителами. Анализ взаимодействия биомолекул (BIA) проводили с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Аффинно-очищенный F(ab')₂-фрагмент козьих антител против IgG человека, специфичный к F(ab')₂-фрагменту (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью реакции сочетания аминов до уровня приблизительно 5000 ед. отклика (RU). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% Surfactant-P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера при скорости потока 10 мкл/мин. Впрыскивали 10 мкл химерного (крыса/человек) Fab с концентрацией 0,5 мкг/мл для захвата иммобилизованным анти-IgG человека F(ab')₂. TNF человека или яванского макака впрыскивали к захваченным химерным (крыса/человек) Fab при концентрации 5 и 3,125 нМ соответственно и скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали 2-кратным впрыскиванием по 10 мкл 50 mM HCl, чередуя с впрыскиванием 5 мкл 5 mM NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычтенным фоном анализировали с использованием программного обеспечения T200evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам.

Таблица 4а

			k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	KD (М)	KD (пМ)
02101	химерный Fab человека	hTNF	4,63E+06	1,39E-04	2,99E-11	30
02109	химерный Fab человека	hTNF	4,09E+06	1,43E-04	3,49E-11	35
02111	химерный Fab человека	hTNF	2,89E+06	1,39E-04	4,81E-11	48
02102	химерный Fab человека	hTNF	2,59E+06	2,27E-04	8,73E-11	87

			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
02101	химерный Fab человека	cTNF	4,54E+06	9,72E-05	2,14E-11	21
02109	химерный Fab человека	cTNF	3,71E+06	1,02E-04	2,74E-11	27
02111	химерный Fab человека	cTNF	2,26E+06	2,25E-04	9,98E-11	100
02102	химерный Fab человека	cTNF	4,17E+05	8,64E-03	2,07E-08	20720

Было найдено, что антитело 2102 имеет гораздо более низкую аффинность к TNF яванского макака. Это антитело также потеряло аффинность в процессе гуманизации, так что его не использовали в дальнейшей работе.

На основе этой работы антитело CA2109 было выбрано в качестве основного кандидата из-за его перекрестной реактивности к TNF яванского макака и человека (табл. 4а), имеющее высокую аффинность (табл. 4) и сильную нейтрализующую активность (фиг. 2 и табл. 4). Это антитело было выбрано для гуманизации исходя из этих свойств.

Два других антитела, а именно 2101 и 2111, имеющие аналогичную аффинность и нейтрализующие свойства, были выбраны для гуманизации параллельно с CA2109. Однако для 2101 не удалось сохранить аффинность к TNF при гуманизации, так что это антитело не использовали в дальнейшей работе. Оба антитела 2109 и 2111 были успешно гуманизированы и затем преобразованы в scFv-формат и скринированы в анализе ингибирования TNF на клетках L929 (описанном ниже), чтобы подтвердить нейтрализующую активность (табл. 5)

Таблица 5

Антитело	IC50 (нМ)
CA2111 Fab	12,49
CA2111 VH1 HLds scFv	135,09
CA2111 VH1 LHds scFv	143,24
CA2109 VH3 scFv	16,55

Клеточная линия L929 представляет собой клеточную линию мышинной фибросаркомы, которая чувствительна к цитотоксическим эффектам TNF- α . TNF стимулирует клетки через рецепторы TNF, которые связывают TNF- α человека, яванского макака или мыши, вызывая апоптоз. Клетки одновременно обрабатывают актиномицином D, который увеличивает восприимчивость к токсичному действию TNF- α . Жизнеспособность клеток L929 после обработки актиномицином-D/TNF- α и каждым из анти-TNF антител определяли путем определения уровня АТФ (который снижается с уменьшением жизнеспособности) с помощью люциферазной реакции (CellTiter-Glo, Promega).

Клетки L929 обрабатывали 2,35 мкг/мл актиномицина D и TNF- α человека в концентрации 100 пг/мл в присутствии каждого антитела или контрольного соединения в конечном объеме 30 мкл в 384-луночном плоскодонном планшете после 1-часовой предварительной инкубации. Через 24 ч при 37°C и 5% CO₂ измеряли жизнеспособность клеток с помощью CellTiter-Glo (Promega Ltd).

Как можно увидеть в табл. 5, антитело 2111 не сохраняет активность в этом анализе в качестве scFv (по сравнению с гуманизированным Fab) в любой ориентации цепей - тяжелая-легкая (HL) или легкая-тяжелая (LH). Только у антитела 2109 сохранилась перекрестная реактивность между яванским макаком и человеком, высокая аффинность и нейтрализующая способность, а также термостабильность в формате гуманизированного scFv. Гуманизация антитела CA2109 описана более подробно ниже.

Пример 2. Гуманизация анти-TNF-альфа антитела CA2109.

Антитело CA2109 было гуманизировано путем переноса определяющей комплементарности областей (CDR) в каркасные области из зародышевой линии человека. Выравнивания последовательности антитела крысы (донора) с каркасной областью из зародышевой линии человека (акцептора) показаны на фиг. 3 и 4 вместе с создаваемыми гуманизированными последовательностями.

Выбранной акцепторной последовательностью легкой цепи из зародышевой линии являлись человеческие V-область VK1 2-1(U) A20 плюс J-область JK2 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). Выбранной акцепторной последовательностью легкой цепи из зародышевой линии являлись человеческие V-область VH3 1-3 3-21 плюс J-область JH4 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). CDR, переносимые из донорной в акцепторную последовательность, определены по системе Кабата (Rabat et al., 1987), за исключением CDR-H1, где использовали комбинированное определение Чотии и Кабата.

Гены, кодирующие исходные последовательности V-областей, были подобраны и сконструированы с помощью автоматизированного синтеза с помощью Entelechon GmbH и модифицированы для создания пересаженных версий gL1, gL18, gH1 и gH2 с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Последовательность гена gL18 была субклонирована в вектор для экспрессии легкой цепи антитела человека, pMhCK delta, от компании UCB Celltech, который содержит ДНК, кодирующую С-каппа константную область антитела человека (аллотип Km3). Последовательность gH2 была субклонирована в вектор для экспрессии pMhg1Fab от UCB Celltech, который содержит ДНК, кодирующую константную область CH1 тяжелой цепи гамма-1 антитела человека.

С целью сохранения полной активности и поддержания высокой термостабильности донорные остатки в позициях 48 (изолейцин), 49 (глицин), 71 (валин), 73 (лизин), 78 (аланин) и 93 (треонин) в гуманизированной тяжелой цепи (нумерация по системе Кабата) были сохранены. Аналогичным образом, были сохранены донорные остатки в позициях 65 (треонин), 71 (тирозин) и 87 (фенилаланин) в гуманизированной легкой цепи (нумерация по системе Кабата). Кроме того, были удалены 3 сайта деаминации в легкой цепи путем замены аспарагиновых остатков в позициях 31, 50 и 52 на серин, аспарагиновую кислоту и серин соответственно. Окончательные отобранные последовательности вариабельных областей с пересаженными CDR, gL18 и gH2 показаны на фиг. 1, 3 и 4, SEQ ID NO: 11 и 12.

Как описано выше в примере 1, только антитело 2109 сохранило перекрестную реактивность между яванским макаком и человеком, высокую аффинность и нейтрализующую способность, а также термостабильность, в качестве гуманизированного scFv. Способность антитела 2109 быть одинаково активным в нескольких форматах антител, включая IgG, Fab и scFv, делает его полезным и универсальным антителом, которое может использоваться отдельно в качестве моноспецифичных антител или может быть включено в полиспецифичные форматы антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь или фрагмент тяжелой цепи с вариабельной областью, где указанная вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 12 или 16, и содержащее легкую цепь или фрагмент легкой цепи с вариабельной областью, где указанная вариабельная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 11 или 15.

2. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 2, и легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 11.

3. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 16, и легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 15.

4. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его связывающий фрагмент представляет собой фрагмент scFv, dsScFv Fv, Fab, Fab', Fab-Fv или FAb-dsFv.

5. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по любому одному из пп.1-4, которое является гуманизированным.

6. Анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которое имеет аффинность связывания с TNF человека 150 пМ или более высокую аффинность.

7. Анти-TNF антитело по любому из пп.1-3, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

8. Анти-TNF антитело по п.7, где полноразмерное антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG4 и IgG4P.

9. Полиспецифичное антитело, отличающееся тем, что содержит анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по любому пп.1-6.

10. Конъюгат анти-TNF антитела или его связывающего фрагмента по п.1 и полимера, выбранного из крахмала, альбумина и полиэтиленгликоля, для повышения времени полужизни.

11. Конъюгат по п.10, где полимер представляет собой ПЭГ с молекулярной массой в диапазоне от 5 до 50 кДа.

12. Конъюгат по п.10 или 11, где антитело или его связывающий фрагмент является гуманизированным.

13. Конъюгат по п.12, где антитело или его связывающий фрагмент имеет аффинность связывания с TNF человека 150 пМ или более высокую аффинность.

14. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи антитела, определенного в любом из пп.1-13.

15. Клонированный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК по п.14.

16. Вектор экспрессии, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК по п.14.

17. Вектор по п.15 или 16, где вектор содержит SEQ ID NO:17, 18 и/или 22.

18. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько клонирующих или экспрессионных векторов по любому из пп.15-17.

19. Способ получения антитела, специфично связывающего TNF человека, включающий культиви-

рование клетки-хозяина по п.18 и выделение антитела.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая анти-TNF антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или конъюгат по любому из пп.10-13 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательным веществом, разбавителем или носителем.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, содержащая другие действующие ингредиенты, которые являются ингредиентами на основе антител или ингредиентами не на основе антител, такими как стероидные средства или другие лекарственные молекулы, в частности молекулы с временем полужизни, не зависящим от связывания с TNF.

22. Применение антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для лечения одного или нескольких аутоиммунных и воспалительных заболеваний; неврологических и нейродегенеративных расстройств; болей и заболеваний, связанных с ноцицептивной болью; и сердечно-сосудистых заболеваний.

23. Применение конъюгата по пп.10-13 для лечения одного или нескольких аутоиммунных и воспалительных заболеваний; неврологических и нейродегенеративных расстройств; болей и заболеваний, связанных с ноцицептивной болью; и сердечно-сосудистых заболеваний.

24. Применение композиции по п.20 или 21 для лечения одного или нескольких аутоиммунных и воспалительных заболеваний; неврологических и нейродегенеративных расстройств; болей и заболеваний, связанных с ноцицептивной болью; и сердечно-сосудистых заболеваний.

25. Применение антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для лечения одного или нескольких следующих заболеваний: ревматоидного артрита, болезни Крона, псориаза, системной красной волчанки, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и эпилепсии.

26. Применение конъюгата по пп.10-13 для лечения одного или нескольких следующих заболеваний: ревматоидного артрита, болезни Крона, псориаза, системной красной волчанки, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и эпилепсии.

27. Применение композиции по п.20 или 21 для лечения одного или нескольких следующих заболеваний: ревматоидного артрита, болезни Крона, псориаза, системной красной волчанки, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и эпилепсии.

28. Способ лечения одного или нескольких аутоиммунных и воспалительных заболеваний, неврологических и нейродегенеративных расстройств; болей и заболеваний, связанных с ноцицептивной болью; и сердечно-сосудистых заболеваний у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-9, или конъюгата по пп.10-13, или композиции по п.20 или 21.

(a) последовательности CDR антитела 2109

CDRH1:	GYTFTDNYIH	(SEQ ID NO:1)
CDRH2:	YINPSSAYAHYNEKFKT	(SEQ ID NO:2)
CDRH3:	RYYSAMPFAY	(SEQ ID NO:3)
CDRL1:	RASEDIYSGLA	(SEQ ID NO:4)
CDRL1:	RASEDIYNGLA	(SEQ ID NO:5)
CDRL2:	DSSTLHT	(SEQ ID NO:6)
CDRL2:	NSNTLHT	(SEQ ID NO:7)
CDRL2:	NSSTLHT	(SEQ ID NO:8)
CDRL2:	DSNTLHT	(SEQ ID NO:9)
CDRL3:	QQNYDFPLT	(SEQ ID NO:10)

(b) Варибельная область легкой цепи антитела 2109 gL18 (SEQ ID NO:11) (немутированная*)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSRF
SGTSGSDTYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGGCTKLEIKRT

(c) Варибельная область тяжелой цепи антитела 2109 gH2 (SEQ ID NO:12) (немутированная*)

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWRQAPGKGLEWIGYINPSSAYAHYNE
KFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSS

(d) ДНК, кодирующая варибельную область легкой цепи антитела 2109 gL18 (SEQ ID NO:13) (немутированную*)

gatatacagatgacccaatcaccagctctctgagtgcttccgttgccgacgcgttacattacctgacgagctagcagagatatac
tcaggactggcctgtaccagcaaaagcctggcaagtgcttccgttgccgacgcgttacattacctgacgagctagcagagatatac
gccgcttttagcggaactggatctggaaccgactatcacctgacgatttctcactgcaaccggaagacgtggcaacctactctgtcag
caaaactgacttcccttgacgtttggcgaaggacaagctggagatcaaacgtacc

(e) ДНК, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 2109 gH2 (SEQ ID NO:14) (немутированную*)

gaagttcaactgctgcaagcggagtggtgctctggaacctgacgagctctctgagttgcatgtgctgcaagcggctacacgttta
ccgataactatctcactgggtgcaagcaccaggggaaggactgggaatggattgatatatacccgagctccgctacgcac
actaacgagaaattcaagaccgattcaccatctccgttgacaagccaagactccgttactgcaaatgaactctctgaggc
cgaagacactgcccgtgtattactgaccccgccgatactatagcgtatgcccttgcctactggggaagggacactgctcactgtct
caagt

(f) Варибельная область легкой цепи антитела 2109 gL18 (SEQ ID NO:15) (мутированная*)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYSGLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSRF
SGTSGSDTYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGGCTKLEIKRT

(g) Варибельная область тяжелой цепи антитела 2109 gH2 (SEQ ID NO:16) (мутированная*)

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGYTFDNYIHWRQAPGKCLEWIGYINPSSAYAHYNE
KFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQGLTVTVSS

(h) ДНК, кодирующая варибельную область легкой цепи антитела 2109 gL18 (SEQ ID NO:17) (мутированную*)

2109dsVL

gataatccagatgacccagtcgccgtccagcctctccgcctccgtgggagacagagtacgat
cacttgcaagcgtacagaggacatctactctggccttgcttggtatcagcagaagccgggaa
aggtgcccaactgctcatctatgactcctcgaccctccacagggagtgccatcgcgcttc
agcgggaccggatctgggaccgactacacctgaccatttcatcgctccagccggaggatgt
tgccacttacttctgccaacagaattacgacttcccacttacttcttgatgtggcactaagc
tcgaaatcaagcgacc

* т.е. без цистеинов, введенных для дисульфидной связи
/ т.е. с цистеинами, введенными для дисульфидной связи

(j) ДНК, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела 2109 gH2 (SEQ ID NO:18) (мутированную)

gaagtgcagttgggtggagtcggggggagggttggtgaagccaggaggatcattgcggttgct
atgtgcgggttcgggctacactttcactgcacaattacattcactgggtgcgacaagcaccag
ggaggtgcttcggaatggattggctacatcaaccggtcaagcgcatacgcccattacaacgaa
aagttcaagaccgggttcaccatctccgtggataaggcgaaaaacagcgctaccttcagat
gaactccttcgccccgaggaatacccggtttactactgcactagacggtactacagcgcca
tgccgttcgcgtactcggggacaaggcactctgggtcaccggtgcgtcg

(j) scFv (VH-VL) антитела 2109 gH2gL18 (SEQ ID NO:19) (немутированный*)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNIHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLTVYSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYS
GLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSPRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQ
QNYDFPLTFGQGTKLEIKRT

(k) ДНК, кодирующая scFv (VH-VL) антитела 2109 gH2gL18 (SEQ ID NO:20) (немутированный*)

gaagttcaactggtcgaaagcggagggtggctcgtgaaacctggcggatctctcgattgctatgctgcaagcggtcacagttaccgataa
ctatatccactgggtgcgacaagcaccagggaaaggactgggaatggattggatatattaaccgagctcgcctacgcacactacaacgagaa
attcaagaccgattcaccatctccgtggacaagccaagaactccgttacctgcaaatgaactctctgcggcgcaagacactcgcgtgatt
actgcaccccgcatctatagcgtactgcccttgctactgggacaaaggacactggtcactgtctcaagtggagggtggcgttctggcgtt
ggcgggttcgggtggcggtggatcgggaagtggtgggttctgatatacagatgcccaatcaccaagctctctgagtgcttccgttggcgatcgctt
acaattacctccgagctagcaggatatactcaggactggcctggtaccagcaaaagcctggcaagtgcttaagctcctgatctacgact
ccagtaacctgcacactgggtgtgccaagccgcttagcggaaactggatctggaaacgactatacactgacgatttctcctgcacccgggaagac
gtggcaactactctctgcagaaaactacgactcccccttgacgttgggcaagggacaagctggagatcaaacgtacc

(l) dsscFv (VH-VL) антитела 2109 gH2gL18 (SEQ ID NO:21) (мутированный)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDNIHWVRQAPGKCLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLTVYSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYS
GLAWYQQKPGKVPKLLIYDSSTLHTGVPSPRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQ
QNYDFPLTFGCGTKLEIKRT

(m) ДНК, кодирующая dsscFv (VH-VL) антитела 2109 gH2gL18 (SEQ ID NO:22) (мутированный)

Gaagtgcagttgggtggagtcggggggagggttggtgaagccagagagatcattgcggtgtcatgtgcggttcggctacacttcc
actgcacaattacattcattgggtgcgacaagcaccagggaaagtgctcgaaatggattggctacatcaaacccgtcaagcgcatcgcgcc
attacaacgaaaagttaagaccgggttcaccatctccgtggataaggcgcaaaaaacagcgctacattcaagatgaactccctcgcgggc
cgaggataccgcggttactactgactagacggtactacagcgccatccggttcgctgactgggacaaggcactctgctacaccgtg

tcgtcgggagaggaagcctcgggtggagcgcggtggcggagagcgcgcgagcggttcggatattccagatgaccaca
gtcgccgtrccagcctctccgctcgttggagagacagatgacgatcactgcagagcatcagagacatctactctgacctgtggt
atcagcagaaagccgggaaagtgccccaaactgcicattatgactcctcgacccctccacacgggagtgccatcgcggttcagcgga
ccggatctgggaccgactacacccctgaccatttcactgctccagcccgaggatgttgccacttactctgccacagaattacgacttcc
cacttactttggatgtgcactaaagctcgaatcaagcgacc

(n) Варибельная область легкой цепи крысиного антитела 2109 (SEQ ID NO:23)

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNGLAWYQQKPGKSPHLLIYNSTLHTGV
PSRFSGTGSGTQYSLKINLSLQSEDVATYFCQQNYDFPLTFGSGTKLELK

(m) Варибельная область легкой цепи крысиного антитела 2109 (SEQ ID NO:24)

EVQLHQSQAALVKPGASVKLSCKTSGYTFTDNIHWVKQSPGKSLIEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTKATLTVDKSTNTAYMELSRLTSEDSATYFCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLTVSS

(o) Акцепторная каркасная область VK1 2-1(U) A20 JK2 антитела человека (SEQ ID NO:25)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGV
PSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGTKLEIK

* т.е. без цистеинов, введенных для дисульфидной связи

/ т.е. с цистеинами, введенными для дисульфидной связи

(p) Акцепторная каркасная область VH3 1-3 3-21 JH4 антитела человека (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSTSY
IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGLTVTVSS

(q) Варибельная область легкой цепи антитела 2109 gL1 (SEQ ID NO:27)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNGLAWYQQKPGKVPKLLIYNSTLHTG
VPSRFSGTGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQQNYDFPLTFGQGTKLEIK

(r) Варибельная область тяжелой цепи антитела 2109 gH1 (SEQ ID NO:28)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCATSGYTFTDNIHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSAY
AHYNEKFKTRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRYYSAMPFAYWGQG
TLTVSS

(s) Константная область тяжелой цепи g1 мышиноного антитела (SEQ ID NO:30)

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVS
SVFIIPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF
NSTFRSVSELPIMNQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPK
EQMAKDKVSLTCLMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN
VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

(t) Константная область Fab тяжелой цепи g1 мышиноного антитела без шарнирной области (SEQ ID NO:31)

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC

(u) Константная область легкой цепи мышиноного антитела (SEQ ID NO:32)

RTDAAPTVISFPPSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWT
DQDSKDYSTYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPVKSFNRECE

(v) Константная область легкой цепи (SEQ ID NO:33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSTYLSSTLTCLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

(w) Константная область Fab CH1 тяжелой цепи гамма-1 без шарнирной области
(SEQ ID NO:34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAP

(x) Полноразмерная константная область тяжелой цепи гамма-1 (SEQ ID NO:35)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(y) Полноразмерная константная область тяжелой цепи гамма-4 (SEQ ID NO:36)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEKYGGPCPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

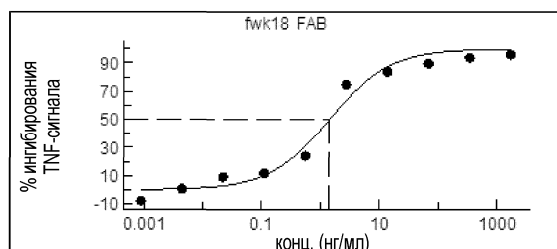
(z) Полноразмерная константная область тяжелой цепи гамма-4P (SEQ ID NO:37)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEKYGGPCPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

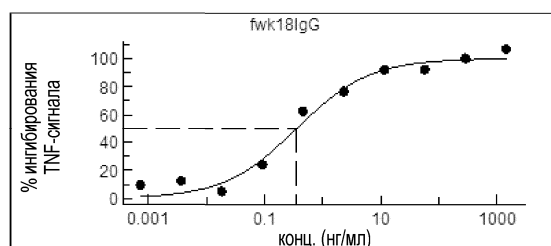
* т.е. без цистеинов, введенных для дисульфидной связи

† т.е. с цистеинами, введенными для дисульфидной связи

Фиг. 1



Фиг. 2a



Фиг. 2b

