(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041811 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.06

(21) Номер заявки
201691154

(22) Дата подачи заявки
2014.12.04

(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, АКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ АНТИГЕНА КОТОРЫХ ВАРЬИРУЕТСЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЕДИНЕНИЙ, И БИБЛИОТЕКИ УКАЗАННЫХ МОЛЕКУЛ

(31) **2013-251537**
(32) **2013.12.04**
(33) **JP**
(43) **2016.10.31**
(86) **PCT/JP2014/082060**
(87) **WO 2015/083764 2015.06.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель:
Игава Томоюки, Тамба Сигеро, Симидзу Сун, Тацуми Канако, Кадоно Содзиро, Каваути Хироки, Охара Кадзухиро, Матсусита Масаюки, Емура Такаси, Камимура Масаки (JP)

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

(56) JP-A-2012518613
WO-A1-2013046722
WO-A1-2013047729
JP-A-2011184418
JP-A-2013521772
WO-A1-2013180200

(57) Задачей изобретения является предоставление специфических для ткани-мишени антигенсвязывающих молекул, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации неприродного соединения, библиотек, содержащих множество антигенсвязывающих молекул, которые отличаются друг от друга, фармацевтических композиций, содержащих антигенсвязывающие молекулы, способов скрининга антигенсвязывающих молекул и способов получения антигенсвязывающих молекул. Авторы изобретения создали антигенсвязывающие домены, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, и библиотеки, содержащие множество антигенсвязывающих доменов, которые отличаются друг от друга, и продемонстрировали, что описанные выше задачи могут быть достигнуты с использованием библиотек. Различные заболевания, источником которых являются ткани-мишени, можно лечить специфическим для тканей-мишеней образом с использованием антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению.

041811 B1

041811 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к библиотекам антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения. Также настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим доменам или антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации неприродного соединения, к способам получения и способам скрининга антигенсвязывающих молекул, и к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы.

Уровень техники

Антитела привлекают внимание в качестве фармацевтических средств, поскольку фармацевтические препараты являются высокостабильными в плазме и имеют мало побочных эффектов. В частности, на рынке доступен ряд антительных фармацевтических препаратов IgG-типа, и многие фармацевтические препараты в настоящее время находятся на стадии разработки (непатентные документы 1 и 2).

В качестве лекарственных средств против злокачественной опухоли с использованием антительных фармацевтических средств на настоящий момент одобрены ритуксан против антигена CD20, цетуксимаб против антигена EGFR, герцептин против антигена HER2 и т.п. (непатентный документ 3). Эти молекулы антител связываются с антигенами, экспрессируемыми на злокачественных клетках, и проявляют цитотоксическую активность против злокачественных клеток посредством ADCC и т.п. Известно, что такая цитотоксическая активность посредством ADCC и т.д. зависит от количества антигенов, экспрессируемых на клетках, на которые нацелены терапевтические антитела (непатентный документ 4);

таким образом, высокий уровень экспрессии является предпочтительным с точки зрения эффектов терапевтических антител. Однако, даже если уровень экспрессии антигена является высоким, когда антигены экспрессируются в нормальных тканях, цитотоксическая активность, опосредуемая ADCC и т.д., будет проявляться против нормальных клеток и, таким образом, побочные эффекты станут существенной проблемой. Таким образом, антигены, на которые нацелены терапевтические антитела, используемые в качестве лекарственных средств от злокачественной опухоли, предпочтительно представляют собой антигены, специфически экспрессирующиеся в злокачественных клетках. Например, молекулы антител против антигена EpCAM, который известен в качестве антигена злокачественной опухоли, считаются перспективными в качестве лекарственных средств от злокачественной опухоли. Однако, известно, что антиген EpCAM также экспрессируется в поджелудочной железе и было описано, что на практике введение антител против EpCAM в клинических испытаниях вызывало панкреатит в качестве побочного эффекта вследствие цитотоксической активности в отношении поджелудочной железы (непатентный документ 5).

После успеха фармацевтических препаратов на основе антител, которые проявляют цитотоксическую активность посредством активности ADCC, было описано второе поколение усовершенствованных молекул антител, которые проявляют выраженную цитотоксическую активность вследствие усиления активности ADCC посредством удаления фукозы из цепей сахаров N-типа в нативной Fc-области IgG1 человека (непатентный документ 6), усиления активности ADCC вследствие усиления связывания с FcγRIIIa посредством замены аминокислот в нативной Fc-области IgG1 человека (непатентный документ 7) и т.п. В качестве фармацевтических препаратов на основе антител, которые проявляют цитотоксическую активность против злокачественных клеток через механизм, отличный от упомянутой выше активности ADCC, опосредуемой NK-клетками, также описаны усовершенствованные молекулы антител, которые проявляют более выраженную цитотоксическую активность, такие как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с лекарственным средством, обладающим мощной цитотоксической активностью (непатентный документ 8), и низкомолекулярное антитело, которое проявляет токсическую активность против злокачественных клеток путем привлечения Т-клеток к злокачественным клеткам (непатентный документ 9).

Такие молекулы антител, обладающие более выраженной цитотоксической активностью, могут проявлять цитотоксическую активность в отношении злокачественных клеток, которые не обладают значительной экспрессией антигена, но, с другой стороны, они проявляют сходную цитотоксическую активность в отношении нормальных тканей с низкой экспрессией антигена. В действительности, по сравнению с цетуксимабом, который представляет собой природный IgG1 человека против антигена EGFR, EGFR-BiTE, который представляет собой биспецифическое антитело против CD3 и EGFR, может проявлять мощную цитотоксическую активность против злокачественных клеток путем привлечения Т-клеток к злокачественным клеткам и может проявлять противоопухолевые эффекты. С другой стороны, поскольку EGFR также экспрессируется в нормальных тканях, когда EGFR-BiTE вводили яванским макакам, возникали тяжелые побочные эффекты (непатентный документ 10). Более того, было показано, что биватузумаб мертанзин, представляющий собой ADC, полученный путем связывания мертанзина с антителом против CD44v6, которое на высоком уровне экспрессируется в злокачественных клетках, в клинической практике вызывает тяжелую кожную токсичность и токсичность в печени, поскольку CD44v6 также экспрессируется в нормальных тканях (непатентный документ 11).

Когда антитела, которые могут проявлять мощную цитотоксическую активность против злокачест-

венных клеток, обладающих низкой экспрессией антигена, используют как есть, антиген-мишень должен экспрессироваться в высокой степени специфическим для злокачественной опухоли образом. Однако, поскольку HER2 и EGFR, которые являются антигенами-мишенями герцептина и цетуксимаба, соответственно, также экспрессируются в нормальных тканях, полагают, что количество антигенов злокачественной опухоли, экспрессируемых в высокой степени специфическим для злокачественной опухоли образом, ограничено. Таким образом, хотя возможно усилить цитотоксическую активность против злокачественной опухоли, побочные эффекты вследствие цитотоксических действий против нормальных тканей могут стать проблемой.

Более того, недавно было показано, что ипилимумаб, который усиливает иммунитет опухоли путем ингибирования CTLA4, который участвует в иммуносупрессии в злокачественной опухоли, продлевает общую выживаемость метастатической меланомы (непатентный документ 12). Однако, поскольку ипилимумаб ингибирует CTLA4 системно, хотя иммунитет опухоли повышается, становится проблемой появление подобных аутоиммунным заболеваниям тяжелых побочных эффектов вследствие системной активации иммунной системы (непатентный документ 13).

С другой стороны, в качестве антительных фармацевтических препаратов против заболеваний, помимо злокачественной опухоли, известны антительные фармацевтические препараты, которые проявляют терапевтические эффекты путем ингибирования воспалительных цитокинов при воспалительных/аутоиммунных заболеваниях (непатентный документ 14). Например, Ремикейд и Хумира, которые нацелены на TNF, и Актемра, которая нацелена на IL-6R, проявляют высокие терапевтические эффекты против ревматоидного артрита, но, с другой стороны, системная нейтрализация этих цитокинов приводила к тому, что в качестве побочных эффектов наблюдали инфекцию (непатентный документ 15).

В качестве способов, которые можно использовать для антительных фармацевтических препаратов второго поколения, были разработаны различные способы. В то время как были описаны способы улучшения эффекторных функций, антигенсвязывающей способности, фармакокинетики и стабильности или способы снижения иммуногенных рисков (непатентный документ 16), почти нет сообщений о способах, которые обеспечивают специфическое для ткани-мишени действие антительных фармацевтических препаратов для преодоления таких побочных эффектов. Например, что касается очагов повреждения, таких как злокачественные ткани и воспаленные ткани, были описаны pH-зависимые антитела, которые используют кислые условия в этих тканях-мишенях (патентные документы 1 и 2). Однако снижение pH (т.е. увеличение концентрации ионов водорода) в злокачественных тканях и воспаленных тканях по сравнению с нормальными тканями является небольшим, и, поскольку трудно получить антитела, которые действуют путем обнаружения небольшого увеличения концентрации ионов водорода, которые имеют чрезвычайно малую молекулярную массу, и также, поскольку условия кислых значений pH могут быть найдены в нормальных тканях, таких как область резорбции кости остеокластами, и в тканях, отличных от представляющего интерес очага повреждения, использование условий pH в качестве специфического для очага повреждения фактора окружающей среды было расценено как имеющее множество проблем. С другой стороны, были описаны способы получения антител, которые проявляют антигенсвязывающую активность только после их расщепления протеазой, экспрессируемой в очагах повреждения, таких как злокачественные ткани и воспаленные ткани (патентный документ 3). Однако поскольку расщепление антител протеазами является необратимым, когда антитела, которые были расщеплены в очаге повреждения, входят в кровоток и возвращаются в нормальные ткани, они также могут связываться с антигенами в нормальных тканях, и это считается проблемой. Более того, также полагают, что специфичность к злокачественной опухоли таких протеаз также является проблемой, которую необходимо решать. Таким образом, способы, которые обеспечивают обратимое действие в областях воспаления или злокачественной опухоли (области повреждения) без системного действия в нормальных тканях и крови для проявления эффективности лекарственного средства, одновременно избегая побочных эффектов, не известны. Кроме того, способы контроля активности антител и фармакологических эффектов посредством неинвазивного введения экзогенных соединений неизвестны.

Документы уровня техники

Патентные документы

Патентный документ 1 WO 2003/105757

Патентный документ 2 WO 2012/033953

Патентный документ 3 WO 2010/081173

Непатентные документы

Непатентный документ 1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

Непатентный документ 2: The therapeutic antibodies market to 2008. Pavlou AK, Belsey MJ., Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

Непатентный документ 3: Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327

Непатентный документ 4: Differential responses of human tumor cell lines to anti-pl85HER2 monoclonal antibodies. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM, Cancer Immunol. Im-

munotherapy (1993) 37, 255-263

Непатентный документ 5: ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF, Clin. Cancer Res. (2004) 10 (22), 7555-7565

Непатентный документ 6: Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173

Непатентный документ 7: Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY., Drug Discov. Today (2007) 12 (21-22), 898-910

Непатентный документ 8: Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Alley SC, Okeley NM, Senter PD., Curr. Opin. Chem. Biol. (2010) 14 (4), 529-537

Непатентный документ 9: BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R., Curr. Opin. Mol. Ther. (2009) 11 (1), 22-30

Непатентный документ 10: T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2010) 107 (28), 12605-12610

Непатентный документ 11: Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhardt T, Gronau S., Oral Oncol. (2008) 44 (9), 823-829

Непатентный документ 12: Ipilimumab in the treatment of melanoma. Trinh VA, Hwu WJ., Expert Opin. Biol. Ther., (2012) Apr 14 (doi:10.1517/14712598.2012.675325)

Непатентный документ 13: IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW. Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A., Eur. J. Endocrinol. (2012) Apr 10 (doi: 10.1530/EJE-12-0167)

Непатентный документ 14: The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis. Takeuchi T, Kameda H., Nat. Rev. Rheumatol. (2010) 6 (11), 644-652

Непатентный документ 15: Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K., Valesini G., Hensor EM, Worthy G., Landewe R., Smolen JS, Emery P., Buch MH., Ann. Rheum. Dis. (2010) 69 (6), 976-986

Непатентный документ 16: Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Mol. Cells. (2005) 20 (1), 17-29

Сущность изобретения

Проблемы, решаемые с помощью изобретения

Ввиду описанного выше уровня техники, если бы было возможно получить антитела, связывание которых с антигеном-мишенью регулируется концентрацией низкомолекулярного соединения, продуцируемого или специфически присутствующего в ткани-мишени (далее называемые "антителами с низкомолекулярным переключателем"), такие антитела были бы в высокой степени полезными, поскольку они могли бы действовать обратимо на очаги повреждения, такие как области опухоли и области воспаления, и побочные эффекты могли бы быть предотвращены. Более того, если бы было возможно получить антитела, связывание которых с антигеном регулируется концентрацией неприродного соединения, такие антитела были бы в высокой степени полезными, поскольку их можно контролировать введением экзогенного соединения, которое активирует активность антитела и фармакологическое действие в очагах повреждения, или экзогенного соединения, которое может быть введено неинвазивным путем.

Однако отсутствуют сообщения о том, что такие антитела были получены общепринятыми способами, такими как способы иммунизации не являющихся человеком животных антигенами или способы с использованием библиотеки происходящих из человека или происходящих из не являющегося человеком животного антител.

Таким образом, существовало высокое желание предоставить антитела (антитела с низкомолекулярным переключателем), связывание которых с произвольным антигеном-мишенью регулируется концентрацией низкомолекулярного соединения, продуцируемого или специфически присутствующего в ткани-мишени, или неприродного соединения, и способы эффективного получения таких антител за короткий период времени.

Способы решения проблем

Авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования для решения описанных выше задач. В результате они получили антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации специфического для ткани-мишени соединения. Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антигенсвязывающие молекулы или фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы, пригодны для лечения заболеваний, которые происходят из ткани-мишени, и что они также

пригодны для лечения заболеваний, происходящих из тканей-мишеней, которое включает введение антигенсвязывающих молекул. Также они открыли, что антигенсвязывающие молекулы пригодны для изготовления фармацевтических препаратов для лечения заболеваний, которые происходят из тканей-мишеней.

Авторы настоящего изобретения также успешно продуцировали библиотеку, содержащую множество антигенсвязывающих молекул, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, где молекулы имеют антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, которое может вызвать варьирование активности связывания антигена антигенсвязывающей молекулой в зависимости от отличий окружающих факторов in vivo или в зависимости от введения неприродного соединения. Также они разработали способы скрининга и получения антигенсвязывающих молекул с использованием библиотеки, и, тем самым, осуществили настоящее изобретение.

Настоящее изобретение основано на таких открытиях и конкретно включает варианты осуществления, проиллюстрированные ниже.

Вариант осуществления 1.

Библиотека, которая содержит в основном:

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены молекул или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения.

Вариант осуществления 2.

Библиотека согласно варианту осуществления [1], которая продуцирована способом, включающим стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из от (i) до (iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры; и

(b) конструирование библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающие домены, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, указанных на стадии (a).

Вариант осуществления 3.

Библиотека согласно варианту осуществления [2], которую продуцируют способом, включающим стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из от (i) до (iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры;

(b) продуцирование множества вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающие домены, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких аминокислотных уча-

стках, идентифицированных на стадии (a);

(c) идентификация одной или нескольких модификаций аминокислот, которые по существу не изменяют активность связывания каждого из упомянутых выше вариантов с низкомолекулярным соединением; и

(d) продуцирование библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающие домены, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют одну или несколько модификаций аминокислот, указанных на стадии (c).

Вариант осуществления 4.

Библиотека согласно варианту осуществления [1], продуцированная способом, включающим стадии:

1) приведение в контакт библиотеки, содержащей множество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, с низкомолекулярным соединением; и

2) концентрирование из библиотеки нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения.

Вариант осуществления 5.

Библиотека согласно варианту осуществления [4], где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие молекулы, которые содержат вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи антитела, и где библиотека продуцирована способом, включающим одну из стадий:

1) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, из библиотеки согласно варианту осуществления [4], которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях тяжелой цепи;

2) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, из библиотеки согласно варианту осуществления [4], которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях легкой цепи; и

3) конструирование библиотеки путем комбинирования нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающую молекулу, концентрированных из каждой из библиотек вариабельных областей стадий 1) и 2).

Вариант осуществления 6.

Библиотека согласно любому из вариантов осуществления [1]-[5], где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой слитые полипептиды, полученные путем слияния антигенсвязывающего домена по меньшей мере с частью белка вирусной оболочки.

Вариант осуществления 7.

Библиотека согласно любому из вариантов осуществления [1]-[5], где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие молекулы, содержащие тяжелые цепи и легкие цепи антител, и библиотека, кроме того, включает стадию конструирования синтетической библиотеки тяжелых цепей и/или легких цепей.

Вариант осуществления 8.

Библиотека согласно варианту осуществления [7], где тяжелые цепи и/или легкие цепи антител содержат каркасную последовательность эмбрионального типа.

Вариант осуществления 9.

Библиотека согласно любому из вариантов [1]-[8], где упомянутое выше низкомолекулярное соединение представляет собой специфичное к ткани-мишени соединение или неприродное соединение.

Вариант осуществления 10.

Библиотека согласно любому из вариантов осуществления [1]-[9], где упомянутая выше ткань-мишень представляет собой злокачественную ткань или воспаленную ткань.

Вариант осуществления 11.

Библиотека согласно варианту осуществления [10], где соединение, специфичное к злокачественной ткани, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидов, которые имеют структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов метаболизма сахаров и никотинамида и его метаболитов.

Вариант осуществления 12.

Библиотека согласно любому из вариантов осуществления [1]-[11], где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозин-

трифосфат.

Вариант осуществления 13.

Библиотека согласно любому из вариантов осуществления [1]-[12], где аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, представляют собой участки, отличные от любой одной или нескольких из аминокислот, выбранных из указанных ниже:

H-цепь: 97, 100c, 101, 94, 95, 100d, 100e, 33, 50, 52, 56, 57, 58, 99, 100, 100a, 54, 55 (нумерация Kabat) и

L-цепь: 49, 55, 95c, 96, 95a, 95b (нумерация Kabat).

Вариант осуществления 14. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки согласно любому из вариантов осуществления [1]-[13] с антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) отбор антигенсвязывающего домена, который не связывается с антигеном на стадии (a) выше;

(c) приведение в контакт антигенсвязывающего домена, отобранного на стадии (b) выше, с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(d) отбор антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на стадии (c) выше;

(e) связывание полинуклеотида, который кодирует антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d) выше, с полинуклеотидом, который кодирует полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клетки, в которую введен вектор, с которым функционально связан полинуклеотид, полученный на стадии (e) выше; и

(g) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клетки, культивированной на стадии (f) выше.

Вариант осуществления 15.

Способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки согласно любому из вариантов осуществления [1]-[13] с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающего домена посредством диссоциации его с использованием низкомолекулярного соединения в более низкой концентрации, чем на стадии (a) выше;

(c) связывание полинуклеотида, который кодирует антигенсвязывающий домен, собранный на стадии (b) выше, с полинуклеотидом, который кодирует полипептид, содержащий Fc-область;

(d) культивирование клетки, в которую введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (c) выше, функционально связан; и

(e) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клетки, культивированной на стадии (d) выше.

Вариант осуществления 16.

Способ согласно варианту осуществления [14] или [15] для получения антигенсвязывающей молекулы, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который дополнительно включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки согласно любому из вариантов осуществления от [1] до [13] с низкомолекулярным соединением и

(b) отбор антигенсвязывающих доменов, собранных на стадии (a) выше.

Вариант осуществления 17.

Способ согласно любому из вариантов осуществления [14]-[16] для получения антигенсвязывающей молекулы, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

Вариант осуществления 18.

Антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации неприродного соединения.

Вариант осуществления 19.

Фармацевтическая композиция, которая содержит антигенсвязывающую молекулу согласно варианту осуществления [18].

Специалистам в данной области будет хорошо понятно, что настоящее изобретение включает любую комбинацию одного или нескольких вариантов осуществления, описанных выше, при условии, что это не является технически противоречивым обычным техническим знаниям специалистов в данной области.

Эффекты изобретения

Антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зави-

симости от концентрации низкомолекулярного соединения, и фармацевтические композиции, содержащие их, не действуют системно в крови или в нормальных тканях; однако посредством действия обратимо в очагах повреждения, таких как злокачественные опухоли или области воспаления в тканях-мишенях, они демонстрируют терапевтическую эффективность, одновременно избегая побочных эффектов, и могут лечить заболевания, возникшие в тканях-мишенях.

Более того, с использованием библиотек по настоящему изобретению, содержащих множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, которые содержат антигенсвязывающий домен и имеют отличающиеся друг от друга последовательности, и антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, можно эффективно получить различные антигенсвязывающие молекулы, пригодные для лечения тканеспецифических заболеваний, таких как заболевания, описанные выше, в течение короткого периода времени.

В варианте осуществления библиотек по настоящему изобретению аминокислотные участки в доменах антигенсвязывающих молекул, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением, идентифицируют и конструируют библиотеку, чтобы она содержала нуклеиновые кислоты, которые кодируют антигенсвязывающие домены, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, так что аминокислоты в идентифицированных участках преобразуются в от одного до нескольких типов аминокислот. Это приводит к библиотеке, которая может обеспечить антигенсвязывающие молекулы, антигенсвязывающая способность которых варьируется в присутствии соединения, более эффективно, чем с использованием библиотеки антител, происходящих из человека или не являющихся человеком животных, и способа иммунизации не являющихся человеком млекопитающих.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что антитело с низкомолекулярным переключателем не связывается с антигенами в нормальных условиях, когда низкомолекулярные соединения не присутствуют, однако связывается с антигенами в ткани-мишени, в которой низкомолекулярные соединения присутствуют в высокой концентрации.

На фиг. 2 показано, что низкомолекулярные соединения функционируют в качестве переключателя, вследствие размещения между антителом с низкомолекулярным переключателем и антигеном. Если низкомолекулярное соединение отсутствует, взаимодействие антитело-антиген является недостаточным и антитело не может связываться с антигеном, однако если низкомолекулярное соединение присутствует, антитело может связываться с антигеном вследствие наличия низкомолекулярного соединения, расположенного между антителом и антигеном.

На фиг. 3 показана структура 2'-аденозин-PEG-пептида, который является аналогом аденозина, использованным для иммунизации кроликов.

На фиг. 4 представлена структура 5'-аденозин-PEG-пептида, который представляет собой аналог аденозина, использованный для иммунизации кроликов.

На фиг. 5 представлена структура 2'-аденозин-PEG-биотина, полученного путем замены биотина пептидной частью аналога аденозина, использованного для иммунизации кроликов.

На фиг. 6 представлена структура 5'-аденозин-PEG-биотина, полученного путем замены биотина пептидной частью аналога аденозина, использованного для иммунизации кроликов.

На фиг. 7 представлены результаты сравнения активности связывания 2'-аденозин-PEG-биотина у индивидуальных антител, полученных путем клонирования B-клеток кролика. На вертикальной оси представлена величина (N_связывание_100), полученная путем деления количества каждого антитела, связанного при взаимодействии с 2'-аденозин-PEG-биотином, на уровень улавливания (RU) каждого антитела, и на горизонтальной оси представлена величина (N стабильность 100), полученная путем деления величины, полученной через 60 с после диссоциации 2'-аденозин-PEG-биотина от каждого антитела, после его взаимодействия с 2'-аденозин-PEG-биотином, на уровень улавливания (RU) каждого антитела.

На фиг. 8A представлены сенсограммы, полученные в анализах на основе поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон SMB0002 связывается (взаимодействует) с аденозином. На сенсограммах показаны взаимодействия между SMB0002 и аденозином при 100 (в двух экземплярах), 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,13 нМ в нисходящем порядке.

На фиг. 8B представлены сенсограммы, полученные в анализах на основе поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон SMB0002 связывается (взаимодействует) с ATP. На сенсограммах показаны взаимодействия между SMB0002 и ATP при 5000, 1250, 313 и 78,1 нМ в нисходящем порядке.

На фиг. 9 показаны результаты конкурентного ELISA, демонстрирующие, что клон SMB0002 связывается с аденозином и ATP.

На фиг. 10A показаны сенсограммы анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон SMB0002 связывается (взаимодействует) с AMP. Сенсограммы демонстрируют взаимодействия между SMB0002 и AMP при 500, 250 (в двух экземплярах), 125, 62,5, 31,3, 15,6 и 7,81 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 10B показаны сенсограммы анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон SMB0002 связывается (взаимодействует) с ADP. Сенсограммы демонстриру-

ют взаимодействия между SMB0002 и ADP при 2000, 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 125, 62,5 и 31,3 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 11A показан способ связывания между антителом SMB0002 и частью аденозина, представляющей собой адениновой кольцо. На фигуре жирные линии показывают H-цепь и тонкие линии показывают L-цепь антитела, и аденозин показан с помощью шаростержневой модели. Аминокислотные остатки на расстояниях 3,8Å или менее от аденинового кольца показаны с помощью стержневой модели. Пунктирными линиями показаны водородные связи, имеющие расстояние 3,2Å или менее между антителом и частью в виде аденинового кольца.

На фиг. 11B показан способ связывания между антителом SMB0002 и частью аденозина, представляющей собой рибозу. На фигуре жирные линии показывают H-цепь и тонкие линии показывают L-цепь антитела, и аденозин показан с помощью шаростержневой модели. Аминокислотные остатки на расстояниях 3,8Å или менее от рибозной части показаны с помощью стержневой модели. Пунктирными линиями показаны водородные связи, имеющие расстояние 3,2Å или менее между антителом и рибозной частью. Область в пределах пунктирных линий показывает область спрогнозированного присутствия фосфатной группы в связанном с AMP состоянии.

На фиг. 12 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что гуманизированное SMB0002 связывается (взаимодействует) с аденозином. На сенсограммах показаны взаимодействия между гуманизированным SMB0002 и аденозином при 200, 100, 50 (в двух экземплярах), 25, 12,5, 6,25 и 3,125 нМ в нисходящем порядке.

На фиг. 13 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что гуманизированное SMB0002 связывается (взаимодействует) с AMP. На сенсограммах показаны взаимодействия между гуманизированным SMB0002 и AMP при 500, 250, 125 (в двух экземплярах), 62,5, 31,3, 15,6 и 7,8 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 14 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что гуманизированное SMB0002 связывается (взаимодействует) с ADP. На сенсограммах показаны взаимодействия между гуманизированным SMB0002 и ADP при 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 125 и 62,5 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 15 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что гуманизированное SMB0002 связывается (взаимодействует) с ATP. На сенсограммах показаны взаимодействия между гуманизированным SMB0002 и ATP при 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 125 и 62,5 мкМ в нисходящем порядке.

Фиг. 16 представляет собой фигуру, демонстрирующую результат ELISA для связывания клона 6RNMSC1-2_F02 с IL-6R человека. На вертикальной оси представлены величины поглощения, которые оценивают активность связывания антитела с IL-6R человека в присутствии или в отсутствие каждого низкомолекулярного соединения.

На фиг. 17 представлена фигура, демонстрирующая результат ELISA для связывания клона 6RNMSC1-3_GO2 с IL-6R человека. На вертикальной оси представлены величины поглощения, которые оценивают активность связывания антитела с IL-6R человека в присутствии или в отсутствие каждого низкомолекулярного соединения.

Фиг. 18 представляет собой фигуру, демонстрирующую результат ELISA для связывания антитела с IL-6R человека. На вертикальной оси представлены величины поглощения, которые оценивают активность связывания антитела с IL-6R человека в присутствии или в отсутствие каждой аминокислоты или метаболита аминокислоты.

На фиг. 19 представлены сенсограммы, демонстрирующие взаимодействие между 6RNMSC1-2_F02 и 1 мкмоль/л IL-6R в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, в присутствии 10 ммоль/л ATP, и в отсутствие кинуренина и ATP. Сплошная линия указывает на взаимодействие в присутствии кинуренинаа, точечная линия указывает на взаимодействие в присутствии ATP, и пунктирной линией указано взаимодействие в их отсутствие.

На фиг. 20 представлен график, полученный путем позволения 6RNMSC1-2_F02 взаимодействовать с IL-6R, иммобилизованном на сенсорном чипе CM5, в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, а затем наблюдения диссоциации 6RNMSC1-2_F02 от IL-6R в условиях буфера, содержавшего 100 мкмоль/л кинуренина, или в условиях буфера, который не содержал кинуренина. На фигуре на вертикальной оси представлены величины, нормализованные путем определения количества 6RNMSC1-2_FO2, связавшегося в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, как 100, и на горизонтальной оси представлен отрезок времени (в секундах) от начала взаимодействия. Сплошной линией указана диссоциация 6RNMSC1-2_F02 от IL-6R в присутствии кинуренина, и пунктирной линией показана диссоциация 6RNMSC1-2_F02 от IL-6R в отсутствие кинуренина.

На фиг. 21 представлен график, полученный путем позволения 5 мкг/л 6RNMSC1-2_F02 взаимодействовать в качестве анализируемого соединения в течение 180 секунд, и оценки ответа на IL-6R, иммобилизованный на сенсорном чипе CM5. На вертикальной оси представлено изменение ответа (RU) до и после взаимодействия с 6RNMSC1-2_F02, и на горизонтальной оси представлена концентрация (мкмоль/л) кинуренина, содержащегося в растворе.

На фиг. 22 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон 6RNMSC1-2_F02 связывается (взаимодействует) с кинуренином. На сенсограммах показаны взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02 и кинуренином при 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 и 0,039 мМ в нисходящем порядке. Параметры кинетики представляют собой ka=709 (1/c), kd=0,17 (1/c) и KD=0,239 (ммоль/л).

На фиг. 23 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон 6RNMSC1-2_F02 связывается (взаимодействует) с 3-гидрокси-DL-кинуренином. На сенсограммах показаны взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02 и 3-гидрокси-DL-кинуренином при 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 и 0,039 мМ в нисходящем порядке.

На фиг. 24 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон 6RNMSC1-2_F02 связывается (взаимодействует) с соединением RO0635389-000-001. На сенсограммах показаны взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02 и соединением RO0635389-000-001 при 0,625, 0,313 и 0,156 мМ в нисходящем порядке.

На фиг. 25 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон 6RNMSC1-2_F02 связывается (взаимодействует) с соединением RO0635390-000-001. На сенсограммах показаны взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02 и соединением RO0635390-000-001 при 0,625, 0,313 и 0,156 мМ в нисходящем порядке.

На фиг. 26 показаны сенсограммы Octet, демонстрирующие, что связывание (взаимодействие) клона 6RNMSC1-2_F02 с IL6R варьируется в зависимости от присутствия (сплошная линия) или отсутствия (пунктирная линия) кинуренина. На вертикальной оси показан ответ на IL6R.

На фиг. 27 показаны сенсограммы Octet, демонстрирующие, что связывание (взаимодействие) клона 6RNMSC1-2_F02 с IL6R варьируется в зависимости от присутствия (сплошная линия) или отсутствия (пунктирная линия) 3-гидрокси-DL-кинуренина. На вертикальной оси показан ответ на IL6R.

На фиг. 28 показаны сенсограммы Octet, демонстрирующие, что связывание (взаимодействие) клона 6RNMSC1-2_F02 с IL6R варьируется в зависимости от присутствия (сплошная линия) или отсутствия (пунктирная линия) соединения RO0635389-000-001. На вертикальной оси показан ответ на IL6R.

На фиг. 29 показаны сенсограммы Octet, демонстрирующие, что связывание (взаимодействие) клона 6RNMSC1-2_F02 с IL6R варьируется в зависимости от присутствия (сплошная линия) или отсутствия (пунктирная линия) соединения RO0635390-000-001. На вертикальной оси показан ответ на IL6R.

На фиг. 30 показан способ связывания между Fab-фрагментом 6RNMSC1-2_F02 и кинуренином. На фигуре жирными линиями показана H-цепь и тонкими линиями показана L-цепь антитела, и кинуренин показан посредством шаростержневой модели. Аминокислотные остатки на расстояниях 3,8 Å или менее от кинуренина показаны с помощью стержневой модели. Пунктирные линии указывают на водородные связи или электростатические взаимодействия, имеющие расстояние 3,3 Å или менее между антителом и кинуренином.

На фиг. 31 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что вариант H49Y клона 6RNMSC1-2_F02 связывается (взаимодействует) с кинуренином. На сенсограммах показаны взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02H49Y и кинуренином при 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 и 0,039 мМ в нисходящем порядке. Параметры кинетики представляют собой ka=2543 (1/c), kd=0,24 (1/c), KD=0,095 (ммоль/л).

На фиг. 32 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон F02h011/F021003, который получен путем внесения мутаций в каркасную последовательность 6RNMSC1-2_F02 для восстановления последовательности эмбрионального типа, связывается (взаимодействует) с кинуренином. Сенсограммы показывают взаимодействия между F02h011/F021003 и кинуренином при 1000, 500, 250, 125 и 62,5 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 33 показаны сенсограммы анализа на основе поверхностно-плазмонного резонанса, демонстрирующие, что клон F02h011/F021098, который получен путем внесения модификаций, которые усиливают связывание кинуренина, в F02h011/F021003, связывается (взаимодействует) с кинуренином. На сенсограммах показаны взаимодействия между F02h011/F021098 и кинуренином при 500, 250, 125, 62,5, 31,3 и 15,6 мкМ в нисходящем порядке.

На фиг. 34 показан способ связывания между Fab-фрагментом 6RNMSC1-2_F02 и кинуренином. На фигуре жирные черные линии показывают тяжелую цепь и тонкие серые линии показывают легкую цепь антитела и кинуренин показан посредством шаростержневой модели. Аминокислотные остатки на расстоянии 4,2 Å или менее от кинуренина показаны с помощью стержневой модели.

На фиг. 35 показан способ связывания между Fab-фрагментом 6RNMSC1-2_F02 и кинуренином. На фигуре жирными черными линиями показана тяжелая цепь и тонкими серыми линиями показана легкая цепь антитела, и кинуренин показан с помощью шаростержневой модели. Ser56 легкой цепи (нумерация Kabat) показан с помощью стержневой модели. Пунктирной линией и числом на пунктирной линии показано наименьшее расстояние между неводородными атомами легкой цепи Ser56 и кинуренина.

На фиг. 36 показан способ связывания между Fab-фрагментом 6RNMSC1-2_F02 и кинуренином. На фигуре жирными черными линиями показана тяжелая цепь и тонкими серыми линиями показана легкая цепь антитела, и кинуренин показан с помощью шаростержневой модели. Gly50 тяжелой цепи и Asp28

легкой цепи (нумерация Kabat) показаны с помощью стержневой модели.

На фиг. 37 представлен график, демонстрирующий уровень связывания (ответ связывания (RU)), когда 1 мкМ каждого клона подвергали взаимодействию с IL-6R, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5, в течение 120 с в присутствии или в отсутствие каждого из низкомолекулярных соединений при 1 мМ.

На фиг. 38 представлен график, демонстрирующий уровень связывания (ответ связывания (RU)), когда 10 мкМ каждого клона подвергали взаимодействию с IL-6R, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5, в течение 120 с в присутствии или в отсутствие каждого из низкомолекулярных соединений при 1 мМ.

На фиг. 39 показаны результаты ELISA, проведенного на клонах, полученного с помощью кинурениновой библиотеки Ver.A, 6RFHm12-4_040, 6RFHm12-4_078, 6RFHm14-4_087, 6RFHm14-4_093, 6RFHm17-4_006 и 6RFHm17-4_010 против hIL-6R в соответствующих условиях. 6RNMSC1-2_F02 использовали в качестве положительного контроля. На вертикальной оси показаны величины поглощения для оценки активности антител в отношении связывания hIL-6. Детали соответствующих условий показаны в табл. 38.

На фиг. 40 показаны результаты ELISA, проведенного на клонах, полученных с помощью кинурениновой библиотеки Ver.A, hIAFHm12-4_018, hIAFHm12-4_061, hIAFHm14-4_001, hIAFHm14-4_041, hIAFHm17-4_026 и hIAFHm17-4_072 против hIgA-Fc в соответствующих условиях. На вертикальной оси показаны величины поглощения для оценки активности антител в отношении связывания hIgA-Fc. Детали соответствующих условий показаны в табл. 41.

На фиг. 41 показаны результаты ELISA, проведенного на клонах, полученных с помощью кинурениновой библиотеки Ver.A, I6FHm12-4_068, I6FHm12-4_094, I6FHm14-4_007, I6FHm14-4_030, I6FHm17-4_016 и I6FHm17-4_036 против hIL-6 в соответствующих условиях. На вертикальной оси показаны величины поглощения для оценки активности антител в отношении связывания hIL-6. Детали соответствующих условий показаны в табл. 44.

На фиг. 42 показан график, который оценивает способность ATP ингибировать связывание ATNLSA1-4_D12 с меченным биотином антигеном (смесь 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина).

На фиг. 43 представлена фигура, демонстрирующая принцип рационально сконструированной библиотеки антител, которая может обеспечить антитела с низкомолекулярным переключателем против любого антигена, где библиотека получена из частей вариабельных областей антител, которые контактируют с антигеном, и низкомолекулярное соединение располагается между антителами и антигеном в качестве переключателя.

На фиг. 44 показаны результаты ELISA, проведенного для клона I6RLSA1-6_011, который был получены из рационально сконструированной библиотеки антител с использованием ATP/аденозинсвязывающих антител в качестве матрицы, против IL-6 человека в присутствии или в отсутствие ATP и аденозина при 10 мМ. На вертикальной оси показана величина поглощения для оценки активности антитела в отношении связывания IL-6 человека. Клон, который демонстрирует активность связывания IL-6 человека независимо от присутствия или отсутствия низкомолекулярного соединения, который был получен из рационально сконструированной библиотеки антител, использовали в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали фаг-помощник M13KO7.

На фиг. 45 показаны результаты ELISA, проведенного для клонов 6RRLSA1-6_037 и 6RRLSA1-6_045, которые были получены из рационально сконструированной библиотеки антител с использованием ATP/аденозинсвязывающих антител в качестве матрицы, против рецептора IL-6 человека в присутствии или в отсутствие ATP и аденозина при 10 мМ. На вертикальной оси показана величина поглощения для оценки активности антитела в отношении связывания рецептора IL-6 человека. В качестве отрицательного контроля использовали фаг-помощник M13KO7 (показан как nega на фигуре).

На фиг. 46 показан результат ELISA, проведенного для клона HSADSA1-6_020, полученного из рационально сконструированной библиотеки антител, в которой в качестве матрицы использовались антитела, которые связывают ATP/аденозин, против HSA в присутствии или в отсутствие ATP и аденозина при 10 мМ. На вертикальной оси показана величина поглощения, которая оценивает активность связывания антитела с HSA. В качестве положительного контроля использовали клон, полученный из рационально сконструированной библиотеки антител и демонстрирующий активность связывания с HSA независимо от присутствия низкомолекулярных соединений. В качестве отрицательного контроля использовали фаг-помощник M13KO7.

Способы осуществления изобретения

Определения и подробное описание, приведенные ниже, предоставлены для облегчения понимания настоящего изобретения, проиллюстрированного в настоящем описании.

Аминокислоты

В рамках настоящего изобретения аминокислоты описаны с помощью однобуквенного или трехбуквенного кодов или обоих из них, например Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I или Val/V.

Изменение аминокислот

Для изменения аминокислот в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы можно соответствующим образом использовать известные способы, такие как способы сайт-направленного мутагенеза (Kunkel et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) и перекрывающаяся ПЦР. Более того, также в качестве способов изменения можно использовать несколько известных способов аминокислот для замены на неприродные аминокислоты (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249 и Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357). Например, является пригодным использование бесклеточной системы трансляции (Clover Direct (Protein Express)), включающей тРНК, в которой неприродная аминокислота связана с комплементарной амбер-супрессорной тРНК одного из стоп-кодонов, кодона UAG (амбер-кодон).

В настоящем описании значение термина "и/или" при описании участка изменения аминокислот, включает каждую комбинацию, где "и" и "или" пригодным образом скомбинированы. В частности, например, "аминокислоты в положениях 33, 55 и/или 96 являются замещенными" включают следующие варианты аминокислотных изменений: аминокислота(ы) в (a) положении 33, (b) положении 55, (c) положении 96, (d) положениях 33 и 55, (e) положениях 33 и 96, (f) положениях 55 и 96, и (g) положениях 33, 55 и 96.

Более того, в настоящем описании в качестве выражения, демонстрирующего изменение аминокислот, можно соответствующим образом использовать выражение, которое демонстрирует, до и после номера, указывающего на конкретное положение, однобуквенные или трехбуковенные коды для аминокислот до и после изменения, соответственно. Например, изменение N100bL или Asn100bLeu, используемое при замене аминокислоты, содержащейся в вариабельной области антитела, указывает на замену Asn в положении 100b (в соответствии с нумерацией Kabat) на Leu. Иными словами, номер показывает положение аминокислоты в соответствии с нумерацией Kabat, однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты до номера указывает на аминокислоту до замены, и однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты после номера указывает на аминокислоту после замены. Аналогично, изменение P238D или Pro238Asp, используемое при замене аминокислоты Fc-области, содержащейся в константной области антитела, указывает на замену Pro в положении 238 (в соответствии с нумерацией EU) на Asp. Иными словами, номер демонстрирует положение аминокислоты в соответствии с нумерацией EU, однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты до номера указывает на аминокислоту до замены, и однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты после номера указывает на аминокислоту после замены.

Антигены

В рамках настоящего изобретения, "антигены" конкретно не ограничены их структурой, при условии, что они содержат эпитопы, с которыми связываются антигенсвязывающие домены. Иными словами, антигены могут представлять собой неорганические или органические вещества. Другие антигены включают, например, приведенные ниже молекулы: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-H3O-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозина A1, A33, ACE, ACE-2, активин, активин A, активин AB, активин B, активин C, активин RIA, активин RIA ALK-2, активин RIB ALK-4, активин RIIA, активин RUB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адрессин, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7,альфа-1-антитрипсин, антагонист альфа-V/бета-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический пептид, интегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, стимулирующий B-лимфоциты фактор (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, остеогенин BMP-3, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, бомбезин, нейротрофический фактор костей, BPDE, BPDE-ДНК, BTC, фактор комплемента 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонин, cAMP, карциноэмбриональный антиген (CEA), ассоциированный со злокачественной опухолью антиген, катепсин A, катепсин B, катепсин C/DPPI, катепсин D, катепсин E, катепсин H, катепсин L, катепсин O, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CC1, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 белок), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, ботулинический токсин, токсин Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, галектин-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, цитокератиновый, ассоциированный с опухолью антиген, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, регуляторный фактор комплемента (фактор, ускоряющий распад), дез-(1-3)-IGF-I (IGF-1 головного моз-

га), Dhh, дигоксин, DNAM-1, ДНК-аза, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, рецептор эндотелина, энкефалиназа, eNOS, Eot, эотаксин 1, EpCAM, эфрин B2/EphB4, EPO, ERCC, Е-селектин, ET-1, фактор IIa, фактор VII, фактор VIIIc, фактор IX, активирующий фибробласты белок (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фоликулостимулирующий гормон, фракталкин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (миостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-альфа 1, GFR-альфа 2, GFR-альфа 3, GITR, глюкагон, Glut4, гликопротеин IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, рилизинг-фактор гормона роста, гаптен (NP-cap или NIP-cap), HB-EGF, HCC, гликопротеин оболочки HCMV gB, гликопротеин оболочки HCMV gH, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Hep B gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный, ассоциированный с меланомой антиген (HMW-MAA), gp120 HIV, петля V3 gp 120 IIIB HIV, HLA, HLA-DR, HM1,24, HMFG PEM, HRG, Hrk, сердечный миозин человека, цитомегаловирус человека (HCMV), гормон роста человека (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, IGF-связывающий белок, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-23, IL-27, интерферон (INF)-альфа, INF-бета, INF-гамма, ингибин, iNOS, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин альфа 2, интегрин альфа 3, интегрин альфа 4, интегрин альфа 4/бета 1, интегрин альфа 4/бета 7, интегрин альфа 5 (альфа V), интегрин альфа 5/бета 1, интегрин альфа 5/бета 3, интегрин альфа 6, интегрин бета 1, интегрин бета 2, интерферон-гамма, IP-10, I-TAC, JE, калликреин 2, калликреин 5, калликреин 6, калликреин 11, калликреин 12, калликреин 14, калликреин 15, калликреин L1, калликреин L2, калликреин L3, калликреин L4, KC, KDR, фактор роста кератиноцитов (KGF), ламинин 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), латентный TGF-1, латентный TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, lefty, антиген Lewis-Y, ассоциированный с Lewis-Y антиген, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопротеин, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, белок поверхности легких, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина-бета, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, металлопротеиназы, рецептор MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-альфа, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, мюллерово ингибиторное вещество, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C адгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, неприлизин, нейротрофин -3, -4 или -6, нейротурин, фактор роста нервов (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, pl50, p95, PADPr, паратиреоидный гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP), PlGF, PLP, PP14, проинсулин, прорелаксин, белок C, PS, PSA, PSCA, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, А-цепь релаксина, В-цепь релаксина, ренин, F респираторно-синцитиального вируса (RSV), RSV Fgp, Ret, ревматоидный фактор, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, сывороточный альбумин, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (ассоциированный с опухолью гликопротеин-72), TARC, TCA-3, Т-клеточный рецептор (например, Т-клеточный рецептор альфа/бета), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, PLAP-подобная щелочная фосфатаза семенников, TfR, TGF, TGF-альфа, TGF-бета, панспецифический TGF-бета, TGF-бета RI (ALK-5), TGF-бета RII, TGF-бета RIIb, TGF-бета RIII, TGF-бета 1, TGF-бета 2, TGF-бета 3, TGF-бета 4, TGF-бета 5, тромбин, Ck-1 тимуса, тиреостимулирующий гормон, Tie, TIMP, TIQ, тканевой фактор, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-альфа, TNF-альфа/бета, TNF-бета 2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF1°C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (лиганд Apo-2 TRAIL, TL2), TNFSF11 (лиганд TRANCE/RANK ODF, лиганд OPG), TNFSF12 (лиганд TWEAK Apo-3, лиганд DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (лиганд LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (лиганд GITR лиганда AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a конектин, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (лиганд OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (лиганд CD40 CD154, gp39,

HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas-лиганд лиганда Apo-1, лиганд APT1), TNFSF7 (CD27-лиганд CD70), TNFSF8 (CD30-лиганд CD153), TNFSF9 (лиганд 4-1BB лиганда CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TLR1 (Toll-подобный рецептор 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, ассоциированный с опухолью антиген CA125, ассоциированный с опухолью антиген, экспрессирующий ассоциированные с Lewis-Y углеводы, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VE-кадгерин-2, VEFGR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, вирусные антигены, VLA, VLA-1, VLA-4, интегрин VNR, фактор фон Виллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, Aβ, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, окисленный LDL, PCSK9, прекалликреин, RON, TMEM16F, SOD1, хромогранин A, хромогранин B, белок тау, VAP1, высокомолекулярный кининоген, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, фактор B, фактор D, фактор H, пропердин, склеростин, фибриноген, фибрин, протромбин, тромбин, тканевой фактор, фактор V, фактор Va, фактор VII, фактор VIIa, фактор VIII, фактор Villa, фактор IX, фактор IXa, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактор XIa, фактор XII, фактор XIIa, фактор XIII, фактор XIIIa, TFPI, антитромбин III, EPCR, тромбомодулин, TAPI, tPA, плазминоген, плазмин, PAI-1, PAI-2, GPC3, синдекан-1, синдекан-2, синдекан-3, синдекан-4, LPA и S1P; и рецепторы для гормонов и факторов роста. Предпочтительными антигенами являются антигены, которые экспрессируются в злокачественных клетках, иммунных клетках, стромальных клетках и т.п., присутствующих в злокачественных тканях или воспалительных тканях.

Хотя рецепторы приведены в качестве примеров упомянутых выше антигенов, когда эти рецепторы существуют в растворимых формах в биологических жидкостях, их также можно использовать в качестве антигенов, которые связываются с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфичного к ткани-мишени соединения). Примером неограничивающего варианта осуществления такого растворимого рецептора является растворимый IL-6R, который представляет собой белок, состоящий из аминокислот в положениях 1-357 в полипептидной последовательности IL-6R SEQ ID NO: 1, как описано в Mullberg et al. (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968).

Молекулы мембранного типа, экспрессируемые на клеточных мембранах, и растворимые молекулы, секретируемые из клеток наружу, входят в примеры упомянутых выше антигенов. Когда антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации специфичного к ткани-мишени соединения, связывается с растворимой молекулой, секретируемой из клеток, предпочтительно, чтобы антигенсвязывающая молекула обладала нейтрализующей активностью, как описано ниже.

Жидкости, в которых существуют растворимые молекулы, не ограничены, и растворимые молекулы могут существовать в биологических жидкостях или, более конкретно, во всех жидкостях, заполняющих пространство между тканями и клетками или сосуды в организмах. В неограничивающем варианте осуществления растворимые молекулы, с которыми связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, могут присутствовать во внеклеточной жидкости. У позвоночных внеклеточная жидкость является общим термином для плазмы, интерстициальной жидкости, лимфы, плотной соединительной ткани, цереброспинальной жидкости, спинномозговой жидкости, жидкости пунктата, синовиальной жидкости или сходных компонентов в кости и хряще, альвеолярной жидкости (жидкость бронхоальвеолярного лаважа), перитонеальной жидкости, плевральной жидкости, перикардиального выпота, жидкости кисты, водянистой влаги (внутриглазная жидкость) или сходных трансцеллюлярных жидкостей (различные жидкости в полостях желез и жидкости в полости пищеварительного тракта и другие жидкости полостей тела, продуцированные в результате активного транспорта/секреторной активности клеток).

Когда антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, содержащая антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфичного к ткани-мишени соединения), связывается с молекулой мембранного типа, экспрессируемой на клеточной мембране, подходящие примеры антигенсвязывающей молекулы включают антигенсвязывающие молекулы, которые обладают цитотоксической активностью, связываются с цитотоксическим веществом или обладают способностью связываться с цитотоксическим веществом, как описано ниже. Более того, антигенсвязывающие молекулы, обладающие нейтрализующей активностью вместо свойств наличия цитотоксической активности, связывающиеся с цитотоксическим веществом или обладающие способностью связываться с цитотоксическим веществом; или в дополнение к этим свойствам, также являются пригодными примерами неограничивающего варианта осуществления.

Эпитопы

"Эпитоп" означает антигенную детерминанту в антигене и относится к антигенному центру, с которым связывается антигенсвязывающий домен антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем описании. Таким образом, например, эпитоп может быть определен в соответствии с его структурой. Альтернативно эпитоп может быть определен в соответствии с антигенсвязывающей активностью антигенсвязывающей молекулы, которая распознает эпитоп. Когда антиген представляет собой пептид или полипептид, эпитоп может быть указан с помощью аминокислотных остатков, образующих эпитоп. Альтернативно, когда эпитоп представляет собой цепь сахара, эпитоп может быть указан с помощью его определенной структуры цепи сахаров.

Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, который содержит эпитоп, в котором распознается его первичная аминокислотная последовательность. Такой линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере три и наиболее часто по меньшей мере пять, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 или 6-20 аминокислот в конкретной последовательности.

В противоположность линейному эпитопу "конформационный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность, содержащая эпитоп, не является единственной детерминантой распознаваемого эпитопа (например, первичная аминокислотная последовательность конформационного эпитопа не обязательно распознается определяющим эпитоп антителом). Конформационные эпитопы могут содержать большее количество аминокислот по сравнению с линейными эпитопами. Антитело, распознающее конформационный эпитоп, распознает трехмерную структуру пептида или белка. Например, когда молекула белка сворачивается и формирует трехмерную структуру, аминокислоты и/или основные цепи полипептида, которые образуют конформационный эпитоп, располагаются рядом друг с другом, и эпитоп становится распознаваемым для антитела. Способы определения конформаций эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию, двумерный ядерный магнитный резонанс, сайт-специфическое спиновое мечение и электронный парамагнитный резонанс, но они не ограничиваются ими (См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), Vol. 66, Morris (ed.)).

Структуру антигенсвязывающего домена, который связывается с эпитопом, называют паратопом. Эпитоп и паратоп стабильно связываются через воздействие водородных связей, электростатических сил, ванд-дер-ваальсовых сил, гидрофобных связей и т.п. между эпитопом и паратопом. Эту прочность связывания между эпитопом и паратопом называют аффинностью. Общая суммарная прочность связывания, когда связывается множество антигенов и множество антигенсвязывающих молекул, называется авидностью. Когда антитело, содержащее множество антигенсвязывающих доменов (т.е. поливалентное антитело), или сходное с ним связывается с множеством эпитопов, аффинность действует синергично, и, таким образом, авидность становится более высокой, чем аффинность.

Активность связывания

Примеры способа оценки связывания эпитопа исследуемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, описаны ниже. В соответствии с примерами ниже, также можно соответствующим образом выполнять способы оценки связывания эпитопа исследуемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен, с антигеном, отличным от IL-6R.

Например, то, что исследуемая антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен для IL-6R, распознает линейный эпитоп в молекуле IL-6R, можно подтвердить, например, как описано ниже. Для указанной выше цели синтезируют линейный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен IL-6R. Пептид можно синтезировать химически или его можно получать способами генетической инженерии с использованием области, кодирующей аминокислотную последовательность, соответствующую внеклеточному домену в кДНК IL-6R. Затем исследуемую антигенсвязывающую молекулу, содержащую антигенсвязывающий домен для IL-6R, оценивают в отношении ее активности связывания с линейным пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен. Например, иммобилизованный линейный пептид можно использовать в качестве антигена в ELISA для оценки активности связывания антигенсвязывающей молекулы с пептидом. Альтернативно активность связывания с линейным пептидом можно оценивать, исходя из уровня, на котором линейный пептид ингибирует связывание антигенсвязывающей молекулы с клетками, экспрессирующими IL-6R. Эти исследования могут продемонстрировать активность связывания антигенсвязывающей молекулы с линейным пептидом.

Наличие распознавания исследуемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, конформационного эпитопа можно оценивать следующим образом. Для указанной выше цели получают экспрессирующие IL-6R клетки. Наличие распознавания исследуемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен IL-6R, конформационного эпитопа, можно определять, когда она прочно связывается с экспрессирующими IL-6R клетками при контакте, но по существу не связывается с иммобилизованным линейным пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен IL-6R. В рамках настоящего изобретения "по существу не связывает" означает, что активность связывания составляет 80% или менее, как правило,

50% или менее, предпочтительно 30% или менее, и особенно предпочтительно 15% или менее по сравнению с активностью связывания с клетками, экспрессрующими IL-6R человека.

Способы оценки активности связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, с экспрессирующими IL-6R клетками, включают, например, способы, описанные в Antibodies: A Laboratory Manual (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420). В частности, оценку можно проводить на основе принципа ELISA или активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) с использованием в качестве антигена экспрессирующих IL-6R клеток.

В формате ELISA активность связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, с экспрессирующими IL-6R клетками можно оценивать количественно путем сравнения уровней сигнала, генерируемого ферментативной реакцией. В частности, исследуемый полипептидный комплекс добавляют в планшет для ELISA, на котором иммобилизованы экспрессирующие IL-6R клетки. Затем антигенсвязывающую молекулу, связанную с клетками, выявляют с использованием меченного ферментом антитела, которое распознает исследуемую антигенсвязывающую молекулу. Альтернативно, когда используют FACS, приготавливают серии разведений исследуемой антигенсвязывающей молекулы и можно определять титр связывания антитела с экспрессирующими IL-6R клетками для сравнения активности связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы с экспрессирующими IL-6R клетками.

Связывание исследуемой антигенсвязывающей молекулы с антигеном, экспрессируемым на поверхности клеток, суспендированных в буфере или сходных с ним, можно выявлять с использованием проточного цитометра. Известные проточные цитометры включают, например, следующие устройства:

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (все являются торговыми названиями BD Biosciences)

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (все являются торговыми названиями Beckman Coulter).

Предпочтительные способы оценки активности связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, с антигеном, включают, например, следующий способ. Сначала экспрессирующие IL-6R клетки подвергают реакции с исследуемой антигенсвязывающей молекулой, а затем их окрашивают меченным FITC вторичным антителом, которое распознает антигенсвязывающую молекулу. Исследуемую антигенсвязывающую молекулу надлежащим образом разбавляют подходящим буфером с получением молекулы с желаемой концентрацией. Например, молекулу можно использовать в концентрации в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Затем определяют интенсивность флуоресценции и количество клеток с использованием FACSCalibur (BD). Интенсивность флуоресценции, полученную с помощью анализа с использованием программного обеспечения CELL QUEST (BD), т.е. среднее геометрическое значение, отражает количество антитела, связанного с клетками.

Следовательно, активность связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы, которую отражает количество связанной исследуемой антигенсвязывающей молекулы, можно определять путем определения геометрического среднего значения.

То, обладает ли исследуемая антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен для IL-6R, общим эпитопом с другой антигенсвязывающей молекулой, можно оценивать на основе конкуренции между двумя молекулами за один и тот же эпитоп. Конкуренцию между антигенсвязывающими молекулами можно выявлять с помощью анализа перекрестного блокирования или сходных с ним. Например, предпочтительным анализом перекрестного блокирования является конкурентный анализ ELISA.

В частности, в анализе перекрестного блокирования белок IL-6R, иммобилизованный на лунках микропланшета для титрования, предварительно инкубируют в присутствии или в отсутствие являющейся кандидатом конкурентной антигенсвязывающей молекулы, а затем к ним добавляют антигенсвязывающую молекулу. Количество исследуемой антигенсвязывающей молекулы, связавшейся с белком IL-6R в лунках, непрямо коррелирует со связывающей способностью являющейся кандидатом конкурентной антигенсвязывающей молекулы, которая конкурирует за связывание с тем же эпитопом. Следовательно, чем более высокой является аффинность конкурентной антигенсвязывающей молекулы к тому же эпитопу, тем более низкой является активность связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы с покрытыми белком IL-6R лунками.

Количество исследуемой антигенсвязывающей молекулы, связанной с лунками через IL-6R, можно легко определить путем предварительного мечения антигенсвязывающей молекулы. Например, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу определяют с использованием конъюгата авидин/пероксидаза и соответствующего субстрата. В частности, анализ перекрестного блокирования, в котором используются ферментные метки, такие пероксидаза, называют "конкурентным анализом ELISA". Антигенсвязывающую молекулу также можно метить другими агентами для мечения, которые обеспечивают выявление или измерение. В частности, известны радиоактивные метки, флуоресцентные метки и т.п.

Когда являющаяся кандидатом конкурентная антигенсвязывающая молекула может блокировать связывание исследуемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей антигенсвязывающий домен для IL-6R, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 20-50% и более предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с активностью связывания в контрольном эксперименте, исследованном в отсутствие конкурентной антигенсвязывающей молекулы, то определяют, что исследуемая антигенсвязывающая молекула по существу связывается с тем же эпитопом, с которым связывается конкурентная антигенсвязывающая молекула, или конкурирует за связывание с тем же эпитопом.

Когда структура эпитопа, с которым связывается исследуемая антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен для IL-6R, уже идентифицирована, тогда то, имеют ли исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы общий эпитоп, можно оценивать путем сравнения активности связывания двух антигенсвязывающих молекул с пептидом, полученным путем внесения аминокислотных мутаций в пептид, формирующий эпитоп.

Для измерения указанной выше активности связывания, например, активность связывания исследуемых и контрольных антигенсвязывающих молекул в отношении линейного пептида, в который внесена мутация, сравнивают в описанном выше формате ELISA. Помимо способов ELISA активность связывания с мутантным пептидом, связанным с колонкой, можно определять путем пропускания исследуемых и контрольных антигенсвязывающих молекул через колонку, а затем количественного определения антигенсвязывающей молекулы, элюированной в элюирующем растворе. Способы адсорбции мутантного пептида на колонку, например, в форме слитого пептида с GST, известны.

Альтернативно, когда идентифицированный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, тогда то, обладают ли исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы общим эпитопом, можно оценивать следующим способом. Сначала получают экспрессирующие IL-6R клетки и клетки, экспрессирующие IL-6R с мутацией, внесенной в эпитоп. Исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы добавляют в суспензию клеток, полученную суспендированием этих клеток в соответствующем буфере, таком как PBS. Затем клеточные суспензии надлежащим образом промывают буфером, и к ним добавляют меченное FITC антитело, которое распознает исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы. Интенсивность флуоресценции и количество клеток, окрашенных меченым антителом, определяют с использованием FACSCalibur (BD). Исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы надлежащим образом разбавляют с использованием подходящего буфера и используют в желаемых концентрациях. Например, их можно использовать в концентрации в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Интенсивность флуоресценции, определенная с помощью анализа с использованием программного обеспечения CELL QUEST (BD), т.е. геометрическое среднее значение, отражает количество меченного антитела, связанного с клетками. Следовательно, активность связывания исследуемых и контрольных антигенсвязывающих молекул, которую отражает количество связавшегося меченого антитела, можно определять путем измерения геометрического среднего значения.

В описанном выше способе то, что антигенсвязывающая молекула "по существу не связывается с клетками, экспрессирующими мутантный IL-6R," можно оценивать, например, следующим способом. Сначала исследуемые и контрольные антигенсвязывающие молекулы, связанные с клетками, экспрессирующими мутантный IL-6R, окрашивают меченым антителом. Затем определяют интенсивность флуоресценции клеток. Когда используют FACSCalibur для выявления флуоресценции проточной цитометрией, определенную интенсивность флуоресцении можно анализировать с использованием программного обеспечения CELL QUEST. Из геометрических средних значений в присутствии и в отсутствие полипептидного комплекса, можно вычислять сравнительное значение (AGeo-Mean) по формуле 1, ниже, для определения соотношения увеличения интенсивности флуоресценции в результате связывания антигенсвязывающей молекулой.

Формула 1:

AGeo-Mean=Geo-Mean (в присутствии полипептидного комплекса)/Geo-Mean (в отсутствие полипептидного комплекса)

Геометрическое среднее сравнительное значение (значение AGeo-Mean для мутантной молекулы IL-6R), определенное с помощью описанного выше анализа, которое отражает количество исследуемой антигенсвязывающей молекулы, связанной с клетками, экспрессирующими мутантный IL-6R, сравнивают со сравнительным значением AGeo-Mean, которое отражает количество исследуемой антигенсвязывающей молекулы, связавшейся с экспрессирующими IL-6R клетками. В этом случае особенно предпочтительно, чтобы концентрации исследуемой антигенсвязывающей молекулы, используемой для опреде-

ления сравнительных значений AGeo-Mean для экспрессирующих IL-6R клеток и клеток, экспрессирующих мутантный IL-6R, были скорректированы так, чтобы они были равными или по существу равными. В качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы используют антигенсвязывающую молекулу, для которой подтверждено, что она распознает эпитоп в IL-6R.

Если сравнительное значение AGeo-Mean исследуемой антигенсвязывающей молекулы для клеток, экспрессирующих мутантный IL-6R, меньше, чем сравнительное значение AGeo-Mean исследуемой антигенсвязывающей молекулы для экспрессирующих IL-6R клеток, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 30% и особенно предпочтительно на 15%, тогда исследуемая антигенсвязывающая молекула "по существу не связывается с клетками, экспрессирующими мутантный IL-6R". Формула для определения значения Geo-Mean (геометрического среднего значения) описана в руководстве пользователя программного обеспечения CELL QUEST (BD biosciences). Если сравнение показывает, что сравнительные величины по существу эквивалентны, то может быть определено, что эпитоп для исследуемой и контрольной антигенсвязывающих молекул является одним и тем же.

Ткань-мишень

Термин "ткань-мишень", как используют в рамках изобретения, относится к ткани, содержащей клетки, содержащие антигены, с которыми связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению в зависимости от концентрации низкомолекулярных соединений. Она представляет собой ткань, которая обеспечивает положительные фармакологические эффекты для организма, содержащего ткань, когда антигенсвязывающие молекулы связываются с молекулой мембранного типа, экспрессируемой на клетках, или связывается с растворимой молекулой, присутствующей в ткани. В этом случае выражение "положительные фармакологические эффекты" относится к эффектам, которые облегчают, смягчают, ослабляют или излечивают симптомы, обеспечиваемые патологическими участками, содержащими ткань-мишень, для организма, содержащего ткань. Когда симптомы вызваны злокачественными опухолями, такими как рак, неограничивающим вариантом осуществления механизма, который обеспечивает такой фармакологический эффект, является, например, цитотоксическая активность и ингибирование роста злокачественных клеток, и стимуляция иммунитета в злокачественных тканях. В случае воспалительных заболеваний примеры такого неограничивающего варианта осуществления механизма включают иммуносупрессию и активность блокирования действий воспалительных цитокинов в воспаленных тканях.

Соединение, специфическое для злокачественной ткани

Термин "соединение, специфическое для злокачественной ткани (специфическое для злокачественной ткани соединение)", как используют в рамках изобретения, относится к соединению, по-разному присутствующему в злокачественных тканях по сравнению с незлокачественными тканями. В рамках настоящего изобретения термин "злокачественная опухоль", как правило, используют для описания злокачественных новообразований, которые могут быть метастазирующими или неметастазирующими. Неограничивающие примеры карцином, развивающихся из эпителиальных тканей, таких как кожа или пищеварительный тракт, включают опухоль головного мозга, рак кожи, рак головы и шеи, рак пищевода, рак легкого, рак желудка, рак двенадцатиперстной кишки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак печени, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и рак яичника. Неограничивающие примеры сарком, развивающихся из неэпителиальных (интерстициальных) тканей, таких как мышцы, включают остеосаркому, хондросаркому, рабдомиосаркому, лейомиосаркому, липосаркому и ангиосаркому. Неограничивающие примеры гематологической злокачественной опухоли, происходящей из гематологических органов, включают злокачественные лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому; лейкоз, включая острый миелоцитарный лейкоз или хронический миелоцитарный лейкоз, и острый лимфоцитарный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз; и множественную миелому. Термин "новообразование", широко используемый в настоящем описании, относится к любой вновь сформировавшейся опухоли пораженной ткани. В рамках настоящего изобретения новообразования вызывают образование опухолей, которые частично характеризуются ангиогенезом. Новообразования могут быть доброкачественными, такими как гемангиома, глиома или тератома, или злокачественными, такими как карцинома, саркома, глиома, астроцитома, нейробластома или ретинобластома.

Термин "злокачественная ткань" относится к ткани, содержащей по меньшей мере одну злокачественную клетку. Таким образом, поскольку злокачественные ткани содержат злокачественные клетки и кровеносные сосуды, они относятся ко всем типам клеток, участвующим в образовании опухолевой массы, содержащей злокачественные клетки и эндотелиальные клетки. В рамках настоящего изобретения "опухолевая масса" относится к очагам опухолевой ткани. Термин "опухоль", как правило, используют для обозначения доброкачественного новообразования или злокачественного новообразования.

Например, в нескольких вариантах осуществления специфические для злокачественной ткани соединения могут представлять собой соединения, определяемые качественными свойствами злокачественных тканей, такими как присутствие в злокачественных тканях, но отсутствие в незлокачественных тканях, или отсутствие в злокачественных тканях, но присутствие в незлокачественных тканях. В других вариантах осуществления специфические для злокачественной ткани соединения могут представлять

собой соединения, определяемые количественными свойствами злокачественных тканей, такими как присутствие в злокачественных тканях в концентрации, отличающейся (например, более высокая концентрация или более низкая концентрация) от концентрации в незлокачественных тканях. Например, специфические для злокачественной ткани соединения присутствуют на разных уровнях в произвольных концентрациях. Как правило, специфические для злокачественной ткани соединения могут присутствовать в концентрации, повышенной по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 7 0%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 10^3 раз, по меньшей мере в 10^4 раз, по меньшей мере в 10^5 раз, по меньшей мере в 10^6 раз или более или вплоть до бесконечности (т.е., когда соединение отсутствует в незлокачественных тканях). Альтернативно, они могут присутствовать, как правило, в концентрации, сниженной по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 7 0%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 100% (т.е. отсутствуют). Предпочтительно специфические для злокачественной ткани дифференциально присутствуют в статистически значимо отличающихся концентрациях (т.е. при определении с использованием либо t-критерия Велша, либо рангового суммарного критерия Вилкоксона, значение p составляет менее 0,05 и/или величина составляет менее 0,10). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для злокачественной опухоли соединения включают соединения, которые являются специфическими для злокачественной ткани метаболитами, продуцируемыми вследствие метаболической активности, характерной для злокачественных клеток, иммунных клеток или стромальных клеток, содержащихся в злокачественных тканях, таких как ткани, описанные ниже (специфические для злокачественной ткани метаболиты, специфические для злокачественных клеток метаболиты, метаболиты, специфические для иммунных клеток, которые инфильтрировали в злокачественные ткани и специфические для стромальных клеток злокачественной опухоли метаболиты).

Термин "неприродное соединение", как используют в рамках изобретения, относится к химическому веществу неприродного происхождения и его метаболитам. Вариантом осуществления изобретения является химическое вещество неприродного происхождения, которое обладает свойством накапливаться в ткани-мишени после введения в живой организм извне организма, и его метаболиты. Примеры неприродного соединения включают (1) капецитабин (Кселода) и его метаболит 5-FU (фторурацил) и (2) TH-302 и бром-изофосфорамидный иприт (Br-IPM). 5-FU является метаболитом капецитабина (Кселода), и известно, что он метаболизируется цитидиндезаминазой и тимидинфосфорилазой, которые являются метаболическими ферментами, специфическими для злокачественных тканей (Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002). Известно, что TH-302 конвертируется в Br-IPM путем восстановления в условиях низкого содержания кислорода, соответствующих периферии злокачественных тканей (Duan JX, et al. J Med Chem. 2008). Например, когда вводят капецитабин (Кселода), он метаболизируется в 5-FU специфическими для злокачественной опухоли метаболическими ферментами, и, таким образом, концентрация 5-FU становится высокой в области злокачественной опухоли (Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002). Таким образом, антитела, которые используют 5-FU в качестве их переключателя, могут быть способными селективно связываться с антигеном-мишенью только в области злокачественной опухоли. Более того, помимо метаболических ферментов, в качестве переключателя можно использовать молекулы, образовавшиеся в условиях низкого содержания кислорода или в кислой среде, специфической для злокачественных опухолей. Например, TH-302 (Duan JX, et al. J Med Chem. 2008) метаболизируется в Br-IPM в условиях низкого содержания кислорода, и, таким образом, антитела, которые используют Br-IPM в качестве их переключателя, могут быть способными селективно связываться с антигеном-мишенью только в области злокачественной опухоли. Примеры способов введения неприродного соединения в живой организм включают, но не ограничиваются ими, известные способы введения, такие как пероральное введение, введение путем вливания, трансдермальное введение, трансназальное введение, внутривенное введение и транспульмонарное введение.

Помимо химических веществ, которые имеют свойство накапливаться в ткани-мишени, и их метаболитов другой вариант осуществления термина "неприродное соединение", используемый в настоящем описании, также включает химические вещества и т.п., которые представляют собой неприродные соединения, которые служат в качестве переключателя, который может контролировать действие антител посредством приема пероральных средств, например, посредством перорального введения. Более конкретно, они представляют собой химические вещества и т.п., которые представляют собой неприродное

соединение, которое можно вводить неинвазивным путем, таким как пероральный путь, и которое служит в качестве переключателя, который может контролировать действие антитела, когда антитело, имеющее переключатель, которое связывается с определенным антигеном, первоначально вводят инвазивным путем, как например, внутривенно или подкожно; а затем экзогенное соединение, которое служит в качестве переключателя, вводят неинвазивным путем, таким как пероральный путь. Примеры таких соединений включают, но не ограничиваются ими, ATPγS и метаболиты кинуренина. Проблема фармацевтических препаратов на основе антител состоит в том, что, поскольку они имеют длительное время полужизни, побочные эффекты являются продолжительными, когда такие эффекты возникают; однако, если бы эффекты таких антител можно было контролировать посредством неинвазивного введения, такого как пероральное введение, неприродного соединения, эффекты фармацевтических препаратов можно было бы остановить посредством останавливающего введения молекулы переключателя, когда возникают побочные эффекты. Более того, посредством предварительного введения антитела, имеющего переключатель, допустимо введение молекулы переключателя, только когда возникают симптомы нарушения, и достижение фармакологических эффектов посредством неинвазивного введения, такого как пероральное введение, только когда это необходимо.

"Антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации неприродного соединения", по настоящему изобретению могут обеспечить положительные фармакологические эффекты при введении в живой организм.

Специфические для злокачественной ткани метаболиты

Термин "метаболизм" относится к химическим изменениям, которые происходят в биологических тканях, и включает "анаболизм" и "катаболизм". Анаболизм относится к биосинтезу или накоплению молекул, а катаболизм относится к деградации молекул. "Метаболиты" представляют собой промежуточные соединения или продукты, которые появляются в результате метаболизма. "Первичные метаболиты" относятся к метаболитам, прямо вовлеченным в процесс роста или пролиферации клеток или организмов. "Вторичные метаболиты" относятся к продуктам, которые непрямо вовлечены в такие процессы роста или пролиферации и являются продуктами, такими как пигменты или антибиотики, которые продуцируются в результате метаболизма, который осуществляет биосинтез веществ, которые не вовлечены прямо в биологические явления, общие для клеток и организмов. Метаболиты могут представлять собой метаболиты "биополимеров" или они могут представлять собой метаболиты "низкомолекулярных соединений". "Биополимеры" представляют собой полимеры, содержащие один или несколько типов повторяющихся элементов. Биополимеры, как правило, встречаются в биологических системах, и их примеры включают клетки, образующие организм, и межклеточные матриксы, которые прилегают к ним, молекулы, имеющие молекулярную массу приблизительно 5000 или более, которые формируют структуры, такие как интерстициальные матриксы, в частности полисахариды (углеводы и т.п.), пептиды (этот термин используют в значении, включающем полипептиды и белки), и полинуклеотиды, и аналогично их аналоги, такие как соединения, состоящие из или включающие аналоги аминокислот или неаминокислотные группы.

Как используют в рамках настоящего изобретения, термин "низкомолекулярные соединения" относится к природным химическим веществам, отличным от "биополимеров", которые существуют in vivo, или к неприродным химическим веществам, и предпочтительно они являются специфическими для ткани-мишени соединениями или неприродными соединениями, но не ограничиваются ими. Подходящие примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для злокачественной ткани метаболита, описанного в настоящем описании, включают специфические для злокачественных клеток низкомолекулярные метаболиты (Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, From Molecular to Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132). Кроме того, также включены метаболиты, которые на высоком уровне продуцируются иммунными клетками, которые инфильтрируют в злокачественные ткани, и метаболиты, которые на высоком уровне продуцируются стромальными клетками, которые поддерживают выживание и/или рост злокачественных клеток (стромальные клетки злокачественной опухоли или ассоциированные со злокачественной опухолью стромальные фибробласты (CAF)). Инфильтрирующие иммунные клетки представляют собой, например, дендритные клетки, ингибиторные дендритные клетки, ингибиторные Т-клетки, истощенные Т-клетки и происходящие из миеломы супрессорные клетки (MDSC). Более того, метаболиты по настоящему изобретению включают соединения, высвобожденные из клеток наружу клеток, когда клетки, находящиеся в злокачественных тканях (злокачественные клетки, иммунные клетки или стромальные клетки), погибают вследствие апоптоза, некроза или сходных с ними.

Для идентификации специфических для злокачественных клеток метаболитов можно пригодным образом использовать метаболомные анализы, сфокусированные на определении метаболического профиля, в дополнение к анализам на уровне транскриптома (например, Dhanasekaran et al. (Nature (2001) 412, 822-826), Lapointe et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004) 101, 811-816) или Perou et al. (Nature (2000) 406, 747-752)) и анализам на уровне протеома (например, Ahram et al. (Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15), Hood et al. (Mol. Cell. Proteomics (2005) 4, 1741-1753)). Более конкретно, для идентификации метаболитов в исследуемых образцах можно соответствующим образом использовать определение метаболиче-

ского профиля, в котором используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ядерный магнитный резонанс (ЯМР) (Brindle et al. (J. Mol. Recognit. (1997) 10, 182-187), масс-спектрометрия (Gates and Sweeley (Clin. Chem. (1978) 24, 1663-1673) (GC/MS и LC/MS)) и ELISA или сходные с ними по отдельности и/или в комбинации.

Эти исследования установили гетерогенность в сформированных опухолях, являющуюся результатом изменения градиента концентрации факторов роста и метаболитов (глюкоза, кислород или сходные с ними), которая обеспечивает рост злокачественной опухоли в условиях низкого давления кислорода (Dang and Semenza (Trends Biochem. Sci. (1999) 24, 68-72)). В этих исследованиях также используют модели на клеточных линиях для понимания изменения каскада утилизации энергии на различных уровнях злокачественности опухолей (Vizan et al. (Cancer Res. (2005) 65, 5512-5515)). Примеры неограничивающего варианта осуществления технических компонентов платформы метаболомики включают экстракцию образца, разделение, спектроскопический анализ, нормализацию данных, описание специфических для класса метаболитов, картирование каскадов, подтверждение и функциональную охарактеризацию метаболитов-кандидатов, описанные Lawton et al. (Pharmacogenomics (2008) 9, 383). Эти способы позволяют идентификацию специфических для злокачественной опухоли метаболитов в желаемых злокачественных тканях.

Примеры неограничивающих вариантов осуществления специфических для злокачественной ткани соединений или специфических для злокачественной ткани метаболитов, используемых в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают по меньшей мере одно соединение, выбранное из соединений ниже. По меньшей мере одно соединение означает, что в дополнение к случаям, когда антигенсвязывающая активность одного и того же антигенсвязывающего домена, описанного ниже, зависит от одного типа специфических для злокачественной опухоли соединений или метаболитов, включаются случаи, когда она зависит от нескольких типов специфических для злокачественной ткани соединений или метаболитов.

(1) Первичные метаболиты цикла Кребса или гликолитической системы, такие как молочная кислота, янтарная кислота и лимонная кислота

Предпочтительные примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для злокачественной ткани соединения, в частности специфического для злокачественной клетки метаболита, используемого в рамках настоящего изобретения, включают первичные метаболиты, такие как молочная кислота, янтарная кислота и лимонная кислота, которые продуцируются в результате метаболизма глюкозы и присутствуют при более высоких концентрациях в злокачественных тканях по сравнению с окружающими незлокачественными тканями.

Общеизвестно, что фенотип гликолитической системы, который характеризуется активацией ферментов гликолитической системы (каскад Эмбдена-Мейергофа), таких как пируваткиназа, гексокиназа и лактатдегидрогеназа (LDH), является характеристикой солидных опухолей, называемой эффектом Варбурга.

Иными словами в опухолях высокая экспрессия изоформы M2 пируваткиназы, которая необходима для анаэробного гликолиза, но не изоформы Ml, считается функционирующей преимущественно для роста опухолевых клеток in vivo (Christofk et al. (Nature (2008) 452, 230-233). Пировиноградная кислота, продуцируемая пируваткиназой, ингибируется по принципу отрицательной обратной связи молочной кислотой, продуцируемой лактатдегидрогеназой (LDH) в результате равновесной реакции в анаэробных условиях. Поскольку ингибирование по принципу отрицательной обратной связи вызывает стимуляцию дыхания в митохондриях (цикл Кребса) и ингибирование роста клеток, считают, что активация LDH, гексокиназы и переносчика глюкозы (GLUT) играет важную роль в пролиферации злокачественных клеток (Fantin et al. (Cancer Cell (2006) 9, 425-434)). Глюкоза метаболизируется гликолитической системой и конечный метаболит молочная кислота транспортируется вместе с протонами в окружение опухоли и, в результате, считают, что значение pH тканей, окружающих опухоль, становится кислотным. Известно, что молочная кислота, которая является конечным продуктом гликолитического пути, а также янтарная кислота и лимонная кислота, продуцируемые в результате стимуляции дыхания в митохондриях, накапливаются в злокачественных тканях (Teresa et al. (Mol. Cancer (2009) 8, 41-59)). Примеры неограничивающих вариантов осуществления специфических для злокачественной ткани соединений, в частности, специфических для злокачественных клеток метаболитов, используемых в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают такие первичные метаболиты, как молочная кислота, янтарная кислота и лимонная кислота, продуцируемые в результате метаболизма по гликолитическому пути. Более того, известно, что янтарная кислота, которая присутствует в клетках в высокой концентрации, просачивается наружу клеток при гибели клеток (Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269). Таким образом, полагают, что концентрация янтарной кислоты увеличена в злокачественных тканях, в которых гибель клеток происходит часто.

(2) Аминокислоты, такие как аланин, глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота

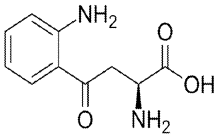
Помимо упомянутого выше метаболизма глюкозы, известно, что метаболизм аминокислот изменен в опухолевых клетках, для которых требуется непрерывное поступление основных аминокислот и неосновных аминокислот, которые необходимы для биосинтеза биополимеров в анаэробных условиях. Глу-

тамин, который содержит два атома азота в его боковой цепи, действует в качестве переносчика азота и является аминокислотой, которая наиболее широко распространена в организме. Опухолевые клетки, в которых скорость захвата аминглутамина в клетки увеличена, называют функционирующими в качестве аминглутаминовой ловушки. Такое увеличение захвата аминглутамина и активности преобразования в глутаминовую кислоту и молочную кислоту называют "глутаминолизом", и он считается характеристикой трансформированных (опухолевых) клеток (Mazurek and Eigenbrodt (Anticancer Res. (2003) 23, 1149-1154); и Mazurek et al. (J. Cell. Physiol. (1999) 181, 136-146)). В результате, у пациентов со злокачественной опухолью происходит увеличение концентрации глутаминовой кислоты, одновременно со снижением уровнем аминглутамина в плазме (Droge et al. (Immunobiology (1987) 174, 473-479)). Более того, наблюдали корреляцию между концентрациями ^{13}C-меченной янтарной кислоты, ^{13}C-меченного аланина, ^{13}C-меченной глутаминовой кислоты и ^{13}C-меченной лимонной кислоты в исследованиях метаболизма радиоактивно ^{13}C-меченной глюкозы в тканях рака легкого. Подходящие примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для злокачественной опухоли соединений, используемых в рамках настоящего изобретения, включают аланин, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту, которые накапливаются в высоких концентрациях в злокачественных тканях посредством такого глутаминолиза и т.п.

(3) Метаболит аминокислоты, такой как кинуренин

Индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) представляет собой метаболизирующий триптофан фермент, который на высоком уровне экспрессируется во многих злокачественных опухолях, таких как меланома, рак толстого кишечника и рак почки (Uyttenhove et al. (Nat. Med. (2003) 9, 1269-127)); и известно, что он имеет две изоформы (Lob et al. (Cancer Immunol. Immunother. (2009) 58, 153-157)). IDO катализирует преобразование триптофана в кинуренин (показан как соединение 1), и она является первым ферментом в каскаде никотинамиднуклеотидов (NAD) de novo. Более того, в глиоме, которая не экспрессирует IDO, кинуренин образуется из триптофана с помощью триптофан-2,3-диоксигеназы (TDO) в печени (Opitz et al. (Nature (2011) 478, 7368, 197-203)). IDO также экспрессируется в дендритных клетках, инфильтрированных в злокачественные ткани, и дендритные клетки также продуцируют кинуренин (J. Immunol. (2008) 181, 5396-5404). IDO также экспрессируется в супрессорных клетках миелоидного происхождения (MDSC) в злокачественных тканях, и MDSC также продуцируют кинуренин (Yu et al. (J. Immunol. (2013) 190, 3783-3797)).

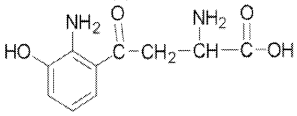
Соединение 1



Известно, что кинуренин подавляет тот же тип Т-клеточного ответа (Frumento et al. (J. Exp. Med. (2002) 196, 459-468); и было сделано предположение о механизме, в котором опухолевые клетки ускользают от противоопухолевых иммунных ответов посредством такого ингибирования, и пролиферация клеток глиомы усиливается по механизму аутокринной пролиферации, в котором кинуренин действует в качестве эндогенного лиганда для рецептора арильных углеводородов, экспрессируемых на глиомах (Optiz et al. (упоминается выше)). Кинуренин конвертируется в антраниловую кислоту (показана как соединение 2) посредством кинуренидазы и в 3-гидроксикинуренин (показан как соединение 3) посредством кинуренин-3-гидроксигидроксилазы. Как антраниловая кислота, так и 3-гидроксикинуренин, конвертируются в 3-гидроксиантраниловую кислоту, предшественник NAD.

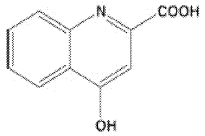
Соединение 2

Соединение 3



Кинуренин конвертируется в кинуреновую кислоту (показана как соединение 4) посредством кинуренинаминотрансферазы. Примеры неограничивающих вариантов осуществления специфических для злокачественной ткани соединений, в частности, специфических для злокачественной клетки метаболитов, используемых в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают такие метаболиты аминокислот, как кинуренин и его метаболиты, такие как антраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин и кинуреновая кислота.

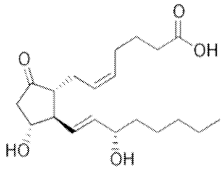
Соединение 4



(4) Метаболиты арахидоновой кислоты, такие как простагландин E2

Простагландин E2 (PGE2) (соединение 5) представляет собой метаболит арахидоновой кислоты, называемый простаноидом, который включает тромбоксан и простагландин, синтезируемые посредством циклооксигеназы (COX)-1/2 (Warner and Mitchell (FASEB J. (2004) 18, 790-804)). PGE2 стимулирует пролиферацию клеток рака толстого кишечника и подавляет их апоптоз (Sheng et al. (Cancer Res. (1998) 58, 362-366)). Известно, что экспрессия циклооксигеназы изменяется во многих злокачественных клетках. Более конкретно, в то время как COX-1 экспрессируется конститутивно практически во всех тканях, было обнаружено, что COX-2 в основном индуцируется определенными типами воспалительных цитокинцитокинов и генов злокачественной опухоли в опухолях (Warner and Mitchell (упоминается выше)). Кроме того, было описано, что сверхэкспрессия COX-2 связана с плохим прогнозом рака молочной железы (Denkert et al. (Clin. Breast Cancer (2004) 4, 428-433)) и быстрым прогрессированием заболевания в случае рака яичника (Denker et al. (Mod. Pathol. (2006) 19, 1261-1269)). Ингибиторные Т-клетки, которые инфильтрировали в злокачественные ткани, также продуцируют простагландин E2 (Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). Известно, что низкомолекулярные соединения, такие как метаболиты арахидоновой кислоты простагландин и лейкотриен, действуют в качестве стимулирующего фактора, который регулирует аутокринный и/или паракринный рост злокачественной опухоли (Nat. Rev. Cancer (2012) 12 (11) 782-792). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для злокачественной ткани соединения, используемого в рамках настоящего изобретения, в частности специфических для злокачественных клеток метаболитов и специфических для иммунных клеток метаболитов, которые инфильтрировали в злокачественные ткани, предпочтительно включают такие метаболиты арахидоновой кислоты, как простагландин E2. Помимо простагландина E2, продукция тромбоксана A2 (TXA2) усилена в злокачественных тканях, таких как ткани рака ободочной и прямой кишки (J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523), и тромбоксан A2 может быть соответственно представлен в качестве неограничивающего варианта осуществления метаболита арахидоновой кислоты по настоящему изобретению.

Соединение 5



(5) Нуклеозиды, содержащие структуру пуринового кольца, такие как аденозин, аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP) и аденозинмонофосфат (AMP)

Известно, что, когда злокачественные клетки претерпевают клеточную гибель, большое количество ATP в клетке просачивается наружу клеток. Таким образом, концентрация ATP является значительно более высокой в злокачественных тканях, чем в нормальных тканях (PLoS One. (2008) 3, e2599). Множество типов клеток высвобождают аденинуклеотиды в форме ATP, ADP и AMP. Метаболизм происходит с помощью внеклеточного фермента на клеточной поверхности, такого как внеклеточная 5'-нуклеотидаза (экто-5'-нуклеотидаза) (CD73) (Resta and Thompson (Immunol. Rev.(1998) 161, 95-109) и Sadej et al. (Melanoma Res. (2006) 16, 213-222)). Аденозин представляет собой пуриновый нуклеозид, который конститутивно существует в низкой концентрации во внеклеточной среде, однако сообщалось, что в гипоксических тканях, встречающихся в солидных опухолях, происходит значительное повышение внеклеточной концентрации аденозина (Blay and Hoskin (Cancer Res. (1997) 57, 2602-2605). CD73 экспрессируется на поверхности иммунных клеток и опухолей (Kobie et al. (J. Immunol. (2006) 177, 6780-6786)), и было обнаружено, что его активность увеличивается при раке молочной железы (Canbolat et al. (Breast Cancer Res. Treat. (1996) 37, 189-193)), раке желудка (Durak et al. (Cancer Lett. (1994) 84, 199-202)), раке поджелудочной железы (Flocke and Mannherz (Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281) и глиобластоме (Bardot et al. (Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218)). Было предположено, что накопление аденозина в злокачественных тканях может быть вызвано увеличением внутриклеточной продукции аденозина посредством дефосфорилфосфорилирования AMP с помощью 5'-нуклеотидазы в цитоплазме (Headrick and Willis (Biochem. J. (1989) 261, 541-550)). Более того, ингибиторные Т-клетки и т.п., которые инфильтрировали в злокачественные ткани, также экспрессируют ATP-азу и продуцируют аденозин (Proc. Natl. Acad. Sci. (2006) 103 (35), 13132-13137; Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). Считается, что продуцированный аденозин обеспечивает в злокачественной ткани иммунодепрессивную среду через рецепторы аденозина, такие как рецептор A2A (Curr. Med. Chem. (2011),18, 5217-23). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для злокачественной ткани соединения, используемого в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают ATP, ADP, AMP и аденозин, которые накапливаются в высокой

концентрации в злокачественных тканях посредством такого метаболизма пуриновых нуклеотидов, таких как ATP. Более того, поскольку аденозин деградирует до инозина с помощью аденозиндезаминазы, инозин накапливается в высокой концентрации.

(6) Мочевая кислота

Мочевая кислота является продуктом метаболического каскада пуриновых нуклеозиднуклеозидов in vivo, и она высвобождается наружу клеток, например, в интерстициальное пространство и кровь. В последние годы было обнаружено, что она высвобождается из погибших клеток, которые присутствуют в очагах повреждения, таких как злокачественные ткани (Nat. Med. (2007) 13, 851-856). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для злокачественной опухоли соединений, используемых в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают такую мочевую кислоту, которая накапливается в высокой концентрации в злокачественных тканях вследствие метаболизма пуриновых нуклеотидов, таких как ATP.

(7) 1-Метилникотинамид

Известно, что фермент никотинамид-N-метилтрансфераза на высоком уровне экспрессируется в нескольких злокачественных тканях человека. Когда этот фермент продуцирует стабильный метаболит 1-этилметилникотинамид из никотинамида, метильная группа S-аденозилтиометионина (SAM), которая служит в качестве донора метильной группы, расходуется; таким образом, было предположено, что высокая экспрессия никотинамид-N-этилметилтрансферазы участвует в образовании опухоли посредством механизма, который нарушает способность к метилированию ДНК, сопровождающую снижение концентрации SAM в злокачественных клетках (Ulanovskaya et al. (Nat. Chem. Biol. (2013) 9 (5) 300-306)). Известно, что стабильный метаболит этого фермента, 1-этилметилникотинамид, секретируется наружу злокачественных клеток (Yamada et al. (J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86)), и предпочтительные примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для злокачественной ткани соединений, используемых в рамках настоящего изобретения, включают 1-метилникотинамид и т.п., которые накапливаются в высоких концентрациях в злокачественных тканях посредством метаболизма никотинамида.

Специфические для воспаленной ткани соединения

Термин "соединение, специфическое для воспаленной ткани (специфическое для воспаленной ткани соединение)", как используют в рамках изобретения, относится к соединению, которое присутствует на отличающемся уровне в воспаленных тканях по сравнению с невоспаленными тканями. В рамках настоящего изобретения примеры "воспаленных тканей" включают

суставы с ревматоидным артритом или остеоартритом;

легкие (альвеолы) с бронхиальной астмой или COPD;

органы пищеварительного тракта при воспалительном заболевании кишечника, болезни Крона или язвенном колите;

фиброзные ткани при фиброзе печени, почки или легкого;

ткани, подвергающиеся реакции отторжения при трансплантации органа;

кровеносные сосуды и сердце (миокард) при артериосклерозе или сердечной недостаточности;

висцеральный жир при метаболическом синдроме;

кожные ткани при атопическом дерматите или другом дерматите; и

спинномозговые нервы при грыже межпозвоночного диска или хронической боли в пояснично-крестцовой области спины.

Метаболиты, специфические для воспаленной ткани

"Специфический для воспаленной ткани метаболит" относится к метаболитам, на высоком уровне продуцируемым иммунными клетками, которые инфильтрировали в воспаленные ткани, и к метаболитам, на высоком уровне продуцируемым, в частности, в нормальных клетках, которые повреждены в воспаленных тканях. Примеры инфильтрирующих иммунных клеток включают эффеторные Т-клетки, зрелые дендритные клетки, нейтрофилы, содержащие гранулы клетки (тучные клетки) и базофилы. Более того, метаболиты в рамках настоящего изобретения включают соединения, которые высвободились из клеток наружу клеток, когда клетки, которые присутствуют в воспаленных тканях (иммунные клетки и нормальные клетки) погибают посредством апоптоза, некроза и т.п.

Примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для воспаленной ткани соединений или специфических для воспаленной ткани метаболитов, используемых в рамках настоящего изобретения предпочтительно включают по меньшей мере одно соединение, выбранное из приведенных ниже соединений. По меньшей мере одно соединение включает случаи, когда антигенсвязывающая активность одного и того же антигенсвязывающего домена, описанного ниже, зависит от типа специфического для воспаленной ткани соединения или метаболита, а также случаи, когда она зависит от нескольких типов специфических для воспаленной ткани соединений или метаболитов.

(1) Метаболиты арахидоновой кислоты, такие как простагландин E2

Известно, что концентрация PGE2 является высокой при ревматоидном артрите и остеоартрите (Eur. J. Clin. Pharmacol. (1994) 46, 3-7.; Clin. Exp. Rheumatol. (1999) 17, 151-160; Am. J. Vet. Res. (2004) 65, 1269-1275). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для воспаленной ткани соединений, в частности специфических для воспаленной ткани метаболитов и метаболитов, специ-

фических для иммунных клеток, которые инфильтрируют в воспаленные ткани, используемых в рамках настоящего изобретения, предпочтительно включают такие метаболиты арахидоновой кислоты, как простагландин E2.

(2) Нуклеозиды, содержащие структуру пуринового кольца, такие как аденозин, аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP) и аденозинмонофосфат (AMP)

Известно, что концентрация ATP является высокой в альвеолах легких, где происходит воспаление, вызванное бронхиальной астмой (Nat. Med. (2007) 13, 913-919). Также известно, что концентрация ATP является высокой в альвеолах легких, где происходит воспаление, вызванное COPD (Am. J. Respir. Crit. Care Med.(2010) 181, 928-934). Более того, было выявлено, что концентрация аденозина является высокой в суставной жидкости пациентов с ревматоидным артритом (Journal of Pharmaceutical и Biomedical Analysis (2004) 36, 877-882). Более того, известно, что концентрация ATP является высокой в тканях, где происходит реакция отторжения вследствие GVHD (Nat. Med. (2010) 16, 1434-1438). Известно, что концентрация аденозина повышена в фиброзных тканях печени, почки и легкого (FASEB J. (2008) 22, 2263-2272; J. Immunol. (2006) 176, 4449-4458; J. Am. Soc. Nephrol. (2011) 22 (5), 890-901; PLoS ONE J. (2010) 5 (2), e9242). Более того, было выявлено, что концентрация ATP увеличена в фиброзных тканях пациентов с фиброзом легких (Am. J. Respir. Crit. Care Med.(2010) 182, 774-783). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфического для воспаленной ткани соединения, используемого в рамках настоящего изобретения, соответственно, включают ATP, ADP, AMP, аденозин и т.п., которые накапливаются в высокой концентрации в воспаленных тканях посредством метаболизма таких пуриновых нуклеотидов, как ATP. Кроме того, инозин накапливается в высокой концентрации вследствие деградации аденозина аденозиндезаминазой с образованием инозина.

(3) Мочевая кислота

Мочевая кислота является продуктом метаболического каскада пуриновых нуклеозиднуклеозидов in vivo, и она высвобождается наружу клеток, например, в интерстициальное пространство и кровь. В последние годы было выявлено, что мочевая кислота, высвобожденная из клеток, претерпевающих некроз, стимулирует воспалительный ответ (J. Clin. Invest. (2010) 120 (6), 1939-1949). Примеры неограничивающего варианта осуществления специфических для воспаленной ткани соединений, используемых в рамках настоящего изобретения, соответственно, включают такую мочевую кислоту, которая накапливается в высокой концентрации в воспаленных тканях вследствие метаболизма пуриновых нуклеотидов, таких как ATP.

Антигенсвязывающий домен

В рамках настоящего изобретения "антигенсвязывающий домен" может представлять собой любую структуру, при условии, что она связывается с представляющим интерес антигеном. Такие домены предпочтительно включают, например

вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей антител;

модуль приблизительно из 35 аминокислот, называемый A-доменом, который содержится в мембранном белке клеток авимере in vivo (международная публикация № WO 2004/044011, международная публикация № WO 2005/040229);

аднектин, содержащий домен 10Fn3, который связывается с белковой частью фибронектина - гликопротеина, экспрессирующегося на клеточной мембране (международная публикация № WO 2002/032925);

аффитело, которое состоит из трехспирального пучка из 58-аминокислот на основе каркаса связывающего IgG домена белка A (международная публикация № WO 1995/001937).

Смоделированные белки анкиринового повтора (DARPin), которые представляют собой область, экспонированную на молекулярной поверхности анкириновых повторов (AR), имеющих структуру, в которой субъединица, состоящая из поворота, содержащего 33 аминокислотных остатка, двух антипараллельных спиралей и петли, многократно сложена в стопку (международная публикация № WO 2002/020565);

антикалины и т.п., которые представляют собой домены, состоящие из четырех петель, которые поддерживают одну сторону структуры бочки, состоящей из восьми расположенных по кругу антипараллельных нитей, которые являются высоко консервативными среди молекул липокалина, таких как ассоциированный с желатином липокалин нейтрофилов (NGAL) (международная публикация № WO 2003/029462); и

вогнутая область, образованная структурой параллельных слоев внутри структуры в форме подковы, образованной уложенными в стопку повторами модуля лейцин-богатого повтора (LRR) вариабельного рецептора лимфоцитов (VLR), который не имеет иммуноглобулиновой структуры и используется в системе приобретенного иммунитета у бесчелюстных позвоночных, таких как минога и миксина (международная публикация № WO 2008/016854). Подходящие примеры антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению включают антигенсвязывающие домены, содержащие вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Подходящими примерами таких антигенсвязывающих доменов являются "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv 2 (scFv2)", "Fab" или "F(ab')2".

Антигенсвязывающие домены антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению могут связываться с идентичным эпитопом. Такой идентичный эпитоп может присутствовать, например, в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Альтернативно, каждый из антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению может связываться с отличающимся эпитопом. В рамках настоящего изобретения отличающийся эпитоп может присутствовать, например, в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Специфичность

"Специфический" означает, что одна из молекул, которая специфически связывается, по существу не связывается с молекулами, отличными от одной или множества молекул-партнеров, с которыми она связывается. Более того, "специфический" также используют, когда антигенсвязывающий домен является специфичным к конкретному эпитопу среди множества эпитопов в антигене. Когда эпитоп, связываемый антигенсвязывающим доменом, содержится в множестве различных антигенов, антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, могут связываться с различными антигенами, которые имеют эпитоп. В рамках настоящего изобретения выражение "по существу не связываются" определяют в соответствии со способом, описанным в упомянутом выше разделе об активности связывания, и оно относится к активности связывания молекулы, которая специфически связывает молекулу, отличную от молекулы-партнера, где активность связывания составляет не более 80%, обычно не более 50%, предпочтительно не более 30% или особенно предпочтительно не более 15% от активности связывания с ее молекулой-партнером.

Цитотоксическая активность

В неограничивающем варианте осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые содержат антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения, или их метаболитов), и которые обладают цитотоксической активностью против клеток, экспрессирующих молекулу мембранного типа на их клеточной мембране; и к фармацевтическим композициям, содержащим эти антигенсвязывающие молекулы в качестве активного ингредиента. В рамках настоящего изобретения цитотоксическая активность включает, например, активность в виде антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC), активность в виде комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и цитотоксическую активность Т-клеток. В рамках настоящего изобретения активность CDC относится к цитотоксической активности системы комплемента. С другой стороны, активность ADCC относится к активности иммунных клеток, обеспечивающей повреждение клеток-мишеней, когда иммунные клетки и т.п. связываются с Fc-областью антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, который связывается с молекулой мембранного типа, экспрессируемой на мембране клеток-мишеней, через Fcγ-рецептор, экспрессируемый на иммунных клетках. Наличие у представляющей интерес антигенсвязывающей молекулы активности ADCC или активности CDC можно определять с использованием известных способов (например, Current Protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, Coligan et al., (1993)).

В частности, сначала получают эффекторные клетки, раствор комплемента и клетки-мишени.

(1) Получение эффекторных клеток

Селезенку извлекают из мыши CBA/N и т.п., и клетки селезенки диспергируют в среде RPMI1640 (Invitrogen). Клетки промывают в той же среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FBS, HyClone), а затем получают эффекторые клетки, доводя концентрацию клеток селезенки до 5×10^6/мл.

(2) Получение раствора комплемента

Комплемент детенышей кролика (CEDARLANE) разбавляют в 10 раз в культуральной среде (Invitrogen), содержащей 10% FBS, с получением раствора комплемента.

(3) Получение клеток-мишеней

Клетки-мишени можно подвергать радиоактивному мечению путем культивирования клеток, экспрессирующих антиген, с 0,2 мКи ^{51}Cr-хромата натрия (GE Healthcare Bio-Sciences) в среде DMEM, содержащей 10% FBS, в течение одного часа при 37°C. После радиоактивного мечения клетки три раза промывают в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS, и клетки-мишени можно получать, доводя концентрацию клеток до 2×10^5 /мл.

Активность ADCC или активность CDC можно измерять способом, описанным ниже. В случае измерения активности ADCC по 50 мкл клеток-мишеней и антигенсвязывающей молекулы добавляют в 96-луночный планшет с U-образным дном (Becton Dickinson), и им позволяют реагировать в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем 100 мкл эффекторных клеток добавляют в планшет и этот планшет помещают в инкубатор с диоксидом углерода на 4 ч. Конечная концентрация антигенсвязывающей молекулы может быть выбрана, например, из 0 или 10 мкг/мл. После инкубации 100 мкл супернатанта собирают из каждой лунки и измеряют радиоактивность с помощью гамма-счетчика (COBRAII AUTO-GAMMA, MODEL D5005, Packard Instrument Company).

Цитотоксическую активность (%) можно вычислять с использованием измеренных величин в соответствии с уравнением: (A-C)/(B-C)×5100. A представляет собой радиоактивность (cpm) в каждом образце, B представляет собой радиоактивность (cpm) в образце, в который добавлен 1% NP-40 (Nacalai Tesque), и C представляет собой радиоактивность (cpm) в образце, содержащем только клетки-мишени.

Между тем, в случае измерения активности CDC 50 мкл клеток-мишеней и 50 мкл антигенсвязывающей молекулы добавляют в 96-луночный планшет с плоским дном (Becton Dickinson) и им позволяют реагировать в течение 15 мин на льду. Затем в планшет добавляют 100 мкл раствора комплемента и этот планшет помещают в инкубатор с диоксидом углерода на 4 ч. Конечная концентрация антигенсвязывающей молекулы может быть выбрана, например, из 0 или 3 мкг/мл. После инкубации из каждой лунки собирают 100 мкл супернатанта и радиоактивность измеряют с помощью гамма-счетчика. Цитотоксическую активность можно вычислять аналогично определению активности ADCC.

В качестве антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, обладающих цитотоксической активностью, можно соответственно использовать описанные ниже модифицированные антигенсвязывающие молекулы, с которыми связаны цитотоксические вещества, такие как химиотерапевтические средства, токсические пептиды или радиоактивные химические вещества. Такие модифицированные антигенсвязывающие молекулы (далее обозначаемые как "конъюгат антигенсвязывающая молекула-лекарственное средство") можно получать путем химической модификации полученных антигенсвязывающих молекул. Способы, которые уже разработаны в области конъюгатов антитело-лекарственное средство и т.п., можно соответствующим образом использовать в качестве способа модификации антигенсвязывающих молекул. Более того, модифицированную антигенсвязывающую молекулу со связанным с ней токсическим пептидом можно получать путем экспрессии в соответствующей клетке-хозяине слитого гена, полученного путем связывания гена, кодирующего токсический пептид, в рамке считывания с геном, кодирующим антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, а затем выделения молекулы из культурального раствора клеток.

Нейтрализующая активность

В неограничивающем варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая индуцирует иммунный ответ, содержащей в качестве активного ингредиента антигенсвязывающую молекулу, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения, или их метаболитов и т.п.) и которая обладает нейтрализующей активностью против молекулы мембранного типа. В другом неограничивающем варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая индуцирует иммунный ответ, содержащей в качестве активного ингредиента антигенсвязывающую молекулу, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения, или их метаболитов, и т.п.), и которая обладает нейтрализующей активностью против молекулы мембранного типа в дополнение к цитотоксической активности против клеток, экспрессирующих молекулу мембранного типа на их клеточной мембране. Как правило, нейтрализующая активность относится к активности ингибирования биологической активности лиганда, который обладает биологической активностью в отношении клеток, такого как вирусы и токсины. Таким образом, вещество, обладающее нейтрализующей активностью, относится к веществу, которое связывается с лигандом или рецептором, с которым связывается лиганд, и ингибирует связывание между лигандом и рецептором. Рецептор, связывание которого с лигандом блокируется нейтрализующей активностью, не способен осуществлять биологическую активность через рецептор. Когда антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, антитело, обладающее такой нейтрализующей активностью, обычно называют нейтрализующим антителом. Нейтрализующую активность исследуемого вещества можно измерять путем сравнения биологической активности в присутствии лиганда в условиях, когда исследуемое вещество присутствует или отсутствует.

Подходящим примером основного лиганда для рецептора IL-6 является IL-6, который представлен в SEQ ID NO: 27. Рецептор IL-6 рецептор, который представляет собой мембранный белок I типа, N-конец которого образует внеклеточный домен, образует гетеротетрамер с рецептором gp130, который был индуцирован посредством IL-6 к димеризации (Heinrich et al. (Biochem. J.(1998) 334, 297-314)). Образование гетеротетрамера активирует Jak, ассоциированную с рецептором gp130. Jak осуществляет аутофосфорилирование и фосфорилирование рецептора. Участки фосфорилирования рецептора и Jak служат в качестве участков связывания для молекул, принадлежащих семейству Stat, имеющих SH2, таких как Stat3, и для MAP-киназы, PI3/Akt и других белков и адаптеров, имеющих SH2. Далее Stat, который связался с рецептором gp130, фосфорилируется посредством Jak.

Фосфорилированный Stat димеризуется и перемещается в ядро и регулирует транскрипцию генов-мишеней. Jak и Stat также могут быть вовлечены в каскад передачи сигнала через рецепторы других классов. Нарушение регуляции каскада передачи сигнала IL-6 наблюдают при воспалении и патологических состояниях аутоиммунных заболеваний и при злокачественных опухолях, таких как рак предста-

тельной железы и множественная миелома. Stat3, который может действовать в качестве онкогена, конститутивно активирован во многих злокачественных опухолях. При раке предстательной железы и множественной миеломе существует перекрестное действие между каскадом передачи сигнала от рецептора IL-6 и каскадом передачи сигнала от представителей семейства рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (Ishikawa et al. (J. Clin. Exp. Hematopathol. (2006) 46 (2), 55-66)).

Такие каскады внутриклеточной передачи сигнала отличаются для каждого типа клеток; таким образом, соответствующая молекула-мишень может быть выбрана в зависимости от каждой из представляющих интерес клеток-мишеней, и молекула-мишень не ограничивается упомянутыми выше факторами. Активность нейтрализации можно оценивать путем измерения активации сигнала in vivo. Более того, активацию сигналов in vivo также можно выявлять с использованием в качестве индикатора индуцирующего транскрипцию действия гена-мишени, который находится ниже каскада передачи сигнала in vivo. Изменение транскрипционной активности гена-мишени можно обнаруживать по принципу репортерного анализа. В частности, репортерный ген, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или люцифераза, помещают ниже фактора транскрипции или промоторной области гена-мишени; и изменение транскрипционной активности можно измерять в значениях активности репортера путем измерения активности репортера. Можно соответственно использовать коммерчески доступные наборы для измерения активации сигнала in vivo (например, Mercury Pathway Profiling Luciferease System (Clontech)).

Более того, в качестве способа измерения активности нейтрализации на лиганде рецептора в семействе рецепторов EGF и т.п., который действует на каскад передачи сигнала, который, как правило, действует в направлении усиления пролиферации клеток, активность нейтрализации у антигенсвязывающей молекулы можно оценивать путем измерения активности пролиферации клеток-мишеней. Например, является пригодным использование следующего способа в качестве способа измерения или оценки ингибиторных эффектов на основе активности нейтрализации антитела против HB-EGF в отношении пролиферации клеток, пролиферация которых стимулирована факторами роста семейства EGF, такими как HB-EGF. В качестве способа оценки и измерения активности ингибирования пролиферации клеток в пробирке используют способ, который измеряет включение живыми клетками [^{3}H]-меченного тимидина, добавленного в культуральную среду, в качестве показателя способности к репликации ДНК. В качестве более удобного способа используют способ исключения красителя, в котором под микроскопом измеряют способности клетки высвобождать краситель, такой как трипановый синий, наружу клетки, или способ MTT. В последнем используется способность живых клеток конвертировать 3-(4,5-диэтилметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолтетразолий бромид (MTT), который является солью тетразолтетразолия, в синий продукт формазан. Более конкретно, исследуемое антитело добавляют вместе с лигандом в культуральный раствор исследуемой клетки; и после прохождения определенного периода времени в культуру добавляют раствор MTT и его оставляют стоять в течение определенного периода времени, чтобы позволить клетке включить MTT. В результате, MTT, который представляет собой желтое соединение, преобразуется в синее соединение сукцинатдегидрогеназой в митохондриях клетки. После этого синий продукт растворяют для окрашивания, его поглощение измеряют и используют в качестве индикатора количества жизнеспособных клеток. Помимо MTT также являются коммерчески доступными такие реагенты, как MTS, XTT, WST-1 и WST-8 (Nacalai Tesque и т.п.) и их можно соответственно использовать. Для измерения активности связывающее антитело, которое имеет тот же изотип, что и антитело против HB-EGF, но не обладает активностью ингибирования пролиферации клеток, можно использовать в качестве контрольного антитела таким же образом, как и антитело против HB-EGF, и считается, что антитело против HB-EGF обладает активностью, когда оно демонстрируют более выраженную активность ингибирования пролиферации клеток, чем контрольное антитело.

В качестве клеток для оценки активности можно соответственно использовать, например, клетки, демонстрирующие стимулированную HB-EGF пролиферацию, такие как клеточная линия RMG-1, которая представляет собой клеточную линию рака яичника; и также можно соответственно использовать клетки мыши Ba/F3, трансформированные вектором, в котором ген, кодирующий hEGFR/mg-CSFR, который является слитым белком внеклеточного домена EGFR человека, слитым в рамке считывания с внутриклеточным доменом рецептора G-CSF мыши, связан так, чтобы обеспечить экспрессию. Таким образом, специалисты в данной области могут соответствующим образом выбирать клетки для оценки активности для измерения активности пролиферации клеток, упомянутой выше.

Антитело

В рамках настоящего изобретения "антитело" относится к природному иммуноглобулину или иммуноглобулину, полученному частичным или полным синтезом. Антитела можно выделять из природных источников, таких как природная плазма и сыворотка, или из культуральных супернатантов продуцирующих антитела гибридом. Альтернативно антитела можно частично или полностью синтезировать с использованием способов, таких как генетическая рекомбинация. Предпочтительные антитела включают, например, антитела изотипа иммуноглобулинов или принадлежащего ему подкласса. Известные иммуноглобулины человека включают антитела следующих девяти классов (изотипов): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. Из этих изотипов антитела по настоящему изобретению включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Ряд аллотипических последовательностей константных областей IgG1 человека,

IgG2 человека, IgG3 человека и IgG4 человека вследствие генетического полиморфизма описан в "Sequences of proteins of immunological interest", NIH Publication No.91-3242. Любую из таких последовательностей можно использовать в рамках настоящего изобретения. В частности, для последовательности IgG1 человека, аминокислотная последовательность положений 356-358, как указано с помощью нумерации EU, может быть либо DEL, либо EEM. Несколько аллотипических последовательностей вследствие генетических полиморфизмов описаны в "Sequences of proteins of immunological interest", NIH Publication No. 91-3242 для константной области Ig κ (каппа) человека и константной области Ig λ (лямбда) человека, и любую из этих последовательностей можно использовать в рамках настоящего изобретения.

Способы получения антитела с желаемой активностью связывания известны специалистам в данной области. Ниже приведен пример, в котором описан способ получения антитела, которое связывается с IL-6R (антитело против IL-6R). Антитела, которые связываются с антигеном, отличным от IL-6R, также можно получать в соответствии с примером, описанным ниже.

Антитела против IL-6R можно получать в качестве поликлональных или моноклональных антител с использованием известных способов. Продуцируемые антитела против IL-6R предпочтительно представляют собой моноклональные антитела, происходящие из млекопитающих. Такие происходящие из млекопитающих моноклональные антитела включают антитела, продуцируемые гибридомами или клетками-хозяевами, трансформированными экспрессирующим вектором, несущим ген антитела, способами генетической инженерии. Моноклональные антитела по настоящему изобретению включают "гуманизированные антитела" или "химерные антитела".

Продуцирующие моноклональные антитела гибридомы можно получать с использованием известных способов, например, как описано ниже. В частности, млекопитающих иммунизируют общепринятыми способами иммунизации с использованием белка IL-6R в качестве сенсибилизирующего антигена. Полученные иммунные клетки подвергают слиянию с известными родительскими клетками общепринятыми способами слияния клеток. Затем гибридомы, продуцирующие антитело против IL-6R, можно отбирать путем скрининга продуцирующих моноклональное антитело клеток с использованием общепринятых способов скрининга.

В частности, моноклональные антитела получают так, как описано ниже. Сначала можно экспрессировать ген IL-6R, нуклеотидная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, для получения белка IL-6R, представленного в SEQ ID NO: 1, который будет использован в качестве сенсибилизирующего антигена для получения антитела. Для этого, последовательность гена, кодирующего IL-6R, встраивают в известный экспрессирующий вектор, и подходящие клетки-хозяева трансформируют этим вектором. Желаемый белок IL-6R человека очищают из клеток-хозяев или их культуральных супернатантов известными способами. Для получения растворимого IL-6R из культуральных супернатантов, например белок, состоящий из аминокислот в положениях 1-357 в полипептидной последовательности IL-6R SEQ ID NO: 1, такой как описана в Mullberg et al. (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968), экспрессируют в качестве растворимого IL-6R вместо белка IL-6R SEQ ID NO: 1. Также в качестве сенсибилизирующего антигена можно использовать очищенный природный белок IL-6R.

Очищенный белок IL-6R можно использовать в качестве сенсибилизирующего антигена для иммунизации млекопитающих. Также в качестве сенсибилизирующего антигена можно использовать неполный пептид IL-6R. В этом случае неполный пептид можно получать путем химического синтеза на основе аминокислотной последовательности IL-6R человека, или путем встраивания неполного гена IL-6R в экспрессирующий вектор для экспрессии. Альтернативно неполный пептид можно получать путем деградации белка IL-6R протеазой. Длина и область неполного пептида IL-6R не ограничены конкретными вариантами осуществления.

Предпочтительная область может быть произвольным образом выбрана из аминокислотной последовательности в положениях аминокислот 20-357 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Количество аминокислот, образующих пептид, подлежащий применению в качестве сенсибилизирующего антигена, предпочтительно составляет по меньшей мере пять или более, шесть или более, или семь или более. Более конкретно, в качестве сенсибилизирующего антигена можно использовать пептид из 8-50 остатков, более предпочтительно из 10-30 остатков.

Альтернативно, для сенсибилизирующего антигена можно использовать слитый белок, полученный путем слияния желаемого неполного полипептида или пептида белка IL-6R с отличающимся полипептидом. Например, предпочтительно в качестве сенсибилизирующих антигенов используют Fc-фрагменты антител и пептидные метки. Векторы для экспрессии таких слитых белков можно конструировать путем слияния в рамке считывания генов, кодирующих два или более желаемых полипептидных фрагментов, и встраивания слитого гена в экспрессирующий вектор, как описано выше. Способы получения слитых белков описаны в Molecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press). Способы получения IL-6R для применения в качестве сенсибилизирующего антигена и способы иммунизации с использованием IL-6R конкретно описаны в WO 2003/000883, WO 2004/022754, WO 2006/006693 и т.п.

Отсутствует конкретное ограничение на млекопитающих, подлежащих иммунизации сенсибилизирующим антигеном. Однако предпочтительно выбирать млекопитающих, учитывая их совместимость с

родительскими клетками, используемыми для слияния клеток. Как правило, предпочтительно используют грызунов, таких как мыши, крысы и хомячки, кроликов и обезьян.

Указанных выше животных иммунизируют сенсибилизирующим антигеном известными способами. Как правило, выполняемые способы иммунизации включают, например, внутрибрюшинное или подкожное инъекционное введение сенсибилизирующего антигена млекопитающим. В частности, сенсибилизирующий антиген соответствующим образом разбавляют PBS (фосфатно-солевой буфер), физиологическим солевым раствором или сходными с ними. Если желательно, общепринятый адъювант, такой как полный адъювант Фрейнда, смешивают с антигеном и смесь эмульгируют. Затем сенсибилизирующий антиген вводят млекопитающему несколько раз с интервалами 4-21 суток. При иммунизации сенсибилизирующим антигеном можно использовать подходящие носители. В частности, когда в качестве сенсибилизирующего антигена используют низкомолекулярный неполный пептид, иногда желательно связывать сенсибилизирующий антигенный пептид с белком-носителем, таким как альбумин или гемоцианин лимфы улитки, для иммунизации.

Альтернативно гибридомы, продуцирующие желаемое антитело, можно получать с использованием способов иммунизации ДНК, как описано ниже. Иммунизация ДНК представляет собой способ иммунизации, который обеспечивает стимуляцию иммунной системы путем экспрессии сенсибилизирующего антигена у животного, имунизированного в результате введения векторной ДНК, сконструированной для обеспечения экспрессии гена, кодирующего антигенный белок, у животного. По сравнению с общепринятыми способами иммунизации, в которых белковый антиген вводят животным, подлежащим иммунизации, иммунизация ДНК является лучшей в том, что может быть обеспечена стимуляция иммунной системы при сохранении структуры мембранного белка, такого как IL-6R; и отсутствует необходимость в очистке антигена для иммунизации.

Для получения моноклонального антитела по настоящему изобретению с использованием иммунизации ДНК сначала ДНК, экспрессирующую белок IL-6R, вводят животному, подлежащему иммунизации. ДНК, кодирующую IL-6R, можно синтезировать известными способами, такими как ПЦР. Полученную ДНК встраивают в соответствующий экспрессирующий вектор, а затем его вводят животному, подлежащему иммунизации. Предпочтительно используемые экспрессирующие векторы включают, например, коммерчески доступные экспрессирующие векторы, такие как pcDNA3.1. Векторы можно вводить в организм с использованием общепринятых способов. Например, иммунизацию ДНК проводят с использованием генной пушки для введения покрытых экспрессирующим вектором частиц золота в клетки организма животного, подлежащего иммунизации. Антитела, которые распознают IL-6R, также можно получать способами, описанными в WO 2003/104453.

После иммунизации млекопитающего, как описано выше, увеличение титра связывающего IL-6R антитела подтверждают в сыворотке. Затем иммунные клетки собирают от млекопитающего, а затем подвергают слиянию клеток. В частности, предпочтительно в качестве иммунных клеток используют спленоциты.

В качестве клетки, подлежащей слиянию с упомянутыми выше иммунными клетками, используют клетки миеломы млекопитающих. Клетки миеломы предпочтительно содержат подходящий селективный маркер для скрининга. Селективный маркер придает клеткам характеристики для их выживания (или гибели) в конкретных условиях культивирования. В качестве селективных маркеров известны дефицит гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (далее сокращенно обозначаемый как дефицит HGPRT) и дефицит тимидинкиназы (далее сокращенно обозначаемый как дефицит TK). Клетки с дефицитом HGPRT или TK обладают чувствительностью к гипоксантину-аминоптерину-тимидину (далее сокращенно обозначаемой чувствительностью HAT). Чувствительные к HAT клетки не могут синтезировать ДНК в селективной среде HAT, и, таким образом, погибают. Однако, когда клетки слиты с нормальными клетками, они могут продолжать синтезировать ДНК с использованием пути спасения нормальных клеток, и, таким образом, они могут расти в селективной среде HAT.

Отбор клеток с дефицитом HGPRT и TK можно проводить в среде, содержащей 6-тиогуанин, 8-азагуанин (далее сокращенно обозначаемый как 8AG) или 5'-бромдезоксиуридин соответственно. Нормальные клетки погибают, поскольку они включают аналоги пиримидина в их ДНК. Между тем, клетки, которые являются дефицитными по этим ферментам, могут выживать в селективной среде, поскольку они не могут включать эти аналоги пиримидина. Кроме того, селективный маркер, называемый устойчивостью к G418, обеспечиваемый геном устойчивости к неомицину, обеспечивает устойчивость к 2-дезоксистрептаминовым антибиотикам (аналоги гентамицина). Известны различные типы миеломных клеток, которые пригодны для слияния клеток.

Например, предпочтительно можно использовать миеломные клетки, включающие следующие клетки:

P3(P3x63Ag8,653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology и Immunology (1978)81, 1-7);

NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976)6 (7), 511-519);

MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415);

SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270);

FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21);

S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323);

R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133), и т.д.

Слияние клеток между иммуноцитами и клетками миеломы по существу проводят с использованием известных способов, например, способа Kohler and Milstein et al. (Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46).

Более конкретно, слияние клеток можно проводить, например, в общепринятой культуральной среде в присутствии агента, обеспечивающего слияние клеток. Агенты, обеспечивающие слияние клеток, включают, например, полиэтиленгликоль (PEG) и вирус Сендай (HVJ). Если необходимо, также можно добавлять вспомогательное вещество, такое как диметилсульфоксид, для повышения эффективности слияния.

Соотношение иммунных клеток к клеткам миеломы можно определять самостоятельно, предпочтительно, например, оно составляет одну клетку миеломы на каждые от одного до десяти иммуноцитов. Культуральные среды, используемые для слияния клеток, включают, например, среды, которые пригодны для выращивания клеточных линий, такие как среда RPMI1640 и среда MEM, и другие общепринятые культуральные среды, используемые для этого типа клеточной культуры. Кроме того, предпочтительно в культуральную среду можно добавлять сывороточные добавки, такие как эмбриональная телячья сыворотка (FCS).

Для слияния клеток заданные количества указанных выше иммунных клеток и миеломных клеток смешивают в описанной выше культуральной среде. Затем добавляют раствор PEG (например, средняя молекулярная масса составляет приблизительно от 1000 до 6000), предварительно нагретый до приблизительно 37°C, в концентрации, как правило, от 30 до 60% (мас./об.). Затем эту смесь осторожно перемешивают для получения желаемых слитых клеток (гибридом). Затем к клеткам постепенно добавляют подходящую культуральную среду, упомянутую выше, и смесь многократно центрифугируют для удаления супернатанта. Таким образом, можно удалить агенты слияния клеток и т.п., которые являются неблагоприятными для роста гибридомы.

Отбор полученных таким образом гибридом можно проводить путем культивирования с использованием общепринятой селективной среды, например, среды HAT (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Клетки, отличные от желаемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать путем продолжения культивирования в описанной выше среде HAT в течение достаточного периода времени. Как правило, период составляет от нескольких суток до нескольких недель. Затем, гибридомы, продуцирующие желаемое антитело, подвергают скринингу и клонируют по отдельности общепринятыми способами лимитирующих разведений.

Отбор полученных таким образом гибридом можно проводить с использованием селективной среды на основе селективного маркера, которым обладает миелома, используемая для слияния клеток. Например, отбор клеток с дефицитом HGPRT или TK можно проводить путем культивирования с использованием среды HAT (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). В частности, когда для слияния клеток используют чувствительные к HAT миеломные клетки, клетки, успешно слитые с нормальными клетками, могут селективно пролиферировать в среде HAT. Клетки, отличные от желаемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать путем продолжения культивирования в описанной выше среде HAT в течение достаточного периода времени. В частности, отбор желаемых гибридом можно проводить путем культивирования, как правило, в течение от нескольких суток до нескольких недель. Затем гибридомы, продуцирующие желаемое антитело, подвергают скринингу и по отдельности клонируют общепринятыми способами лимитирующих разведений.

Желаемые антитела можно предпочтительно отбирать и по отдельности клонировать способами скрининга на основе известной реакции антиген/антитело. Например, связывающее IL-6R моноклональное антитело может связываться с IL-6R, экспрессированным на поверхности клетки. Такое моноклональное антитело можно подвергать скринингу с помощью активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS). FACS представляет собой систему, которая оценивает связывание антитела с клеточной поверхностью путем анализа клеток, контактирующих с флуоресцентным антителом с использованием лазерного луча и измерения флуоресценции, испускаемой индивидуальными клетками.

Для скрининга гибридом, которые продуцируют моноклональные антитело по настоящему изобретению, с помощью FACS, сначала получают экспрессирующие IL-6R клетки. Клетки, предпочтительно используемые для скрининга, представляют собой клетки млекопитающих, в которых IL-6R экспрессируется вынужденным образом. В качестве контроля можно проводить селективное выявление активно-

сти антитела, которое связывается с IL-6R клеточной поверхности, с использованием в качестве клеток-хозяев нетрансформированных клеток млекопитающих. В частности, гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело против IL-6R, можно выделять путем отбора гибридом, которые продуцируют антитело, которое связывает с клетками, в которых экспрессируется IL-6R вынужденным образом, но не с клетками-хозяевами.

Альтернативно активность связывания антитела с иммобилизованными экспрессирующими IL-6R клетками можно оценивать на основе принципа ELISA. Например, экспрессирующие IL-6R клетки иммобилизуют на лунках планшета для ELISA. Культуральные супернатанты гибридом контактируют с иммобилизованными клетками в лунках и выявляют антитела, которые связываются с иммобилизованными клетками. Когда моноклональные антитела происходят из мыши, антитела, связанные с клетками, можно выявлять с использованием антитела против иммуноглобулина мыши. Отбор гибридом, продуцирующих желаемое антитело, обладающее антигенсвязывающей способностью, проводят с помощью описанного выше скрининга, и их можно клонировать способом лимитирующих разведений и т.п.

Продуцирующие моноклональное антитело гибридомы, полученные таким образом, можно пассировать в общепринятой культуральной среде и хранить в жидком азоте в течение длительного периода времени.

Описанные выше гибридомы культивируют общепринятым способом, и желаемые моноклональные антитела можно получать из культуральных супернатантов. Альтернативно гибридомы вводят совместимым млекопитающим и выращивают в них, и моноклональные антитела получают из асцитной жидкости. Первый из этих способов пригоден для получения антител с высокой чистотой.

Предпочтительно также можно использовать антитела, кодируемые генами антител, которые клонированы из антителопродуцирующих клеток, таких как описанные выше гибридомы. Клонированный ген антитела встраивают в подходящий вектор, и его вводят в клетку-хозяина для экспрессии антитела, кодируемого геном. Способы выделения генов антител, встраивания генов в векторы и трансформации клеток-хозяев, уже разработаны, например, Vandamme et al. (Eur. J. Biochem. (1990) 192(3), 767-775). Способы продуцирования рекомбинантных антител также известны, как описано ниже.

Например, кДНК, кодирующую вариабельную область (V-область) антитела против IL-6R, получают из клеток гибридомы, экспрессирующих антитело против IL-6R. Для этой цели сначала из гибридом экстрагируют тотальную РНК. Способы, используемые для экстракции мРНК из клеток, включают, например,

способ ультрацентрифугирования с гуанидином (Biochemistry (1979) 18(24), 5294-5299) и способ AGPC (Anal. Biochem. (1987) 162(1), 156-159) Экстрагированные мРНК можно очищать с использованием набора для очистки мРНК mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bioscience) и т.п. Альтернативно также коммерчески доступны наборы для экстракции тотальной мРНК непосредственно из клеток, такие как набор для очистки мРНК QuickPrep mRNA Purification Kit (GE Healthcare Bioscience). мРНК можно получать из гибридом с использованием таких наборов. кДНК, кодирующие V-область антитела, можно синтезировать из полученных мРНК с использованием обратной транскриптазы. кДНК можно синтезировать с использованием набора для синтеза первой цепи кДНК с обратной транскриптазой AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Co.) и т.п. Более того, для синтеза и амплификации кДНК можно соответствующим образом использовать набор для амплификации кДНК SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) и способ 5'-RACE на основе ПЦР (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85(23), 8998-9002; Nucleic Acids Res. (1989) 17(8), 2919-2932). В таком способе синтеза кДНК на оба конца кДНК можно вносить подходящие участки для ферментов рестрикции, описанные ниже.

Представляющий интерес фрагмент кДНК очищают из полученного продукта ПЦР, а затем его лигируют в векторную ДНК. Таким образом, конструируют рекомбинантный вектор и вводят в E. coli и т.п. После отбора колоний из образующих колонии E. coli можно получать желаемый рекомбинантный вектор. Затем исследуют, имеет ли рекомбинантный вектор представляющую интерес нуклеотидную последовательность кДНК, известным способом, таким как способ с терминацией цепи дидезоксинуклеотидами.

Способ 5'-RACE, в котором используются праймеры для амплификации гена вариабельной области, удобно использовать для выделения гена, кодирующего вариабельную область. Сначала конструируют библиотеку кДНК 5'-RACE с помощью синтеза кДНК с использованием РНК, экстрагированных из клеток гибридом в качестве матрицы. Для синтеза библиотеки кДНК 5'-RACE соответствующим образом используют коммерчески доступный набор, такой как набор для амплификации кДНК SMART RACE.

Ген антитела амплифицируют способом ПЦР с использованием полученной библиотеки кДНК 5'-RACE в качестве матрицы. Праймеры для амплификации гена антитела мыши можно конструировать на основе известных последовательностей генов антител. Нуклеотидные последовательности праймеров варьируют, в зависимости от подкласса иммуноглобулинов. Таким образом, предпочтительно, чтобы подкласс был определен заранее с использованием коммерчески доступного набора, такого как набор для изотипирования моноклональных антител мыши Iso Strip mouse monoclonal antibody isotyping kit (Roche Diagnostics).

В частности, например, праймеры, которые обеспечивают амплификацию генов, кодирующих тя-

желые цепи γ1, γ2a, γ2b и γ3 и легкие цепи κ и λ, используют для выделения генов, кодирующих IgG мыши. Как правило, для амплификации гена вариабельной области gG используют праймер, который гибридизуется с областью константной области вблизи вариабельной области, в качестве 3'-праймера. Между тем, в качестве 5'-праймера используют праймер, прилагаемый к набору для конструирования библиотеки кДНК 5'-RACE.

Продукты ПЦР, амплифицированные таким образом, используют для переформировывания иммуноглобулинов, состоящих из комбинации тяжелых и легких цепей. Отбор желаемого антитела можно проводить с использованием активности связывания IL-6R переформированного иммуноглобулина в качестве индикатора. Например, когда задачей является выделение антитела против IL-6R, более предпочтительно, чтобы связывание антитела с IL-6R было специфическим. Скрининг связывающего IL-6R антитела можно проводить, например, с помощью следующих стадий:

(1) приведение в контакт экспрессирующей IL-6R клетки с антителом, содержащим V-область, кодируемую кДНК, выделенной из гибридомы;

(2) выявление связывания антитела с эксперессирующей IL-6R клеткой и

(3) отбор антитела, которое связывается с экспрессирующей IL-6R клеткой.

Способы выявления связывания антитела с экспрессирующими IL-6R клетками известны. В частности, связывание антитела с экспрессирующими IL-6R клетками можно выявлять с помощью описанных выше способов, таких как FACS. Для оценки активности связывания антитела соответствующим образом используют иммобилизованные образцы экспрессирующих IL-6R клеток.

Предпочтительные способы скрининга антител, в которых в качестве индикатора используется активность связывания, также включают способы пэннинга с использованием фаговых векторов. Способы скрининга с использованием фаговых векторов являются преимущественными, когда гены антител выделяют из библиотек подклассов тяжелых цепей и легких цепей из популяции клеток, экспрессирующей поликлональное антитело. Гены, кодирующие вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей, можно связывать соответствующей линкерной последовательностью с получением одноцепочечного Fv (scFv). Фаги, представляющие scFv на их поверхности, можно получать встраиванием гена, кодирующего scFv, в фаговый вектор. Фаги контактируют с представляющим интерес антигеном. Затем ДНК, кодирующую scFv, обладающие представляющей интерес активностью связывания, можно выделять путем сбора фагов, связанных с антигеном. Этот процесс можно повторять при необходимости для увеличения содержания scFv, обладающих представляющий интерес активностью связывания.

После выделения кДНК, кодирующей V-область представляющего интерес антитела против IL-6R, кДНК расщепляют ферментами рестрикции, которые распознают участки рестрикции, встроенные на обоих концах кДНК. Предпочтительные ферменты рестрикции распознают и расщепляют нуклеотидную последовательность, которая встречается в нуклеотидной последовательности гена антитела с низкой частотой. Более того, предпочтительно в представляющий интерес вектор вводят участок рестрикции для фермента, который образует липкий конец, для встраивания одной копии расщепленного фрагмента в правильной ориентации. Кодирующую кДНК V-область антитела против IL-6R расщепляют, как описано выше, и ее встраивают в соответствующий экспрессирующий вектор для конструирования экспрессирующего вектора для антитела. В этом случае, если ген, кодирующий константную область антитела (C-область) и ген, кодирующий описанную выше V-область, слить в рамке считывания, то получат химерное антитело. В рамках настоящего изобретения "химерное антитело" означает, что происхождение константной области отличается от вариабельной области. Таким образом, в дополнение к гетерохимерным антителам мыши/человека, химерные антитела по настоящему изобретению включают аллохимерные антитела человека/человека.

Экспрессирующий вектор для химерного антитела можно конструировать путем встраивания гена V-области в экспрессирующий вектор, который уже имеет константную область. В частности, например, последовательность, распознаваемая первым ферментом рестрикции, который расщепляет выше гена V-области, можно соответствующим образом помещать на 5'-конец экспрессирующего вектора, содержащего ДНК, кодирующую желаемую константную область антитела. Экспрессирующий вектор для химерного антитела конструируют путем слияния в рамке считывания двух генов, расщепленных одной и той же комбинацией ферментов рестрикции.

Для получения моноклонального антитела против IL-6R гены антител встраивают в экспрессирующий вектор так, чтобы гены экспрессировались под контролем регулирующей экспрессию области. Регулирующая экспрессию область для экспрессии антитела включает, например, энхансеры и промоторы. Более того, на N-конец можно присоединять подходящую сигнальную последовательность, так чтобы экспрессируемое антитело секретировалось наружу клеток. В примерах ниже в качестве сигнальной последовательности используют пептид, имеющий аминокислотную последовательность MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 3). Между тем, можно присоединять другие подходящие сигнальные последовательности. Экспрессированный полипептид расщепляется на C-конце описанной выше последовательности, и полученный полипептид секретируется из клеток в качестве зрелого полипептида. Затем подходящие клетки-хозяева трансформируют экспрессирующим вектором и получают рекомбинантные клетки, экспрессирующие ДНК, кодирующую антитело IL-6R.

ДНК, кодирующие тяжелую цепь (H-цепь) и легкую цепь (L-цепь) антитела по отдельности, встраивают в различные экспрессирующие векторы для экспрессии гена антитела. Молекулу антитела, имеющую H- и L-цепи, можно экспрессировать путем котрансфекции одной и той же клетки-хозяина векторами, в которые соответственно встроены гены H-цепи и L-цепи. Альтернативно клетки-хозяева можно трансформировать одним экспрессирующим вектором, в который встроены ДНК, кодирующие H- и L-цепи (см. WO 1994/011523).

Существуют различные известные комбинации клетка-хозяин/экспрессирующий вектор для получения антител путем введения выделенных генов антител в соответствующих хозяев. Все из этих экспрессирующих систем пригодны для выделения антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению. Подходящие эукариотические клетки, используемые в качестве клеток-хозяев, включают клетки животных, клетки растений и клетки грибов. В частности, клетки животных включают, например, следующие клетки.

(1) клетки млекопитающих: CHO (линия клеток яичника китайского хомяка), COS (линия клеток почки обезьяны), миелома (Sp2/0, NS0 и т.п.), BHK (клеточная линия почки детенышей хомячка), Hela, Vero, HEK293 (линия клеток почки эмбриона человека с расщепленной аденовирусной ДНК (Ad)5), Freestyle293, клетки PER.C6 (линия клеток сетчатки эмбриона человека, трансформированных генами E1A и E1B аденовируса 5 типа (Ad5)), и т.п. (Current Protocols in Protein Science (май 2001 года, раздел 5.9, табл.5.9.1));

(2) клетки земноводных: ооциты Xenopus и т.п. и

(3) клетки насекомых: sf9, sf21, Tn5 и т.п.

Кроме того, в качестве клетки растений известна экспрессирующая система для генов антител с использованием клеток, происходящих из рода Nicotiana, таких как Nicotiana tabacum. Для трансформации клеток растений можно соответствующим образом использовать культивированные клетки каллуса.

Более того, в качестве клеток грибов можно использовать следующие клетки:

дрожжи: род Saccharomyces, как например, Saccharomyces cerevisiae, и род Pichia, как например, Pichia pastoris; и

нитчатые грибы: род Aspergillus, как например, Aspergillus niger.

Более того, также известны экспрессирующие системы для генов антител, в которых используются прокариотические клетки. Например, при использовании бактериальных клеток, в рамках настоящего изобретения можно подходящим образом использовать клетки E. coli, клетки Bacillus subtilis и т.п. Экспрессирующие векторы, несущие представляющие интерес гены антитела, вводят в клетки путем трансфекции. Трансфицированные клетки культивируют in vitro, и из культуры трансформированных клеток можно получать желаемое антитело.

В дополнение к описанным выше клеткам-хозяевам, также для получения рекомбинантного антитела можно использовать трансгенных животных. Следовательно, антитело можно получать из животного, которому введен ген, кодирующий представляющее интерес антитело. Например, ген антитела можно конструировать в качестве слитого гена путем встраивания в рамке считывания в ген, который кодирует белок, специфически продуцируемый в молоке. В качестве белка, секретируемого в молоке, можно использовать, например, β-казеин козы и т.п. Фрагменты ДНК, содержащие слитый ген, в который встроен ген антитела, инъецируют в эмбрион козы, а затем этот эмбрион вводят в самку козы. Желаемые антитела можно получать в качестве белка, слитого с белком молока, из молока, продуцируемого трансгенной козой, родившейся от козы, являющейся реципиентом эмбриона (или ее потомства). Кроме того, для увеличения объема молока, содержащего желаемое антитело, продуцируемого трансгенной козой, трансгенной козе при необходимости можно вводить гормоны (Bio/Technology (1994) 12 (7), 699-702).

Когда антигенсвязывающую молекулу, описанную в настоящем описании, вводят человеку, антигенсвязывающий домен, происходящий из генетически рекомбинантного антитела, которое является искусственно измененным для снижения гетерологической антигенности против человека и т.п., можно соответствующим образом использовать в качестве антигенсвязывающего домена антигенсвязывающей молекулы. Такие генетически рекомбинантные антитела включают, например, гуманизированные антитела. Эти измененные антитела получают соответствующим образом известными способами.

Вариабельная область антитела, используемая для получения антигенсвязывающего домена антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем описании, как правило, образована тремя определяющими комплементарность областями (CDR), которые разделены четырьмя каркасными областями (FR). CDR представляет собой область, которая по существу определяет специфичность связывания антитела. Аминокислотные последовательности CDR являются в высокой степени разнообразными. С другой стороны, образующие FR аминокислотные последовательности часто обладают высокой идентичностью, даже среди антител с отличающейся специфичностью связывания. Таким образом, как правило, специфичность связывания определенного антитела можно вносить в другое антитело путем пересадки CDR.

Гуманизированное антитело также называют переформированным антителом человека. В частности, известны гуманизированные антитела, полученные пересадкой CDR антитела не являющегося человеком животного, такого как антитело мыши, в антитело человека и т.п. Также известны стандартные

способы генной инженерии для получения гуманизированных антител. В частности, например, в качестве способа пересадки CDR антитела мыши в FR человека известна перекрывающаяся ПЦР с удлинением. В перекрывающейся ПЦР с удлинением, нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR антитела мыши, подлежащую пересадке, добавляют к праймерам для синтеза FR антитела человека. Праймеры получают для каждой из четырех FR. Является общепризнанным, что при пересадке CDR мыши в FR человека, выбор FR человека, который имеет высокую идентичность FR мыши, является преимущественным для сохранения функции CDR. Таким образом, как правило, предпочтительно использовать FR человека, содержащую аминокислотную последовательность, которая обладает высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью FR, соседней с CDR мыши, подлежащей пересадке.

Нуклеотидные последовательности, подлежащие лигированию, конструируют так, чтобы они были соединены друг с другом в рамке считывания. FR человека синтезируют по отдельности с использованием соответствующих праймеров. В результате получают продукты, в которых ДНК, кодирующая CDR мыши, связана с индивидуальными ДНК, кодирующими FR. Нуклеотидные последовательности, кодирующие CDR мыши, каждого продукта конструируют так, чтобы они перекрывались друг с другом. Затем проводят синтез комплементарной цепи для гибридизации перекрывающихся CDR-областей продуктов, синтезированных с использованием гена антитела человека в качестве матрицы. С помощью этой реакции FR человека лигируют через последовательности CDR мыши.

Полноразмерный ген V-области, в котором в конечном итоге лигированы три CDR и четыре FR, амплифицируют с использованием праймеров, которые гибридизуются с его 5'- или 3'-концом, в которые добавлены подходящие последовательности, распознаваемые ферментом рестрикции. Экспрессирующий вектор для гуманизированного антитела можно получать путем встраивания ДНК, полученной, как описано выше, и ДНК, которая кодирует C-область антитела человека, в экспрессирующий вектор, так чтобы они лигировались в рамке считывания. После трансфекции рекомбинантным вектором хозяина для получения рекомбинантных клеток, рекомбинантные клетки культивируют и ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, экспрессируют с получением гуманизированного антитела в клеточной культуре (см., публикацию патента Европы № EP 239400 и международную публикацию патента № WO 1996/002576).

Путем качественного или количественного определения и оценки антигенсвязывающей активности гуманизированного антитела, полученного, как описано выше, можно пригодным образом отобрать FR антитела человека, которые позволяют CDR образовывать подходящий антигенсвязывающий центр при лигировании через CDR. Аминокислотные остатки в FR можно заменять при необходимости, так чтобы CDR переформированного антитела человека образовывали соответствующий антигенсвязывающий центр. Например, мутации аминокислотной последовательности можно вносить в FR с использованием способа ПЦР, который используется для пересадки CDR мыши в FR человека. Более конкретно, в праймеры, которые гибридизуются с FR, можно вносить частичные мутации нуклеотидной последовательности. Мутации нуклеотидной последовательности вносятся в FR, синтезированные с использованием таких праймеров. Мутантные последовательности FR, имеющие желаемые характеристики, можно отбирать путем измерения и оценки активности мутанта антитела с замененной аминокислотой в отношении связывания с антигеном с помощью упомянутого выше способа (Cancer Res. (1993) 53: 851-856).

Альтернативно желаемые антитела человека можно получать путем иммунизации трансгенных животных, имеющих полный набор генов антител человека (см. WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735) путем иммунизации ДНК.

Более того, также известны способы получения антител человека путем пэннинга с использованием библиотек антител человека. Например, V-область антитела человека экспрессируют в качестве одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага способом фагового дисплея. Можно отбирать фаги, экспрессирующие scFv, которые связываются с антигеном. Последовательность ДНК, кодирующую V-область антитела человека, которая связывается с антигеном, можно определять путем анализа генов выбранных фагов. Определяют последовательность ДНК scFv, которая связывается с антигеном. Получают Экспрессирующий вектор путем слияния последовательности V-области в рамке считывания с последовательностью C-области желаемого антитела человека, и встраивания ее в соответствующий экспрессирующий вектор. Экспрессирующий вектор вводят в клетки, пригодные для экспрессии, такие как клетки, описанные выше. Антитело человека можно получать путем экспрессии гена, кодирующего антитело человека, в клетках. Эти способы уже известны (см. WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Помимо способа фагового дисплея способы с использованием бесклеточной системы трансляции, способы экспонирования антигенсвязывающих молекул на поверхности клеток или вирусов, способы с использованием эмульсий и т.п. известны в качестве способов получения антител человека посредством пэннинга с использованием библиотеки антител человека. В качестве способов с использованием бесклеточной системы трансляции можно использовать, например, способ рибосомального дисплея, где формируют комплекс между мРНК и транслируемым белком через рибосому путем удаления стоп-кодона и т.п., способ дисплея кДНК, где последовательность гена и транслируемый белок ковалентно связывают с использованием соединения, такого как пуромицин, способ дисплея мРНК, способ дисплея CIS, где

формируют комплекс между геном и транслируемым белком с использованием белка, связывающего нуклеиновую кислоту, и т.п. Для способов презентации антигенсвязывающей молекулы на поверхности клеток или вирусов, помимо способа фагового дисплея можно использовать способ дисплея на E. coli, способ дисплея на грамположительных бактериях, способ дрожжевого дисплея, способ дисплея на клетках млекопитающих, способ вирусного дисплея и т.п. В качестве способов, в которых используются эмульсии, можно использовать способ вирусного дисплея in vitro, который вовлекает заключение генов и связанных с трансляцией молекул в эмульсию, и т.п. Эти способы уже являются общеизвестными (Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12): 1287-92, Nucleic Acids Res. 2006; 34 (19): el27, Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Mar 2; 101 (9): 2806-10, Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Jun 22;101(25): 9193-8, Protein Eng Des Sel. 2008 Apr; 21 (4): 247-55, Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Sep 26;97(20): 10701-5, MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5): 508-18, Methods Mol Biol. 2012; 911:183-98).

В дополнение к способам, описанным выше, для выделения генов антител можно соответствующим образом использовать способы клонирования В-клеток (идентификация каждой кодирующей антитело последовательности, ее клонирование и выделение; использование при конструировании экспрессирующего вектора для получения каждого антитела (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности); и т.п.), как описано, например Bernasconi et al. (Science (2002) 298: 2199-2202) или в WO 2008/081008.

Неограничивающий вариант осуществления антител в рамках настоящего изобретения включает, но не ограничивается ими, химерные рецепторы антигенов, введенные в Т-клетки, которые являются слитыми конструкциями антитела или его фрагментов, которые распознают антигены вместо Т-клеточного рецептора, и Т-клеточных сигнальных доменов, а также Т-клетки, в которые введен химерный рецептор антигена.

Система нумерации EU и система нумерации Kabat

В соответствии со способами, используемыми в рамках настоящего изобретения, положения аминокислот, приписываемые CDR и FR антитела, указаны в соответствии с нумерацией по Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991)). В рамках настоящего изобретения, когда антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или антигенсвязывающии фрагмент, аминокислоты вариабельной области указаны в соответствии с нумерацией по системе Kabat, в то время как аминокислоты константной области указаны в соответствии с системой нумерации EU на основе положений аминокислот по Kabat.

Антигенсвязывающий домен, активность связывания которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения

Примеры низкомолекулярного соединения включают специфические для ткани-мишени соединения и неприродные соединения. Примеры способа отбора антигенсвязывающих доменов в зависимости от специфического для ткани-мишени соединения показаны ниже; и способы, такие как способы отбора антигенсвязывающих доменов в зависимости от низкомолекулярного соединения, отличного от специфических для ткани-мишени соединений и т.п., также можно осуществлять соответствующим образом согласно примерам, описанным ниже. Для получения антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен), антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации специфического для ткани-мишени соединения, можно соответствующим образом использовать способы, описанные в представленном выше разделе об активности связывания. В качестве неограничивающего варианта осуществления ниже представлены некоторые конкретные примеры способов. Например, для подтверждения того, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии специфического для ткани-мишени соединения становится более высокой, чем антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в отсутствие соединения, сравнивают антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии и в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения или в присутствии высоких и низких концентраций соединения. В другом неограничивающем варианте осуществления, например, для подтверждения того, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения становится более высокой, чем антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии низкой концентрации соединения, сравнивают антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии высоких и низких концентраций специфического для ткани-мишени соединения.

Более того, в рамках настоящего изобретения выражение "антигенсвязывающая активность в присутствии специфического для ткани-мишени соединения является более высокой, чем антигенсвязывающая активность в отсутствие соединения" альтернативно может быть сформулировано как "антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения является более низкой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии соединения". Более того, в рамках настоящего изобретения" антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молеку-

лы, содержащей домен) в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения является более низкой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии соединения" альтернативно может быть описано как "антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения является более слабой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии соединения".

Более того, в рамках настоящего изобретения выражение "антигенсвязывающая активность в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения является более высокой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии низкой концентрации соединения" альтернативно может быть сформулировано как "антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения является более низкой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии высокой концентрации соединения". В рамках настоящего изобретения "антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения является более низкой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии высокой концентрации соединения" альтернативно может быть описано как "антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения является более слабой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии высокой концентрации соединения".

Условия измерения антигенсвязывающей активности, отличные от концентрации специфического для ткани-мишени соединения, конкретно не ограничены, и они могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области. Например, ее можно измерять в условиях буфера HEPES и 37°C. Например, для измерения можно использовать Biacore (GE Healthcare) и т.п. Когда антиген представляет собой растворимую молекулу, активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в отношении связывания с растворимой молекулой можно определять путем нанесения антигена в качестве анализируемого соединения на чип, на который иммобилизован антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающая молекула, содержащая домен). Альтернативно, когда антиген представляет собой молекулу мембранного типа, активность связывания с молекулой мембранного типа можно определять путем нанесения антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) в качестве анализируемого соединения на чип, на который иммобилизован антиген.

При условии, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен), содержащегося в антигенсвязывающих молекулах по настоящему изобретению в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения является более слабой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии специфического для ткани-мишени соединения, соотношение между антигенсвязывающей активностью в отсутствие соединения и антигенсвязывающей активностью в присутствии соединения конкретно не ограничено. Однако величина KD (в отсутствие соединения)/KD (в присутствии соединения), которая представляет собой соотношение константы диссоциации (KD) в отношении антигена в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения и KD в присутствии соединения, предпочтительно равно 2 или более, более предпочтительно 10 или более, и еще более предпочтительно 40 или более. Верхний предел величины KD (в отсутствие соединения)/KD (в присутствии соединения) конкретно не ограничен и он может представлять собой любую величину, например 400, 1000 или 10000 при условии, что она может быть обеспечена с помощью технологий, известных специалистам в данной области. Когда антигенсвязывающую активность не наблюдают в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, значение верхнего предела равно бесконечности.

При условии, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен), содержащегося в антигенсвязывающих молекулах по настоящему изобретению в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, является более слабой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, соотношение между антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации соединения и антигенсвязывающей активностью в присутствии высокой концентрации соединения конкретно не ограничено. Однако величина KD (в присутствии низкой концентрации соединения)/KD (в присутствии высокой концентрации соединения), которая представляет собой соотношение константы диссоциации (KD) в отношении антигена в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения и KD в присутствии высокой концентрации соединения, предпочтительно равно 2 или более, более предпочтительно 10 или более, и еще более предпочтительно 40 или более. Верхний предел величины KD (в присутствии низкой концентрации соединения)/KD (в присутствии высокой концентрации соединения) конкретно не ограничен, и он может представлять собой любую величину, например, 400, 1000 или 10000, при условии, что она может быть обеспечена технологиями, известными специалистам в данной области. Когда антигенсвязывающую активность не наблюдают в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, величина верхнего предела равна бесконечности.

Для величины антигенсвязывающей активности, если антиген представляет собой растворимую молекулу, можно использовать константу диссоциации (KD); и если антиген представляет собой молекулу мембранного типа, можно использовать кажущуюся константу диссоциации (кажущаяся KD). Константу диссоциации (KD) и кажущуюся константу диссоциации (кажущаяся KD) можно определять способами, известными специалистам в данной области, например с использованием Biacore (GE Healthcare), графика Скэтчарда, проточного цитометра и т.п.

В качестве другого индикатора, который демонстрирует соотношение между антигенсвязывающей активностью антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) по настоящему изобретению в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения и антигенсвязывающей активностью в присутствии соединения, например, можно, соответственно, использовать константу скорости диссоциации kd. Когда константу скорости диссоциации (kd) используют вместо константы диссоциации (KD) в качестве индикатора, который демонстрирует соотношение активностей связывания, величина kd (в отсутствие соединения)/kd (в присутствии соединения), которая представляет собой соотношение между kd (константа скорости диссоциации) для антигена в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения и kd в присутствии соединения, предпочтительно равна 2 или более, более предпочтительно 5 или более, еще более предпочтительно 10 или более, и еще более предпочтительно 30 или более. Верхний предел величины kd (в отсутствие соединения)/kd (в присутствии соединения) конкретно не ограничен, и он может представлять собой любую величину, например, 50, 100 или 200, при условии, что она может быть обеспечена с использованием обычных технических знаний специалистов в данной области. Когда антигенсвязывающую активность не наблюдают в отсутствие специфического для ткани соединения, отсутствует диссоциация и величина верхнего предела становится равной бесконечности.

В качестве другого индикатора, который демонстрирует соотношение между антигенсвязывающей активностью антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) по настоящему изобретению в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения и антигенсвязывающей активностью в присутствии высокой концентрации соединения, например, можно соответственно использовать константу скорости диссоциации kd. Когда константу скорости диссоциации (kd) используют вместо константы диссоциации (KD) в качестве индикатора, демонстрирующего соотношение активностей связывания, величина kd (в присутствии низкой концентрации соединения)/kd (в присутствии высокой концентрации соединения), которая представляет собой соотношение между kd (константа скорости диссоциации) в отношении антигена в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения и kd в присутствии высокой концентрации соединения, предпочтительно равна 2 или более, более предпочтительно 5 или более, еще более предпочтительно 10 или более и еще более предпочтительно 30 или более. Верхний предел величины kd (в присутствии низкой концентрации соединения)/kd (в присутствии высокой концентрации соединения) конкретно не ограничен, и он может представлять собой любую величину, например 50, 100 или 200, при условии, что она может быть обеспечена с использованием обычных технических знаний специалистов в данной области. Когда антигенсвязывающую активность не наблюдают в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, отсутствует диссоциация, и величина верхнего предела становится равной бесконечности.

Для величины антигенсвязывающей активности, если антиген представляет собой растворимую молекулу, можно использовать константу скорости диссоциации (kd); и если антиген представляет собой молекулу мембранного типа, можно использовать кажущуюся константу скорости диссоциации (кажущаяся kd). Константу скорости диссоциации (kd) и кажущуюся константу скорости диссоциации (кажущаяся kd) можно определять способами, известными специалистам в данной области, например с использованием Biacore (GE Healthcare), проточного цитометра или сходных с ними. В рамках настоящего изобретения при измерении антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен) при определенной концентрации специфического для ткани-мишени соединения, условия, отличные от концентрации соединения, предпочтительно являются одинаковыми.

Например, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), который включает стадии:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в присутствии специфического для ткани-мишени соединения и

(c) отбор антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения.

Например, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), который включает стадии:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения; и

(c) отбор антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения.

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки, который включает стадии:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки с антигеном в присутствии специфического для ткани-мишени соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), которые связываются с антигеном на указанной стадии (a), в условия отсутствия соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который диссоциировал на стадии (b).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки, который включает стадии:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки с антигеном в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), которые связываются с антигеном на стадии (a), в условия присутствия низкой концентрации соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который диссоциировал на указанной стадии (b).

Альтернативно в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) с антигеном в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения;

(b) отбор антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), которые не связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам (или антигенсвязывающим молекулам), отобранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (c).

Альтернативно, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать путем скрининга антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) или их библиотеки, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) с антигеном в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) отбор антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), которые не связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам (или антигенсвязывающим молекулам), отобранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения; и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (c).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии специфического для ткани-мишени соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с колонкой на указанной стадии (a), из колонки в отсутствие соединения; и (c) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), элюированного на указанной стадии (b).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с колонкой на стадии (a), из колонки в присутствии низкой концентрации соединения; и

(c) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), элюированного на стадии (b).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения;

(b) сбор антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), элюированного без связывания с колонкой на стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающему домену (или антигенсвязывающей молекулы), собранному на стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения; и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (c).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) сбор антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), элюированного без связывания с колонкой на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающему домену (или антигенсвязывающей молекуле), собранному на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения; и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (c).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) приведение в контакт антигена с библиотекой антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в присутствии специфического для ткани-мишени соединения;

(b) получение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), полученного на

указанной стадии (b), в условия отсутствия соединения; и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), антигенсвязывающая активность которого на указанной стадии (c) является более слабой, чем антигенсвязывающая активность эталона, выбранного на указанной стадии (b).

Более того, в одном варианте осуществления, предусматриваемом в рамках настоящего изобретения, антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающую молекулу, содержащую домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, можно получать способом скрининга, включающим стадии:

(a) приведение в контакт антигена с библиотекой антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения;

(b) получение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), который связывается с антигеном на указанной стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), полученного на указанной стадии (b), в условия присутствия низкой концентрации соединения; и

(d) выделение антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы), антигенсвязывающая активность которого на указанной стадии (c) является более слабой, чем антигенсвязывающая активность эталона, выбранного на указанной стадии (b).

Упомянутые выше стадии можно повторять два или более раз. Таким образом, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему домену (или антигенсвязывающей молекуле, содержащей домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения, или к антигенсвязывающему домену (или антигенсвязывающей молекуле, содержащей домен) с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения, полученному способами скрининга, которые дополнительно включают стадию повторения стадий с (a) по (c) или с (a) по (d) два или более раз в упомянутых выше способах скрининга. Количество повторов стадий с (a) по (c) или с (a) по (d) конкретно не ограничено, и, как правило, оно составляет десять или менее.

В способах скрининга по настоящему изобретению специфическое для ткани-мишени соединение может представлять собой соединение, определяемое количественной величиной специфичности к ткани-мишени, такой как присутствие в ткани мишени в концентрации (например, в высокой концентрации или в низкой концентрации), отличающейся от концентрации в не являющихся мишенью тканях. Например, специфическое для ткани-мишени соединение присутствует на отличающемся уровне при любых концентрациях. Однако, как правило, специфическое для ткани-мишени соединение может присутствовать в концентрации, увеличенной по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 10^3 раз, по меньшей мере в 10^4 раз, по меньшей мере в 10^5 раз, по меньшей мере в 10^6 раз или более или вплоть до бесконечности (когда соединение отсутствует в не являющихся мишенью тканях).

Пороговое значение, различающее низкие и высокие концентрации, может быть выбрано соответствующим образом согласно изобретению. Например, в неограничивающем варианте осуществления порогового значения для ATP или аденозина, пороговое значение для условий низкой концентрации может быть выбрано соответственно из величин 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ, 1 пМ и 0М. В зависимости от заданного порогового значения, условия высокой концентрации могут быть выбраны соответствующим образом из величины, выбранной из величины, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 10^3 раз, по меньшей мере в 10^4 раз, по меньшей мере в 10^5 раз, и по меньшей мере в 10^6 раз превышающей величину каждой пороговой величины. Более того, в неограничивающем варианте осуществления для PGE2 пороговое значение для условий низкой концентрации может быть соответственно выбрано из величин 10, 1 пМ, 100, 10, 1 фМ и 0 М. В зависимости от заданного порогового значения условия высокой концентрации могут быть выбраны соответственно из величины, выбранной из величины, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 10^3 раз, по меньшей мере 10^4 раз, по меньшей мере 10^5 раз и по меньшей мере в 10^6 раз

превышающей величину каждого порогового значения. Более того, в неограничивающем варианте осуществления для кинуренина, пороговое значение для условий низкой концентрации может быть выбрано соответственно из величин 10, 1 мкМ, 100, 10 и 1 нМ и 0 М. В зависимости от заданного порогового значения условия высокой концентрации могут быть выбраны соответственно из величины, выбранной из величины, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 10^3 раз, по меньшей мере в 10^4 раз, по меньшей мере в 10^5 раз, и по меньшей мере в 10^6 раз превышающей величину каждой пороговой величины.

Антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы) можно измерять способом, известным специалистам в данной области, и условия, отличные от концентрации специфического для ткани-мишени соединения, могут быть соответственно выбраны специалистом в данной области. Антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена (или антигенсвязывающей молекулы) можно оценивать в качестве константы диссоциации (KD), кажущейся константы диссоциации (кажущаяся KD), константы скорости диссоциации (kd), кажущейся константы скорости диссоциации (кажущаяся kd) и т.д. Их можно определять способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием Biacore (GE Healthcare), графика Скэтчарда, FACS и т.п.

В рамках настоящего изобретения стадия отбора антитела или антигенсвязывающего домена с более высокой антигенсвязывающей активностью в присутствии специфического для ткани-мишени соединения, чем в отсутствие соединения, имеет то же значение, что и стадия отбора антитела или антигенсвязывающего домена с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения.

В рамках настоящего изобретения стадия отбора антитела или антигенсвязывающего домена с более высокой антигенсвязывающей активностью в присутствии высокой концентрации специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии низкой концентрации соединения, имеет то же значение, что и стадия отбора антитела или антигенсвязывающего домена с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, чем в присутствии соединения.

При условии, что антигенсвязывающая активность в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения является более низкой, чем антигенсвязывающая активность в присутствии соединения, различие между антигенсвязывающей активностью в присутствии соединения и антигенсвязывающей активностью в отсутствие соединения конкретно не ограничено, однако предпочтительно антигенсвязывающая активность в присутствии соединения относительно антигенсвязывающей активности в отсутствие соединения является более высокой в два раза или более, более предпочтительно в 10 раз или более и еще более предпочтительно в 40 раз или более. Верхний предел различия между антигенсвязывающими активностями конкретно не ограничен, и при условии, что он может быть достигнут способами, известными специалистам в данной области, возможна любая величина, такая как в 400 раз, в 1000 раз или в 10000 раз. В отсутствие специфического для ткани-мишени соединения, когда антигенсвязывающую активность не наблюдают, этот верхний предел становится равным бесконечности.

Антигенсвязывающие домены (или антигенсвязывающие молекулы, содержащие домены) по настоящему изобретению, которые подлежат скринингу упомянутыми выше способами, могут представлять собой любые антигенсвязывающие домены (или антигенсвязывающие молекулы); и, например, можно проводить скрининг упомянутых выше антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул). Например, можно проводить скрининг антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул), имеющих встречающиеся в природе последовательности, и можно проводить скрининг антигенсвязывающих доменов (или антигенсвязывающих молекул) с аминокислотными последовательностями с заменой.

Библиотека

В соответствии с одним вариантом осуществления антигенсвязывающий домен (или антигенсвязывающая молекула, содержащая этот домен) по настоящему изобретению может быть получен из библиотеки, содержащей в основном множество антигенсвязывающих молекул, обладающих отличающимися друг от друга последовательностями, где антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет активность связывания антигена антигенсвязывающей молекулы в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения. Неограничивающим вариантом осуществления низкомолекулярного соединения является, например, специфическое для ткани-мишени соединение или неприродное соединение. Примеры специфического для ткани-мишени соединения включают (1) первичные метаболиты цикла Кребса или гликолитического пути, такие как молочная кислота, янтарная кислота или лимонная кислота, (2) аминокислоты, такие как аланин, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота, (3) метаболиты аминокислот, такие как кинуренин и его метаболиты, такие как антраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин и кинуреновая кислота, (4) метаболиты арахидоновой кислоты, такие как простагландин E2, и (5) нуклеозиды, содержащие структуру пуринового кольца, такие как аденозин, аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP) и аденозинмонофосфат

(AMP). Ниже приведены примеры библиотеки, которая содержит в основном множество таких антигенсвязывающих молекул, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, в которых антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет активность связывания антигенсвязывающей молекулы в отношении антигена в зависимости от аденозина и/или ATP, которые являются специфическими для ткани-мишени соединениями. Библиотеки антигенсвязывающих молекул, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, отличного от аденозина и/или ATP, также можно соответствующим образом использовать в соответствии с примерами, описанными ниже.

В рамках настоящего изобретения "библиотека" относится к набору множества антигенсвязывающих молекул или множества слитых полипептидов, содержащих антигенсвязывающие молекулы, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности, или нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, кодирующих эти молекулы или полипептиды. Последовательности множества антигенсвязывающих молекул или множества слитых полипептидов, содержащих антигенсвязывающие молекулы, в библиотеке не являются однообразными последовательностями, и антигенсвязывающие молекулы или слитые полипептиды, содержащие антигенсвязывающие молекулы, имеют последовательности, которые отличаются друг от друга.

Варианты осуществления "библиотеки" в настоящем описании могут относиться не только к библиотекам, которые могут эффективно обеспечить антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с антигеном-мишенью в присутствии низкомолекулярного соединения, но не связываются с антигеном-мишенью в отсутствие низкомолекулярного соединения (зависимость от низкомолекулярного соединения), но также и к библиотекам, которые могут эффективно обеспечить антитела, которые связываются с антигеном-мишенью в отсутствие низкомолекулярного соединения и не связываются с антигеном-мишенью в присутствии низкомолекулярного соединения (обратная зависимость от низкомолекулярного соединения).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения можно получать слитый полипептид антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению и гетерологичного полипептида. В определенном варианте осуществления слитый полипептид может быть получен путем слияния по меньшей мере с частью белка вирусной оболочки, выбранного из группы, состоящей, например, из белков вирусной оболочки pIII, pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD и pVI, и их мутантов.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой ScFv, Fab-фрагмент, $F(ab)_2$ или $F(ab')_2$. Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится библиотеке, которая содержит множество слитых полипептидов, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, где слитые полипептиды образованы путем слияния этих антигенсвязывающих молекул с гетерологичным полипептидом. В частности, настоящее изобретение относится к библиотеке, которая содержит в основном множество слитых полипептидов, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, в которой слитые полипептиды образованы путем слияния этих антигенсвязывающих молекул по меньшей мере с частью белка вирусной оболочки, выбранного из группы, состоящей, например, из белков вирусной оболочки pIII, pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD и pVI, и их мутантов. Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, кроме того, может содержать домен димеризации. В одном варианте осуществления домен димеризации может быть расположен между вариабельной областью тяжелой или легкой цепи антитела и по меньшей мере частью белка вирусной оболочки. Этот домен димеризации может содержать по меньшей мере одну последовательность димеризации и/или одну или несколько последовательностей, содержащих остаток(и) цистеина. Этот домен димеризации предпочтительно может быть связан с С-концом вариабельной области или константной области тяжелой цепи. Домен димеризации может иметь различные структуры в зависимости от того, получают ли вариабельную область антитела в качестве слитой конструкции компонента полипептида с компонентом белка вирусной оболочки (амбер-стоп-кодон после домена димеризации отсутствует), или получают ли вариабельную область антитела в основном без содержания компонента белка вирусной оболочки (например, амбер-стоп-кодон после домен димеризации
присутствует). Когда вариабельную область антитела получают в основном в качестве слитого полипептида с компонентом белка вирусной оболочки, двухвалентный дисплее обеспечивают с использованием одной или нескольких дисульфидных связей и/или одной последовательности димеризации.

В рамках настоящего изобретения, выражение "последовательности отличаются друг от друга" в выражении "множество антигенсвязывающих молекул, последовательности которых отличаются друг от друга" означает, что последовательности антигенсвязывающих молекул в библиотеке отличаются друг от друга. В частности, в библиотеке количество последовательностей, отличающихся друг от друга, отражает количество независимых клонов с различными последовательностями, и также может обозначаться как "размер библиотеки". Размер библиотеки общепринятой библиотеке фагового дисплея варьируется от 10^6 до 10^{12}. Размер библиотеки может быть увеличен вплоть до 10^{14} с использованием известных способов, таких как рибосомальный дисплей. Однако истинное количество фаговых частиц, используемых в селекции фаговой библиотеки с помощью пэннинга, обычно в 10-10000 раз превышает размер библиотеки. Эта избыточная множественность также называется "числом эквивалентов библиотеки" и означает,

что существует от 10 до 10000 индивидуальных клонов, которые имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Таким образом, в рамках настоящего изобретения выражение "последовательности отличаются друг от друга" означает, что последовательности независимых антигенсвязывающих молекул в библиотеке, за исключением эквивалентов библиотеки, отличаются друг от друга. Более конкретно, вышеуказанное означает, что существует от 10^6 до 10^{14} антигенсвязывающих молекул, последовательности которых отличаются друг от друга, предпочтительно от 10^7 до 10^{12} молекулы, более предпочтительно от 10^8 до 10^{11} молекул, и особенно предпочтительно от 10^8 до 10^{10} молекул, последовательности которых отличаются друг от друга.

В рамках настоящего изобретения, выражение "множество" в выражении "библиотека, в основном состоящая из множества антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен" в основном относится, в случае, например, антигенсвязывающих молекул, слитых полипептидов, полинуклеотидных молекул, векторов или вирусов по настоящему изобретению, к группе из двух или более типов веществ. Например, когда два или более веществ отличаются друг от друга конкретной характеристикой, это означает, что существует два или более типов веществ. Такие примеры могут включать, например, мутантные аминокислоты, наблюдаемые в конкретных аминокислотных положениях в аминокислотной последовательности. Например, когда существует две или более антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, последовательности которых являются по существу одинаковыми или предпочтительно одинаковыми, за исключением нестрогих остатков или за исключением конкретных мутантных аминокислот в гипервариабельных положениях, экспонированных на поверхности, существует множество антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. В другом примере, когда существует две или более полинуклеотидных молекулы, последовательности которых являются по существу одинаковыми или предпочтительно одинаковыми, за исключением нуклеотидов, кодирующих нестрогие остатки, или нуклеотидов, кодирующих мутантные аминокислоты гипервариабельных положений на поверхности, существует множество полинуклеотидных молекул по настоящему изобретению.

Кроме того, в рамках настоящего изобретения выражение "в основном состоящий из" в выражении "библиотека, в основном состоящая из множества антигенсвязывающих молекул" отражает количество антигенсвязывающих молекул, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения (например, специфическое для ткани-мишени соединение), среди независимых клонов с отличающимися последовательностями в библиотеке. В частности, предпочтительно, чтобы существовало по меньшей мере 10^4 антигенсвязывающих молекул, имеющих такую активность связывания, в библиотеке. Более предпочтительно антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей по меньшей мере 10^5 антигенсвязывающих молекул, обладающих такой активностью связывания. Еще более предпочтительно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей по меньшей мере 10^6 антигенсвязывающих молекул, обладающих такой активностью связывания. Особенно предпочтительно антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей по меньшей мере 10^7 антигенсвязывающих молекул, обладающих такой активностью связывания. Еще более предпочтительно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей по меньшей мере 10^8 антигенсвязывающих молекул, обладающих такой активностью связывания. Альтернативно это также предпочтительно может быть выражено как соотношение количества антигенсвязывающих молекул, в которых активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена варьируется в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, и количества независимых клонов, имеющих отличающиеся последовательности, в библиотеке. В частности, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в которой антигенсвязывающие молекулы, обладающие такой активностью связывания, составляют от 10^{-6}% до 80%, предпочтительно от 10^{-5}% до 60%, более предпочтительно от 10^{-4}% до 40% независимых клонов с отличающимися последовательностями в библиотеке. В случае слитых полипептидов, полинуклеотидных молекул или векторов, возможны сходные выражения с использованием количества молекул или отношения к общему количеству молекул. В случае вирусов сходные выражения также могут быть возможными с использованием количества вирионов или отношения к общему количеству вирионов. В качестве неограничивающего варианта осуществления настоящего изобретения, когда множество антигенсвязывающих молекул связывается с одним типом антигена, предпочтительно в библиотеке антигенсвязывающих доменов присутствует по меньшей мере 10, 100, 1000, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 или 10^8 молекул, демонстрирующих такую активность связывания. Более предпочтительно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в которой присутствует по меньшей мере десять антигенсвязывающих молекул, демонстрирующих такую активность связывания. Более предпочтительно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в которой присутствует по меньшей мере 100 антигенсвязывающих молекул, демонстрирующих такую активностью связывания. Особенно предпочтительно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в которой присутствует по меньшей мере 1000 антигенсвязывающих молекул, демонстрирующих такую активность связывания.

Вариант осуществления настоящего изобретения относится к библиотеке, полученной способом, который включает стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из (i)-(iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры; и

(b) конструирование библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, который имеет отличающиеся друг от друга последовательности и имеет модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a).

В рамках настоящего изобретения "один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением" могут быть идентифицированы способами, такими как анализ кристаллической структуры комплекса, образованного низкомолекулярным соединением и антителом, анализ трехмерной структуры с использованием ЯМР или внесение аминокислотных мутаций. В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения остатки антитела, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением, могут быть идентифицированы посредством анализа кристаллической структуры комплекса, образованного низкомолекулярным соединением и антителом. Выражение "вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением", как используют в рамках изобретения, относится к состоянию, при котором происходят межмолекулярные взаимодействия между атомами основной цепи или боковых цепей аминокислот, образующих H-цепь или L-цепь антитела, и атомами низкомолекулярного соединения на расстоянии, которое может иметь эффект на активность связывания; или к состоянию при котором определенные аминокислотные остатки вовлечены в связывание низкомолекулярного соединения, включая непрямой эффект стабилизации трехмерной структуры петли CDR и т.п. в определенной конформации при наличии связывания с низкомолекулярным соединением; и состояния, которое удовлетворяет обоим из этих условий.

"Состояние, при котором происходят межмолекулярные взаимодействия" в рамках настоящего изобретения может быть определено на основе межатомных расстояний, например, между неводородными атомами, составляющими основную цепь или боковые цепи аминокислот, которые образуют H-цепь или L-цепь антитела, и неводородными атомами, составляющими низкомолекулярное соединение, полученное в результате анализа кристаллической структуры комплекса, образованного низкомолекулярным соединением и антителом. Например, упомянутые выше расстояния предпочтительно составляют 3,0Å, 3,2Å, 3,4Å, 3, 6Å, 3,8Å, 4,0Å, 4,2Å, 4,4Å, 46Å, 4, 8Å или 5, 0Å или менее, но не ограничиваются ими. Более предпочтительно примерами межатомного расстояния являются 3,6Å, 3,8Å, 4,0Å или 4,2 Å или менее.

Более конкретно, возможность прямого взаимодействия можно определять, исходя из информации о межатомных расстояниях в трехмерной структуре и типах межмолекулярных взаимодействий, которые происходят, и информации о типах атомов. Определение можно проводить с большей точностью посредством, но не ограничиваясь этим, наблюдения эффекта внесения мутаций аминокислотных остатков, таких как модификация на Ala или Gly, на активность низкомолекулярных соединений.

Что касается "состояния непрямого влияния" в рамках настоящего изобретения, оценку наличия непрямого эффекта на связывание с низкомолекулярным можно проводить, например, путем детального анализа состояний конформации каждого аминокислотного остатка и межмолекулярных взаимодействий с окружающими остатками из трехмерной структуры комплекса низкомолекулярное соединение-антитело. Определение можно более точно проводить путем изучения эффекта внесения мутаций аминокислотных остатков, таких как модификация на Ala или Gly, на активность низкомолекулярных соединений.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения можно выбирать аминокислоты, которые способны поддерживать соответствующий уровень связывания с соединением, даже когда остатки, которые идентифицированы как не вовлеченные в связывание низкомолекулярного соединения, заменены этими аминокислотами. Таким образом, можно конструировать библиотеку, в которой выбранные аминокислоты находятся в выбранных положениях. В этом случае можно конструировать библиотеку, чтобы она содержала в основном множество антигенсвязывающих молекул, которые представляют собой совокупность антигенсвязывающих молекул, остатки которых, идентифицированные как не вовлеченные в

связывание низкомолекулярного соединения, заменены аминокислотами, которые отличаются друг от друга.

В другом варианте осуществления аминокислотные участки, которые не вовлечены в связывание низкомолекулярного соединения, можно считать аминокислотными участками, отличными от любых одного или нескольких аминокислотных участков, выбранных среди аминокислотных участков, вовлеченных в связывание с низкомолекулярным соединением.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения "один или несколько аминокислотных остатков, не вовлеченных в связывание с низкомолекулярным соединением", могут быть идентифицированы способами внесения аминокислотных мутаций. Например, аминокислоты вариабельной области всесторонне модифицируют и связывание каждого варианта с низкомолекулярным соединением измеряют известными способами, в которых используется Biacore и т.п. Активность связывания (аффинность) каждого варианта с низкомолекулярным соединением вычисляют в качестве величины KD. Эту величину KD сравнивают с величиной KD немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, которые являются родительской последовательностью, и модифицированные положения, которые демонстрируют связывание, превышающее определенный стандарт, определяют как аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением. Например, в результате проведения измерений с использованием известных способов, таких как Biacore, активность связывания (аффинность) индивидуальных вариантов с низкомолекулярным соединением вычисляют в качестве величины KD; и участки тяжелой цепи, где изменение не снижает способности связывания с низкомолекулярным соединением до менее чем 1/100, 1/50, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3 или 1/2 относительно немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекула, и участки легкой цепи, где изменение не снижает способности связывания с низкомолекулярным соединением до менее чем 1/100, 1/50, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3 или 1/2 относительно немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, определяют как аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, однако упомянутые выше стандарты являются неограничивающими.

Альтернативно вместо сравнения величины KD немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, которые являются родительской последовательностью, активность связывания (аффинность) индивидуальных вариантов в отношении низкомолекулярного соединения вычисляют в качестве величины KD, и участки тяжелой цепи, имеющие связывающую способность не ниже 10 мМ, 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ или 1 пМ, и участки легкой цепи, имеющие связывающую способность не ниже 10 мМ, 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ или 1 пМ, определяют как аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, однако упомянутые выше стандарты являются неограничивающими. Активность связывания немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы и вариантов с низкомолекулярным соединением можно измерять путем выбора соответствующим образом способов, известных специалистам в данной области (Biacore, ELISA, ECL и т.п).

В другом варианте осуществления аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, можно считать аминокислотными участками, отличными от любых одного или нескольких аминокислотных участков, выбранных из аминокислотных участков, вовлеченных в связывание с низкомолекулярным соединением.

"Конструирование библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности" в рамках настоящего изобретения включает конструирование библиотеки, которая содержит множество вариантов антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, аминокислоты которых в конкретных участках модифицированы в желаемые аминокислоты с использованием известных способов библиотек, таких как библиотеки NNK и TRIM (Gonzalez-Munoz A et al. MAbs 2012; Lee CV et al. J Mol Biol. 2004; Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000; Tiller T et al. MAbs 2013), но, в частности, не ограничивается этим вариантом осуществления.

"Одна или несколько аминокислот" в рамках настоящего изобретения конкретно не ограничивают количество аминокислот и могут представлять собой два или более типов аминокислот, пять или более типов аминокислот, десять или более типов аминокислот, 15 или более типов аминокислот, или 20 или более типов аминокислот.

"Аминокислотные участки, демонстрирующие разнообразие частоты встречаемости аминокислот" в рамках настоящего изобретения относятся к аминокислотным участкам, где два или более типа аминокислот присутствуют с частотой встречаемости 1% или выше в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительское антитело (родительский антигенсвязывающий домен).

"Родительский антигенсвязывающий домен" в рамках настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему домену, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или к антигенсвязывающему домену, обладающему активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, который будет служить в качестве матрицы для получения библиотеки.

"Репертуар антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен" в рамках настоящего изобретения, относится к репертуару последовательностей генов антител, встречающемуся в генах вида животных, из которого происходит соответствующий родительский антигенсвязывающий домен. Не ограничиваясь этим, в качестве примера, когда соответствующий родительский антигенсвязывающий домен происходит из человека, репертуар антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, относится к репертуару последовательностей генов антител, встречающемуся в генах человека, и, когда соответствующий родительский антигенсвязывающий домен происходит из кролика, репертуар антител вида животного, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, относится к репертуару последовательностей генов антител, встречающихся в генах кроликов. Однако следует отметить, что последовательности, которые в действительности не экспрессируются в качестве антител вследствие сдвига рамки считывания или присутствия кодонов терминации/инициации, не включены, даже если они присутствуют в генах.

Когда соответствующий родительский антигенсвязывающий домен происходит из не являющегося человеком животного, его можно гуманизировать общепринятыми способами, и такие способы широко известны специалистам в данной области (например, публикация патента Европы EP 239400, международные публикации WO 1996/002576, WO 1993/012227, WO 1992/003918, WO 1994/002602, WO 1994/025585, WO 1996/034096, WO 1996/033735, WO 1992/001047, WO 1992/020791, WO 1993/006213, WO 1993/011236, WO 1993/019172, WO 1995/001438 и WO 1995/015388, Cancer Res., (1993) 53, 851-856, и BBRC., (2013) 436(3):543-50). Когда соответствующий родительский антигенсвязывающий домен гуманизируют общепринятыми способами, а затем преобразуют в библиотеку, в "репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен" по настоящему изобретению, как антигенсвязывающий домен перед гуманизацией, так и гуманизированный антигенсвязывающий домен можно обрабатывать также, как и родительский антигенсвязывающий домен. Таким образом, как репертуар человека, так и репертуар вида животного, из которого происходят антигенсвязывающие домены до гуманизации, можно использовать в качестве репертуара того же вида животного. Не ограничиваясь этим, в качестве примера, когда антигенсвязывающие домены перед гуманизацией происходят из кроликов, репертуар антител вида животного, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, относится к репертуару последовательностей генов антител, встречающемуся в генах человека и/или кролика. Однако следует отметить, что последовательности, которые в действительности не экспрессируются в качестве антител вследствие сдвига рамки считывания или присутствия кодонов терминации/инициации, не включены, даже если они присутствуют в генах.

В качестве примера репертуар антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, можно исследовать с использованием известной базы данных, но не ограничиваясь ими. Область, где существует разнообразие встречаемости аминокислот, как правило, находится в области CDR. В одном варианте осуществления, при определении гипервариабельных положений известных и/или встречающихся в природе антител, являются полезными данные, представленные в Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md., 1987 и 1991). Более того, в множестве баз данных в Интернете (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/и http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html) представлено множество собранных последовательностей легких цепей и тяжелых цепей человека, и их положения. Информация о последовательностях и их положениях является пригодной для определения гипервариабельных положений в рамках настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления репертуар антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, можно исследовать путем клонирования генов антител, полученных из соответствующего вида животных, и анализа их последовательностей. Не ограничиваясь этим, в качестве примера репертуар антител человека конструируют из генов антител, происходящих из лимфоцитов здоровых индивидумов, и их можно исследовать посредством анализа последовательностей наивной библиотеки, содержащей наивные последовательности, которые представляют собой несмещенные последовательности антител в этом репертуаре (Gejima et al. (Human Antibodies (2002) 11, 121-129); Cardoso et al. (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344)). При исследовании репертуара является желательным анализ по меньшей мере 100 типов последовательностей, предпочтительно 200 типов последовательностей и более предпочтительно 400 типов последовательностей или более.

Что касается "репертуара антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен" в рамках настоящего изобретения, более предпочтительно является желательным исследование подгрупп эмбрионального типа, к которым принадлежит родительский антигенсвязывающий домен, но не ограничиваясь этим. Примеры каркасной области включают последовательности известных в настоящее время каркасные области полностью человеческого типа, приведенные на web-сайте, таком как V-Base (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/). Любую из последовательностей этих каркасных областей можно соответствующим образом использовать в качестве последовательности эмбрионального типа, содержащейся в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению.

Последовательности эмбрионального типа можно подразделять на подгруппы, исходя из их сходства (Tomlinson et al., J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798; Williams and Winter, Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461 и Cox et al., Nat. Genetics (1994) 7, 162-168). В одном примере описано семь подгрупп вариабельных

областей тяжелой цепи в антителах человека, семь подгрупп Vκ и десять типов подгрупп Vλ и, не ограничиваясь конкретно этим вариантом осуществления, каждый из аминокислотных участков можно исследовать посредством анализа аминокислотного репертуара в подгруппе, к которой принадлежит родительский антигенсвязывающий домен.

В "аминокислотных участках, которые не являются важными для формирования канонической структуры" по настоящему изобретению, каноническая структура антитела демонстрирует кластеризацию трехмерных структур в основном CDR1 и CDR2 тяжелых и легких цепей антител, и структуры можно классифицировать в зависимости от подгрупп антител и длины и последовательности CDR. В каждой канонической структуре остатки, важные для поддержания структуры, уже известны, и, ссылаясь на данные Chothia et al. (J. Mol. Biol. (1992) 227, 799-817), Al-Lazikani et al. (J. Mol. Biol. (1997) 273, 927-948), Tomlinson et al. (J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798) и т.п., является возможной идентификация канонической структуры, по которой классифицируют соответствующую родительскую антигенсвязывающую молекулу и остатки, важные для этой структуры.

Более того, даже в антигенсвязывающих доменах, отличных антигенсвязывающих доменов антител, известно, что эти остатки являются важными для поддержания структуры; и, не ограничиваясь этим, аминокислотные участки, не являющиеся важными для формирования канонической структуры в каждом антигенсвязывающем домене, можно идентифицировать посредством структурного анализа и т.п. полученных мутантов.

Другим вариантом осуществления библиотеки по настоящему изобретению является, например, библиотека, описанная ниже.

Библиотека, которая получена способом, включающим стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из с (i) по (iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры;

(b) получение множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a);

(c) идентификация одной или нескольких модификаций аминокислот, которые по существу не изменяют активность связывания каждого из упомянутых выше вариантов с низкомолекулярным соединением; и

(d) получение библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют одну или несколько модификаций аминокислот, идентифицированных на стадии (c).

На "стадии получения множества вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности" по настоящему изобретению, среди аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a), участки в CDR1 и CDR2 могут быть заменены аминокислотами, имеющими частоту 10% или более, 9% или более, 8% или более, 7% или более, 6% или более, 5% или более, 4% или более, 3% или более, 2% или более, или 1% или более в эмбриональном типе, и участки в CDR3 могут быть заменены аминокислотами, имеющими частоту встречаемости 10% или более, 9% или более, 8% или более, 7% или более, 6% или более, 5% или более, 4% или более, 3% или более, 2% или более, или 1% или более в эмбриональном типе, для получения индивидуальных вариантов, однако получение не ограничивается этим.

"Множество вариантов" в рамках настоящего изобретения относится к индивидуально различающимся вариантам антигенсвязывающих доменов, полученным путем замены по меньшей мере одной или нескольких аминокислот в немодифицированном антигенсвязывающем домене, который является родительской последовательностью.

"Стадия идентификации одной или нескольких модификаций аминокислот, которые по существу не изменяют активность связывания каждого из упомянутых выше вариантов с низкомолекулярным соединением" в рамках настоящего изобретения имеет указанное ниже значение. Например, связывание каждого варианта с низкомолекулярным соединением измеряют известным способом с использованием

Biacore или сходных с ним, и активность связывания (аффинность) каждого варианта с низкомолекулярным соединением вычисляют в качестве величины KD. Эту величину KD сравнивают с величиной KD немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, которые являются родительской последовательностью, и модифицированные положения, которые демонстрируют связывание, превышающее определенный стандарт, определяют как участки, которые могут быть изменены; и, не ограничиваясь этим, аминокислоты, замененные в этих участках, могут быть определены как аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку (может быть обеспечено появление нестрогих остатков в библиотеке). Альтернативно вместо сравнения величины KD индивидуального варианта с величиной KD немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, которые являются родительской последовательностью, можно определить модифицированные положения, которые демонстрируют связывание, превышающее связывания определенного стандарта, в качестве участков, которые могут быть изменены; и, не ограничиваясь этим, аминокислоты, замененные в этих участках, могут быть определены как аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку (может быть обеспечено появление нестрогих остатков в библиотеке).

В рамках настоящего изобретения при определении аминокислот, которые можно включать в библиотеку, "модифицированные положения, которые демонстрируют связывание, превышающее связывание определенного стандарта" имеют указанное ниже значение. Например, в результате проведения измерений с использованием известных способов, таких как Biacore, активность связывания (аффинность) каждого варианта с низкомолекулярным соединением вычисляют как величину KD, и участки тяжелой цепи, где изменение не снижает способности к связыванию с низкомолекулярным соединением до менее чем 1/100, 1/50, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3 или 1/2 от немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, и участки легкой цепи, где изменение не снижает способности к связыванию с низкомолекулярным соединением до менее чем 1/100, 1/50, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3 или 1/2 от немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, определяют в качестве участков, которые могут быть изменены; и аминокислоты, замененные в этих участках, могут быть определены как аминокислотные участки, которые могут быть преобразованы в библиотеку, однако упомянутые выше стандарты являются неограничивающими. Альтернативно вместо сравнения величины KD немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы, которые являются родительской последовательностью, активность связывания (аффинность) индивидуального варианта с низкомолекулярным соединением вычисляют в качестве величины KD, и участки тяжелой цепи, имеющие связывающую способность не ниже 10 мМ, 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ или 1 пМ, и участки легкой цепи, имеющие связывающую способность не ниже 10 мМ, 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100, 10 или 1 пМ, определяют в качестве участков, которые могут быть изменены; и аминокислоты, замененные в этих участках, могут быть определены в качестве положений аминокислот, которые могут быть преобразованы в библиотеку, однако упомянутые выше стандарты являются неограничивающими.

Активность связывания немодифицированного антигенсвязывающего домена/молекулы и вариантов с низкомолекулярным соединением можно измерять посредством выбора надлежащим образом способов, известных специалистам в данной области (Biacore, ELISA, ECL и т.п.).

В другом варианте осуществления аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, можно считать аминокислотными участками, отличными от любых одного или нескольких аминокислотных участков, выбранных из аминокислотных участков, вовлеченных в связывание с низкомолекулярным соединением.

В рамках настоящего изобретения "стадия получения библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы и множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют одну или несколько модификаций аминокислот, идентифицированных на стадии (d)" включает, но не ограничивается ими, варианты осуществления конструирования библиотеки, так чтобы частоты встречаемости всех аминокислот, идентифицированных на стадии (d), в конкретном участке стали эквивалентными (например, когда репертуар аминокислот равен десяти, встречаемость каждой аминокислоты будут доводить до 10%).

Другой вариант осуществления библиотеки по настоящему изобретению представляет собой, например, библиотеку, указанную ниже.

Библиотека, полученная способом, который включает стадии:

1) приведение в контакт библиотеки, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, с низкомолекулярным соединением; и

2) концентрирование из библиотеки нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения.

Более того, в другом варианте осуществления библиотека представляет собой библиотеку, в кото-

рой антигенсвязывающая молекула представляет собой антигенсвязывающую молекулу, содержащую вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи антитела, и ее получают способом, который включает любую из стадий:

1) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, из библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях тяжелой цепи;

2) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, из библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях легкой цепи; и

3) конструирование библиотеки путем объединения нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающую молекулу, концентрированную из каждой библиотеки вариабельных областей на стадиях 1) и 2).

"Концентрировать" в рамках настоящего изобретения относится к увеличению соотношения нуклеиновых кислот, кодирующих варианты, имеющие желаемую активность, которые присутствуют в библиотеке, относительно соотношения в библиотеке до проведения действия концентрирования. Не ограничиваясь этим, в качестве примера концентрирование нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, можно проводить путем увеличения соотношения присутствия нуклеиновых кислот, кодирующих варианты антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, посредством пэннинга. Более конкретно, не ограничиваясь этим, в качестве примера является возможным увеличение соотношения присутствия нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты антигенсвязывающих молекул, обладающие активностью связывания с низкомолекулярным соединением, посредством пэннинга, который вовлекает приведение в контакт низкомолекулярного соединения с фагами, презентирующими библиотеку, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул на их поверхности, посредством способа фагового дисплея, удаление фагов, презентирующих молекулы, которые не обладают активностью связывания, и фагов, не презентирующих молекулы, посредством промывания, а затем сбор только фагов, которые презентируют антигенсвязывающие молекулы, которые сохраняют связывание. Более конкретно, соотношение присутствия нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты, обладающие желаемой активностью, возрастает предпочтительно в 1,1 раза или более относительно библиотеки до проведения концентрирования. Более предпочтительно библиотеку по настоящему изобретению можно получать путем увеличения соотношения присутствия нуклеиновых кислот, кодирующих варианты, обладающие желаемой активностью, в 1,2 раза или более, в 1,5 раза или более, в 2 раза или более, в 4 раза или более, в 10 раз или более, в 25 раз или более или в 100 раз или более.

Способ получения библиотеки

Изобретение в рамках настоящей заявки также относится к способам получения различных вариантов осуществления "библиотек", включенных в изобретение настоящей заявки, описанное выше.

"Способ получения библиотеки" в рамках изобретения настоящей заявки не ограничивается каким-либо из конкретных способов, показанных в качестве примеров ниже, и включает любой способ, который может продуцировать описанные выше "библиотеки" по изобретению настоящей заявки.

Например, "способ получения библиотеки" в рамках изобретения настоящей заявки включает способы, показанные в качестве примеров ниже.

Каждое из конкретных утверждений в "способе получения библиотеки", показанных в качестве примеров ниже, имеет техническую значимость, как подробно описано выше в отношении "библиотеки" в рамках изобретения настоящей заявки (Пример 1).

Способ получения библиотеки, которая содержит в основном

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения;

где способ включает стадии (a) и (b) ниже:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из с (i) по (iii) ниже в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в

зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен;

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры; и

(b) конструирование библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a).

Пример 2.

Способ получения библиотеки, которая содержит в основном:

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения;

где способ включает стадии с (a) по (d) ниже:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из с (i) по (iii) ниже в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или несколько аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или несколько аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или несколько аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры;

(b) получение множества вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a);

(c) идентификация одной или нескольких модификаций аминокислот, которые по существу не изменяют активность связывания каждого из упомянутых выше вариантов с низкомолекулярным соединением; и

(d) получение библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающии домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют одну или несколько модификаций аминокислот, идентифицированных на стадии (c).

Пример 3.

Способ получения библиотеки, которая содержит в основном

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения;

где способ включает стадии 1) и 2) ниже:

1) приведение в контакт библиотеки, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, с низкомолекулярным соединением; и

2) концентрирование из библиотеки нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения.

Пример 4.

Способ получения библиотеки, которая содержит в основном:

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения;

где способ включает любую из стадий с 1) по 3) ниже:

1) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения из библиотеки (примера 3), которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях тяжелой цепи;

2) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания низкомолекулярным соединением из библиотеки (примера 3), которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях легкой цепи; и

3) конструирование библиотеки путем комбинирования нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающую молекулу, концентрированных из каждой из библиотек вариабельных областей стадий 1) и 2).

Пример 5.

Способ получения библиотеки по любому из от (примера 1) до (примера 4), описанного выше, где антигенсвязывающие молекулы представляют собой слитые полипептиды, полученные путем слияния антигенсвязывающего домена по меньшей мере с частью белка оболочки вируса.

Пример 6.

Способ получения библиотеки по любому из от (примера 1) до (примера 4), описанных выше, где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие молекулы, содержащие тяжелые цепи и легкие цепи антител, и способ дополнительно включает стадию конструирования синтетической библиотеки тяжелых цепей и/или легких цепей.

Пример 7.

Способ получения библиотеки согласно (примеру 6), описанному выше, где тяжелые цепи и/или легкие цепи антител включают каркасную последовательность, происходящую из последовательности эмбрионального типа.

Пример 8.

Способ получения библиотеки согласно одному из от (примера 1) до (примера 7), описанных выше, где упомянутое выше низкомолекулярное соединение представляет собой специфическое для ткани-мишени соединение или неприродное соединение.

Пример 9.

Способ получения библиотеки согласно любому из от (примера 1) до (примера 8), описанных выше, где упомянутая выше ткань-мишень представляет собой злокачественную ткань или воспаленную ткань.

Пример 10.

Способ получения библиотеки согласно (примеру 9), описанному выше, где соединение, специфическое для злокачественной ткани, представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидов, которые имеют структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов метаболизма сахаров и никотинамида и его метаболитов.

Пример 11.

Способ получения библиотеки согласно любому из от примера 1 до примера 10, описанных выше, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

Пример 12.

Способ получения библиотеки согласно любому из от примера 1 до примера 11, описанных выше, где аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, представляют собой участки, отличные от любой одной или нескольких аминокислот, выбранных из аминокислот, указанных ниже:

Н-цепь: 97, 100c, 101, 94, 95, 100d, 100e, 33, 50, 52, 56, 57, 58, 99, 100, 100a, 54, 55 (нумерация Kabat); и L-цепь: 49, 55, 95c, 96, 95a, 95b (нумерация Kabat).

Библиотека (другие варианты осуществления)

Вариант осуществления библиотеки по настоящему изобретению, который может обеспечить антигенсвязывающие домены, антигенсвязывающая способность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, представляет собой, например, библиотеку, описанную ниже.

Библиотека, которая содержит в основном:

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где антигенсвязывающих домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, обладающий активностью связывания с низкомолекулярным соединением. Библиотека согласно этому варианту осуществления предпочтительно имеет разнообразие $1{,}2\times10^8$ или выше.

Термин "содержит в основном" в описании библиотеки, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, в этом варианте осуществления отражает количество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением (например, специфическое для ткани-мишени соединение) среди ряда независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. В частности, присутствие по меньшей мере 10^4 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют такую активность связывания, в библиотеке является предпочтительным. Иными словами, термин в подходящем случае может быть выражен как соотношение количества антигенсвязывающих молекул, в которых активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена отличается в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярного соединения и количества независимых клонов, последовательность которых различается в библиотеке. В частности, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, которая содержит антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют такую активность связывания, в соотношении от 10^{-6}% до 80%, или от 10^{-5}% до 60%, предпочтительно от 10^{-4}% до 40%, более предпочтительно от 10^{-3}% до 40%, и еще более предпочтительно от 10^{-2}% до 40%, к количеству независимых клонов, последовательность которых различается, в библиотеке. Аналогично описанному выше случаю, слитые полипептиды, полинуклеотидные молекулы или векторы также могут быть представлены в качестве количества молекул или отношения ко всем молекулам. Кроме того, вирусы также могут быть представлены в качестве количества индивидуальных вирусов или отношения ко всем вирусам, как в описанном выше случае.

Вариант осуществления библиотеки по настоящему изобретению, который может обеспечить антигенсвязывающие домены, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, представляет собой, например, библиотеку, описанную ниже.

Библиотека, которая содержит в основном:

(i) множество молекул антител, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество молекул антител, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности;

где молекулы антител обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением и обладают разнообразием, которое удовлетворяет любому из с (i) по (vi) ниже:

(i) разнообразие CDR1 тяжелой цепи, составляющее 13 или выше;

(ii) разнообразие CDR2 тяжелой цепи, составляющее 129 или выше;

(iii) разнообразие CDR3 тяжелой цепи, составляющее 5 или выше;

(iv) разнообразие CDR1 легкой цепи, составляющее 193 или выше;

(v) разнообразие CDR2 легкой цепи, составляющее 7 или выше; и

(vi) разнообразие CDR3 легкой цепи, составляющее 17 или выше.

Термин "содержит в основном" в описании библиотеки, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, в этом варианте осуществления отражает количество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением (например, специфическое для ткани-мишени соединение) среди количества независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. В частности, присутствие по меньшей мере 10^4 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют такую активность связывания, является предпочтительным. Иными словами, термин в подходящем случае можно выражать как соотношение количества антигенсвязывающих

молекул, в которых активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена отличается в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярного соединения, и количества независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. В частности, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют такую активность связывания, в соотношении от 10^{-6}% до 80% или от 10^{-5}% до 60%, предпочтительно от 10^{-4}% до 40%, более предпочтительно от 10^{-3}% до 40% и еще более предпочтительно от 10^{-2}% до 40%, к количеству независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. Как и в описанном выше случае слитые полипептиды, полинуклеотидные молекулы или векторы также могут быть представлены в качестве количеств молекулы или отношения ко всем молекулам. Кроме того, аналогично описанному выше случаю, вирусы также могут быть представлены в качестве количества индивидуальных вирусов или отношения ко всем вирусам.

Вариант осуществления библиотеки по настоящему изобретению, который может обеспечить антигенсвязывающие домены, антигенсвязывающая способность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, представляет собой, например, библиотеку, описанную ниже.

Библиотека, которая содержит в основном:

(i) множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности;

где антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, который обладает активностью связывания с низкомолекулярным соединением, и библиотека предназначена для получения антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения.

Термин "содержит в основном" в описании библиотеки, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, в этом варианте осуществления отражает количество антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением (например, специфическое для ткани-мишени соединение) среди количества независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. В частности, присутствие по меньшей мере 10^4 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют такую активность связывания, является предпочтительным. Иными словами, термин в подходящем случае можно выражать как соотношение количества антигенсвязывающих молекул, в которых активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена отличается в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярного соединения, и количества независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. В частности, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют такую активность связывания, в соотношении от 10-6% до 80%, или от 10^{-5}% до 60%, предпочтительно от 10^{-4}% до 40%, более предпочтительно от 10^{-3}% до 40%, и еще более предпочтительно от 10^{-2}% до 40%, к количеству независимых клонов, последовательность которых отличается, в библиотеке. Как и в описанном выше случае, слитые полипептиды, полинуклеотидные молекулы, или векторы также могут быть представлены в качестве количеств молекулы или отношения ко всем молекулам. Кроме того, аналогично описанному выше случаю, вирусы также могут быть представлены в качестве количества индивидуальных вирусов или отношения ко всем вирусам, как и в описанном выше случае.

Аминокислоты, которые изменяют активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярного соединения

Что касается способов получения (способов скрининга) матриц (антигенсвязывающие домены, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или антигенсвязывающие домены, обладающие активностью связывания с низкомолекулярным соединением) для применения при получении библиотеки по настоящему изобретению, эти антигенсвязывающие домены и т.п. можно получать любым способом. Является возможным применение предварительно существующих антигенсвязывающих доменов или антител и предварительно существующих библиотек (фаговые библиотеки и т.д.), антител или библиотек, полученных из гибридом, полученных путем иммунизации животных, или из В-клеток иммунизированных животных, например, антител или библиотек, полученных из иммунных клеток, таких как В-клетки, животных, иммунизированных конъюгатом, в котором аденозин или АТР, который представляет собой вариант осуществления низкомолекулярного соединения, пригодным образом связан с адъювантным агентом, таким как высокоиммуногенный пептидный эпитоп Т-клеток, но не ограничиваясь ими. Неограничивающий пример пептидного эпитопа Т-клеток в подходящем случае включает происходящий из столбнячного токсина хелперный пептид p30 (показанный в SEQ ID NO: 4, и также упоминаемый как фрагмент С (FrC)).

В неограничивающем варианте осуществления способа получения антигенсвязывающих доменов или антител по настоящему изобретению, полученных упомянутым выше способом скрининга, является возможным использование библиотеки, которая содержит, например, модуль приблизительно из 35 аминокислот, называемый А-доменом, который содержится в белке клеточной мембраны авимере in vivo; аднектин, содержащий домен 10Fn3, который связывается с белком в фибронектине, гликопротеин, экспрессируемый на клеточных мембранах; аффиантитело, которое имеет в качестве каркаса IgG-связывающий домен, состоящий из трехспирального пучка белка А из 58 аминокислот; сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPin), которые представляют собой области, экспонированные на молекулярной поверхности анкириновых повторов (AR), имеющие структуру повторяющихся уложенных стопками субъединиц, состоящих из изгиба, содержащего 33 аминокислотных остатка, двух антипараллельных спиралей и петли; антикалины и т.п., в которых четыре области петли поддерживают одну сторону структуры бочонка, образованную восемью антипараллельными цепями, скрученными в направлении центра, которые являются высококонсервативными в молекулах липокалинов, таких как липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL); и область углубления, образованная структурой параллельного листа внутри структуры в форме подковы, образованной уложенными стопкой повторами модуля лейцин-богатых повторов (LRR) вариабельного рецептора лимфоцитов (VLR), который не имеет структуры иммуноглобулинов и используется приобретенной иммунной системой у бесчелюстных позвоночных, таких как минога и миксина.

Предпочтительные антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению включают, например, антигенсвязывающие домены, содержащие вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Предпочтительные примеры таких антигенсвязывающих доменов включают "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv 2 (scFv2)", "Fab", "F(ab')2" и IgG, а также можно использовать библиотеку, содержащую их.

Более того, в качестве неограничивающего варианта осуществления способа получения антигенсвязывающих доменов или антител по настоящему изобретению, получаемых упомянутым выше способом скрининга, является возможным использование способа получения антигенсвязывающих доменов или антител, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, посредством пэннинга с использованием упомянутой выше библиотеки. В качестве библиотеки можно использовать, например, но не ограничиваясь этим, библиотеку фагового дисплея, библиотеку рибосомального дисплея, библиотеку дисплея мРНК, библиотеку дисплея кДНК, библиотеку дисплея CIS, библиотеку дисплея E. coli, библиотеку дисплея грамположительных бактерий, библиотеку дрожжевого дисплея, библиотеку дисплея клеток млекопитающих, библиотеку вирусного дисплей и библиотеку вирусного дисплея in vitro.

В одном варианте осуществления упомянутого выше способа получения антигенсвязывающих доменов или антител, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, посредством пэннинга, можно использовать низкомолекулярные соединения, фиксированные на носителе, таком как гранулы. Фиксированные низкомолекулярные соединения можно получать, например, посредством, но не ограничиваясь ими, способа приведения в контакт низкомолекулярных соединений, синтезированных так, чтобы они были химически связаны с биотином через линкер с гранулами или планшетом, на которых фиксированы стрептавидин или нейтравидин, или способа присоединения низкомолекулярных соединений, ковалентно связанных с адъювантом, таким как бычий сывороточный альбумин (BSA), к гранулам или планшетам посредством гидрофобного взаимодействия. Эти способы уже являются общеизвестными (J. Immunol. Methods. 2003 Sep, 280 (1-2) : 139-55; BMC Biotechnol. 2009 Jan 29; 9: 6. doi: 10,1186/1472-6750-9-6). Антигенсвязывающие домены или антитела, обладающие активностью связывания с низкомолекулярными соединениями, можно получать путем сбора антигенсвязывающих доменов или антител, которые обладают активностью связывания с фиксированными низкомолекулярными соединениями.

Альтернативно в другом варианте осуществления упомянутого выше способа получения антигенсвязывающих доменов или антител, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, посредством пэннинга, можно использовать флуоресцентно меченное низкомолекулярное соединение, или меченное биотином низкомолекулярное соединение и флуоресцентно меченный стрептавидин (или нейтравидин или авидин).

Антигенсвязывающие домены или антитела, обладающие активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, можно получать путем приведения в контакт флуоресцентно меченного низкомолекулярного соединения, или меченного биотином низкомолекулярного соединения и флуоресцентно меченного стрептавидина (или нейтравидина или авидина), с библиотекой, представленной на клеточной поверхности и т.п., а затем с использованием способа сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS). Эти способы уже являются общеизвестными (Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Sep 26; 97 (20) : 10701-5).

Более того, в неограничивающем варианте осуществления способа получения антигенсвязывающих доменов или антител по настоящему изобретению, полученных упомянутым выше способом скрининга, можно использовать предварительно существующие антигенсвязывающие домены, обладающие актив-

ностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения. Например, когда в качестве примера используют аденозин и АТР, но не ограничиваясь ими, в качестве антигенсвязывающего домена можно использовать молекулы, принадлежащие киназному семейству, обладающие активностью связывания АТР, и молекулы, принадлежащие семейству аденозиндезаминаз, обладающие активностью связывания аденозина. Путем получения библиотеки частей этих молекул, которые не вовлечены в связывание АТР и/или аденозина, является возможным получение антигенсвязывающих молекул, которые демонстрируют связывание антигена в зависимости от концентрации АТР и/или аденозина.

В качестве способа получения антигенсвязывающих доменов с использованием белков, не являющихся подобными антителам, можно использовать библиотеку, продуцируемую с использованием образующих петлю участков и поверхностных остатков α-спирали белка, не являющегося подобному антителу, но не ограничиваясь ими. Способы конструирования таких библиотек уже известны (Nat Biotechnol. 2004 May; 22 (5): 575-82; J Mol Biol. 1998 Dec 11; 284 (4): 1141-51; и Nat Biotechnol. 1997 Aug; 15 (8): 772-7). Более того, способы получения антигенсвязывающих доменов, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением, посредством пэннинга с использованием библиотеки, сконструированной, как описано выше, являются общеизвестными. В одном примере сконструированную библиотеку экспрессируют на поверхности фагов способом фагового дисплея. Фаги, экспрессирующие связывающие домены, которые связываются с низкомолекулярным соединением, связанным с бычьим сывороточным альбумином, биотином и т.п., можно отбирать с использованием гранул, иммунных пробирок, планшетов и т.п. Такие способы получения антигенсвязывающих доменов, не являющихся подобными антитела, которые обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением, уже известны (Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Mar 2; 96 (5): 1898-903). Более того, аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, и аминокислотные участки, не являющиеся важными для образования канонических структур, можно идентифицировать посредством, но не ограничиваясь этим, проведения анализа кристаллической структуры этих антигенсвязывающих доменов, которые обладают активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, или путем получения вариантов и оценки их активности связывания (J Mol Biol. 2003 Jul 4; 330 (2): 385-96, Proteins. 2003 Oct 1; 53 (1): 121-9). Библиотеки, описанные в рамках настоящего изобретения, можно конструировать путем внесения разнообразия в аминокислотные участки, идентифицированные таким образом. Более того, в другом варианте осуществления настоящего изобретения также можно использовать библиотеку ограниченных аминокислотных участков. Антикалин описан в качестве антигенсвязывающего домена, не являющегося подобным антителу, и он представляет собой область с четырьмя петлями, которая служит опорой одной стороны структуры бочонка, образованного восемью антипараллельными цепями, скрученными в направлении центра, которые являются высококонсервативными в молекулах липокалина, таких как липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL). Известно, что в антикалине, аминокислотные участки, используемые для связывания с низкомолекулярным соединением, отличаются от аминокислотных участков, используемых для связывания белка; и в качестве примера, но не ограничиваясь этим, известно, что можно использовать различающиеся библиотеки, в которых в аминокислотные участки, которые могут быть вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением, и в аминокислотные участки, которые могут быть вовлечены в связывания с белком, соответственно, внесены мутации (FEBS Lett. 2014 Jan 21,"588(2): 213-8). Таким образом, является возможным конструирование библиотеки по настоящему изобретению путем получения антигенсвязывающих доменов, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, из библиотеки, которая может обеспечить домены для связывания низкомолекулярного соединения, а затем внесение разнообразия в аминокислотные участки, использованные для получения антигенсвязывающих доменов, обладающих активностью связывания белка в отношении полученных антигенсвязывающих доменов, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения. Более конкретно, известно, что в липокалине 2 (Lcn2) человека, каждый из аминокислотных участков V33, L36, I41, Y52, T54, S68, L70, W79, R81, K134, T136 и Y138, можно использовать в качестве участка для внесения разнообразия в библиотеку для получения доменов, связывающих низкомолекулярное соединение (J Am Chem Soc. 2009 Mar 18; 131 (10) : 3565-76); и аналогично каждый из аминокислотных участков A40, L42, E44, K46, D47, Q49, K50, L70, R72, K73, D77, W79, P101, G102, L103, K125, S127, Q128, R130 и Y132 можно использовать в качестве участка для внесения разнообразия в библиотеку для получения связывающих белок доменов (Proc Natl Acad Sci USA. 2009 May 19; 106 (20) : 8198-203). Таким образом, не ограничиваясь этим, является возможным конструирование библиотеки по настоящему изобретению, первоначально используя библиотеку, которая содержит антигенсвязывающие домены, полученные для обеспечения разнообразия в каждом из аминокислотных участков V33, L36, 141, Y52, T54, S68, L70, W79, R81, K134, T136 и Y138, с получением антигенсвязывающих доменов, обладающих активностью связывания с низкомолекулярным соединением, а затем внесение разнообразия в полученные антигенсвязывающие домены, обладающие активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения в каждом из аминокислотных участков A40, L42, E44, K46, D47, Q49, K50, R72, K73, D77, P101, G102, L103, K125, S127, Q128, R130 и Y132. Для антител и антигенсвязывающих доменов, не являющихся подобными антителам, отличных от молекул липокалина, специалисты в данной области также могут сконструировать библио-

теки по настоящему изобретению путем соответствующего обращения к описанным выше способам конструирования библиотек. В другом варианте осуществления можно использовать антигенсвязывающие домены, обладающие активностью связывания с низкомолекулярным соединением. В качестве примера, можно использовать ингибитор агрегации 1 Rhodnius prolixus (RPAI-1), принадлежащий семейству липокалинов, о котором известно, что он обладает активностью связывания с ATP, ADP, AMP и аденозином (J Biol Chem. 2000 Apr 28; 275 (17): 12639-50 и Biochemistry, 2002 Mar 19; 41 (11): 3810-8). Аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, и аминокислотные участки, не являющиеся важными для формирования канонической структуры, можно идентифицировать путем анализа кристаллической структуры антигенсвязывающих доменов, или путем получения вариантов, а затем оценки их активности связывания, но не ограничиваясь ими. Библиотеки по настоящему изобретению можно конструировать путем внесения разнообразия в аминокислотные участки, идентифицированные таким образом. Присутствие антигенсвязывающих доменов, принадлежащих семейству липокалинов, обладающих активностью связывания с различными низкомолекулярными соединениями помимо ATP, ADP, AMP и аденозина, такими как гистамин, серотонин, адреналин и норадреналин, известны (J Biol Chem. 2003 Feb 14; 278 (7): 4611-7 и Expert Rev Clin Immunol. 2007 Jul; 3 (4): 491-501); и, не ограничиваясь этим, их можно использовать для конструирования библиотек по настоящему изобретению в которых используются антигенсвязывающие домены, обладающие активностью связывания с различными низкомолекулярными соединениями. Друд руги антигенсвязывающих доменов, не являющихся подобными антителам, и антител библиотеки по настоящему изобретению также могут быть получены специалистами в данной области путем соответствующего обращения к описанным выше способам конструирования библиотек.

В качестве неограничивающего варианта осуществления настоящего изобретения подробное описание составлено с использованием аденозина и/или ATP в качестве примеров, однако представленные ниже примеры также можно соответствующим образом использовать с низкомолекулярными молекулами, отличными от аденозина и/или ATP. Примеры аминокислот, которые изменяют активность связывания антигена у антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, как описано выше, могут включать аминокислоты, которые формируют мотив, связывающий аденозин и/или ATP. Аминокислотные положения, где упомянутые выше аминокислоты содержатся в антигенсвязывающем домене, не ограничиваются каким-либо конкретным положением и при условии, что активность связывания антигена у антигенсвязывающего домена изменяется в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, является возможным любое положение в вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи, формирующей антигенсвязывающий домен. Более конкретно, антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей в основном антигенсвязывающие молекулы, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности, в которых аминокислоты, которые изменяют активность связывания антигена у антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, содержатся в антигенсвязывающем домене тяжелой цепи. В неограничивающем варианте осуществления антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, содержащей в основном антигенсвязывающие молекулы, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности, в которых аминокислоты, которые изменяют активность связывания антигена у антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP содержатся в CDR1, CDR2 и/или CDR3 тяжелой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в основном содержащей антигенсвязывающие молекулы, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, в которых аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, содержатся в FR1, FR2, FR3 и/или FR4 тяжелой цепи.

Более того, в одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в основном содержащей антигенсвязывающие молекулы, обладающие отличающимися друг от друга последовательностями, в которых аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, содержатся в антигенсвязывающем домене тяжелой цепи и/или легкой цепи. В неограничивающем варианте осуществления антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в основном содержащей антигенсвязывающие молекулы, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, в которых аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, содержатся в CDR1, CDR2 и/или CDR3 тяжелой цепи и/или легкой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению можно получать из библиотеки, в основном содержащей антигенсвязывающие молекулы, имеющие отличающиеся друг от друга последовательности, в которых аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, содержатся в FR1, FR2, FR3 и/или FR4 тяже-

лой цепи и/или легкой цепи.

В неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот включают любые одну или несколько аминокислот, выбранные из аминокислот в положениях 52, 52a, 53, 96, 100a и 100c, содержащихся в вариабельной области тяжелой цепи. Также в неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот включают одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот, включающих Ser в положении 52, Ser в положении 52a, Arg в положении 53, Gly в положении 96, Leu в положении 100a и Trp в положении 100c, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи.

В качестве каркасной последовательности вариабельных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы можно использовать любую каркасную последовательность при условии, что в антигенсвязывающем домене тяжелой цепи и/или легкой цепи содержатся аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP. Происхождение каркасных последовательностей не ограничено, и их можно получать из организма человека или любых не являющихся человеком организмов. Такие организмы предпочтительно включают мышей, крыс, морских свинок, хомячков, песчанок, кошек, кроликов, собак, коз, овец, животных семейства бычьи, лошадей, верблюдов и организмы, выбранные из не являющихся человеком приматов. В особенно предпочтительном варианте осуществления каркасные последовательности вариабельной области легкой цепи и/или тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы предпочтительно имеют каркасные области человека эмбрионального типа. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, если каркасные последовательности целиком представляют собой последовательности человека, полагают, что антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению индуцирует малый иммуногенный ответ или не индуцирует его при введении человеку (например, для лечения заболеваний). В указанном выше значении выражение "содержащий последовательность эмбрионального типа" в рамках настоящего изобретения означает, что часть каркасных последовательностей по настоящему изобретению идентична части каркасных последовательностей человека эмбрионального типа. В частности, каркасная последовательность по настоящему изобретению по меньшей мере на 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, 90% или более или 100% или более идентична последовательности эмбрионального типа. Например, когда последовательность FR2 тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению представляет собой комбинацию последовательностей FR2 тяжелой цепи отличающихся каркасных последовательностей человека эмбрионального типа, такая молекула также является антигенсвязывающей молекулой, "содержащей последовательность эмбрионального типа" в рамках настоящего изобретения. Даже когда каркасные последовательности антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению представляют собой последовательности с заменами, они являются "антигенсвязывающими молекулами, содержащими последовательность эмбрионального типа" по настоящему изобретению. Примеры таких последовательностей с заменами включают, в частности, последовательности, в которых аминокислоты части каркасных последовательностей человека эмбрионального типа заменены аминокислотами, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP.

Предпочтительные примеры каркасных областей включают, например, последовательности полностью человеческих каркасных областей человека, известные в настоящее время, которые включены в web-сайт V-Base (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) или другие. Эти последовательности каркасных областей можно соответствующим образом использовать в качестве последовательности эмбрионального типа, содержащейся в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению. Последовательности эмбрионального типа могут быть подразделены на категории в соответствии с их сходством (Tomlinson et al. (J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798); Williams and Winter (Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461); Cox et al. (Nat. Genetics (1994) 7, 162-168)). Соответствующие последовательности эмбрионального типа могут быть выбраны из VK, которые подразделяются на семь подгрупп; Vλ, которые подразделяются на десять подгрупп; и VH, которые подразделяются на семь подгрупп.

Полностью человеческие последовательности VH предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, например, последовательности VH:

подгруппы VH1 (например, VH1-2, VH1-3, VH1-8, VH1-18, VH1-24, VH1-45, VH1-46, VH1-58 и VH1-69);

подгруппы VH2 (например, VH2-5, VH2-26 и VH2-70);

подгруппы VH3 (VH3-7, VH3-9, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-72, VH3-73 и VH3-74);

подгруппы VH4 (VH4-4, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-59 и VH4-61);

подгруппы VH5 (VH5-51);

подгруппы VH6 (VH6-1); и

подгруппы VH7 (VH7-4 и VH7-81).

Они также описаны в известных документах (Matsuda et al. (J. Exp. Med. (1998) 188, 1973-1975)) и т.п., и, таким образом, специалисты в данной области могут соответствующим образом моделировать антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, исходя из информации об этих последовательностях. Также предпочтительно использовать другие полностью человеческие каркасные области или каркасные субобласти.

Полностью человеческие последовательности VK предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, например:

A20, A30, L1, L4, L5, L8, L9, L11, L12, L14, L15, L18, L19, L22, L23, L24, O2, O4, O8, O12, O14 и O18, выделенные в подгруппу Vk1;

A1, A2, A3, A5, A7, A17, A18, A19, A23, O1 и O11, выделенные в подгруппу Vk2;

A11, A27, L2, L6, L10, L16, L20 и L25, выделенные в подгруппу Vk3;

B3, выделенная в подгруппу Vk4;

B2 (также обозначаемая как Vk5-2), выделенная в подгруппу Vk5; и

A10, A14 и A26, выделенные в подгруппу VK6.

(Kawasaki et al. (Eur. J. Immunol. (2001) 31, 1017-1028); Schable and Zachau (Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993) 374, 1001-1022); Brensing-Kuppers et al. (Gene (1997) 191, 173-181)).

Полностью человеческие последовательности VL предпочтительно включают, но не ограничиваются ими, например:

V1-2, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-20 и V1-22, выделенные в подгруппу VL1;

V2-1, V2-6, V2-7, V2-8, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17 и V2-19, выделенные в подгруппу VL1;

V3-2, V3-3 и V3-4, выделенные в подгруппу VL3;

V4-1, V4-2, V4-3, V4-4 и V4-6, выделенные в подгруппу VL4; и

V5-1, V5-2, V5-4 и V5-6, выделенные в подгруппу VL5 (Kawasaki et al. (Genome Res. (1997) 7, 250-261)).

Обычно эти каркасные последовательности отличаются друг от друга одним или несколькими аминокислотными остатками. Эти каркасные последовательности можно использовать в комбинации с "по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP" по настоящему изобретению. Другие примеры полностью человеческих каркасных областей, используемых в комбинации с "по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP" по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, например, KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (например, Kabat et al. (1991), выше, Wu et al. (J. Exp. Med. (1970) 132, 211-250)).

Без связи с конкретной теорией, полагают, что одна из причин для того, чтобы ожидать, что использование последовательностей эмбрионального типа предотвратит неблагоприятные иммунные ответы у большинства индивидумов, состоит в следующем. В результате процесса созревания аффинности в

ходе нормальных иммунных ответов, часто в вариабельных областях иммуноглобулинов происходят соматические мутации. Такие мутации чаще всего происходят в области CDR, последовательности которых являются гипервариабельными, но также затрагивают остатки каркасных областей. Такие мутации каркасной области не существуют в генах эмбрионального типа, но также с меньшей вероятностью будут иммуногенными у пациентов. С другой стороны в нормальной человеческой популяции присутствует большинство каркасных последовательностей, экспрессируемых с генов эмбрионального типа. В результате иммунной толерантности ожидается, что эти каркасные области эмбрионального типа будут иметь низкую иммуногенность у пациентов или не иметь иммуногенности у пациентов. Для максимизации возможности иммунной толерантности можно выбирать гены, кодирующие вариабельную область, из группы часто встречающихся функциональных генов эмбрионального типа.

Для получения антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, в которых описанные выше последовательности вариабельной области, последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепей, последовательности CDR или каркасные последовательности содержат аминокислоты, которые изменяют антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, можно соответствующим образом использовать известные способы, такие как сайт-направленный мутагенез (Kunkel et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) и перекрывающаяся ПЦР.

Например, библиотеку, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, последовательности которых отличаются друг от друга, можно конструировать путем комбинирования вариабельных областей тяжелой цепи, полученных в качестве рандомизированной библиотеки последовательностей вариабельной области с вариабельной областью легкой цепи, выбранной в качестве последовательности CDR и/или каркасной последовательности, исходно содержащей по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP.

Альтернативно последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи, выбранную в качестве последовательности CDR и/или каркасной последовательности, исходно содержащей по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающего домена в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или ATP, как упоминалось выше, можно конструировать так, чтобы она содержала различные аминокислотные остатки, отличные от указанного выше аминокислотного остатка(ов). В рамках настоящего изобретения такие остатки обозначают как "нестрогие остатки". Количество и положение нестрогих остатков конкретно не ограничено при условии, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению варьируется в зависимости от концентрации специфического для ткани соединения. В частности, последовательности CDR и/или последовательности FR тяжелой цепи и/или легкой цепи могут содержать один или несколько нестрогих остатков. Можно идентифицировать нестрогие остатки и аминокислотные остатки, которые могут быть заменены, для получения библиотеки путем внесения мутаций или с помощью анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином и/или ATP. Например, из анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином и/или ATP, можно идентифицировать остатки в антителе, которые не вовлечены в связывание с аденозином и/или ATP. Можно выбирать аминокислоты, которые поддерживают связывание с соединениями на соответствующем уровне, даже когда остатки, которые идентифицированы, как не вовлеченные в связывание с аденозином и/или ATP, заменены на другие аминокислоты. Таким образом, можно сконструировать библиотеку, которая имеет выбранные аминокислоты для идентифицированных остатков. В этом случае можно конструировать библиотеку, в основном содержащую множество антигенсвязывающих молекул, чтобы она представляла собой ансамбль антигенсвязывающих молекул, в котором остатки, идентифицированные как не вовлеченные в связывание с аденозином и/или ATP, замещены аминокислотами, которые отличаются друг от друга. Следовательно, комбинация индивидуальных нестрогих остатков, замещенных аминокислотами, которые отличаются друг от друга, может обеспечить разнообразие последовательности в антигенсвязывающих молекулах, содержащих нестрогие остатки.

Антигенсвязывающие молекулы можно конструировать так, чтобы они включали остатки, где по меньшей мере один из остатков, идентифицированных как вовлеченные в связывание с аденозином и/или ATP, представлял собой любой остаток, выбранный из этого остатка и других остатков, которые отличаются от этого остатка. В неограничивающем варианте осуществления примеры аминокислот, идентифицированных как вовлеченные в связывание с аденозином и/или ATP, могут включать одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях 52, 52a, 53, 96, 100a и 100c в вариабельной области тяжелой цепи. В неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот включают одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот, включающих Ser в положении 52, Ser в положении 52a, Arg в положении 53, Gly в положении 96, Leu в положении 100a и Trp в положении 100c, содержащихся в вариабельной области тяжелой цепи. Например, когда Leu в положении 100a, упомянутом выше, идентифицирован как вовлеченный в связывание с аденозином и/или ATP, аминокислотный остаток в положении 100a в антигенсвязывающих молекулах, включенных в библиоте-

ку, может представлять собой любой аминокислотный остаток, выбранный из нестрогих остатков His, Met, Leu, Arg, Trp или Tyr, в дополнение к Leu.

В неограничивающем варианте осуществления примеры нестрогих остатков могут включать аминокислоты в положениях 31, 32, 33, 35, 50, 55, 56, 57, 58, 59, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a и 100b, содержащихся в вариабельной области тяжелой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот могут включать аминокислоты в положениях 2 6, 27, 27a, 27b, 27c, 28, 29, 31, 32, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95a, 96 и 97, содержащихся в вариабельной области легкой цепи.

В неограничивающем варианте осуществления примеры упомянутых выше нестрогих остатков могут включать следующие аминокислоты, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи:

Asp, Gly, Asn, Ser, Arg или Thr в качестве аминокислоты в положении 31;

Ala, Phe, His, Asn, Ser или Tyr в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Trp, Val, Tyr или Thr в качестве аминокислоты в положении 33;

His, Ser, Thr, Tyr или Asn в качестве аминокислоты в положении 35;

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr или Ser в качестве аминокислоты в положении 50;

Ala, Glu, Asp, Gly, Leu, Thr, Ser, Arg или Asn в качестве аминокислоты в положении 55;

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Thr, Trp, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 56;

Ala, Lys, Arg, Thr или Ile в качестве аминокислоты в положении 57;

Asp, Gly, Phe, His, Ser, Thr, Tyr или Asn в качестве аминокислоты в положении 58;

Leu или Tyr в качестве аминокислоты в положении 59;

Ala, Ile, Lys, Met, Leu, Arg, Trp, Val, Tyr или Phe в качестве аминокислоты в положении 95;

Ala, Asp, Asn или Ser в качестве аминокислоты в положении 96;

Ala, Asp, Gly, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Ser, Val, Tyr или Arg в качестве аминокислоты в положении 97;

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr или Lys в качестве аминокислоты в положении 98;

Ala, Glu, Asp, Phe, His, Lys, Asn, Gln, Ser, Arg, Trp, Val, Tyr или Gly в качестве аминокислоты в положении 99;

Ala, Glu, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr или Asp в качестве аминокислоты в положении 100;

Ala, Phe, Ile, His, Lys, Met, Arg, Trp, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 100a; или

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr или Asn в качестве аминокислоты в положении 100b.

В неограничивающем варианте осуществления примеры упомянутых выше нестрогих остатков могут включать следующие аминокислоты, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи:

Ala, Ser или Thr в качестве аминокислоты в положении 26;

Thr или Ser в качестве аминокислоты в положении 27;

Gly, Asn, Thr или Ser в качестве аминокислоты в положении 27a;

Asn или Asp в качестве аминокислоты в положении 27b;

Ile или Val в качестве аминокислоты в положении 27c;

Asp или Gly в качестве аминокислоты в положении 28;

Ala, Asp, Phe, Ser, Arg, Thr, Tyr или Gly в качестве аминокислоты в положении 29;

Glu, Asp, Lys или Asn в качестве аминокислоты в положении 31;

Ala, Asp, Ser, Thr или Tyr в качестве аминокислоты в положении 32;

Asp, Gly, Lys, Asn, Gln, Ser, Arg, Tyr или Glu в качестве аминокислоты в положении 50;

Asp, Gly, Lys, Asn, Thr или Val в качестве аминокислоты в положении 51;

Ala, Asp, Asn, Thr или Ser в качестве аминокислоты в положении 52;

Glu, Asp, His, Asn, Gln, Ser, Tyr или Lys в качестве аминокислоты в положении 53;

Lys или Arg в качестве аминокислоты в положении 54;

Leu или Pro в качестве аминокислоты в положении 55;

Ala, Gly, Phe, Leu, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr или Ser в качестве аминокислоты в положении 89;

Ala, Leu, Thr, Val или Ser в качестве аминокислоты в положении 90;

Ala, Asp, Phe, His, Lys, Asn, Ser, Arg, Thr, Trp, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 91;

Glu, Asp, Ser, Arg, Thr, Val, Tyr или Ala в качестве аминокислоты в положении 92;

Ala, Asp, Ile, Asn, Ser, Arg, Thr, Val, Tyr или Gly в качестве аминокислоты в положении 93;

Ala, Asp, Gly, Ile, Asn, Arg, Thr или Ser в качестве аминокислоты в положении 94;

Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr или Asn в качестве аминокислоты в положении 95;

Ala, Glu, Asp, Gly, Ile, His, Lys, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Tyr или Asn в качестве аминокислоты в положении 95a;

Ala, Asp, Gly, Phe, His, Lys, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 96; или

Ala, Gly, Ile, Met, Leu, Ser или Val в качестве аминокислоты в положении 97.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, можно идентифицировать нестрогие остатки и аминокислоты, которые могут быть заменены, для получения библиотеки посредством внесения мутаций и анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и кинуренином. Например, из анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и кинуренином, можно идентифицировать остатки антитела, которые не вовлечены в связывание кинуренина. Можно выбирать аминокислоты, которые могут сохранять соответствующий уровень связывания соединения, даже когда остатки, которые идентифицированы как не вовлеченные в связывание кинуренина, заменены этими аминокислотами. Таким образом, можно сконструировать библиотеку, чтобы она имела выбранные аминокислоты в идентифицированных остатках. В этом случае можно конструировать библиотеку, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, которые являются совокупностью антигенсвязывающих

молекул, в которых остатки, идентифицированные как не вовлеченные в связывание кинуренина, заменены аминокислотами, которые отличаются друг от друга. Таким образом, объединение каждого из гибких остатков, которые были заменены различающимися аминокислотами, может обеспечить разнообразие последовательности в антигенсвязывающих молекулах, содержащих нестрогие остатки.

Антигенсвязывающие молекулы можно конструировать так, чтобы они включали остатки, где по меньшей мере один из остатков, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание кинуренина, представлял собой любой остаток, выбранный из этого остатка, и остатков, отличающихся от этого остатка. В неограничивающем варианте осуществления аминокислот, идентифицированных как вовлеченные в связывание кинуренина, примеры аминокислотных остатков, боковые цепи которых вовлечены в связывание кинуренина, могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях P97, R100c и D101 (нумерация Kabat) в H-цепи и в положениях H49 и F55 (нумерация Kabat) в L-цепи. Примеры аминокислотных остатков, в значительной степени вовлеченных в связывание с кинуренином в части основной цепи, могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях R94, D95, R100c, G100d и A100e в H-цепи. Примеры остатков, важных для поддержания структуры CDR3 H-цепи в связанной с кинуренином конформации, как определяют с помощью рентгеновской кристаллографии, могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях P97, P100b и G100d в H-цепи.

В рамках настоящего изобретения неограничивающий вариант осуществления нестрогих остатков, когда низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, может включать, например, аминокислоты в положениях 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 50, 51, 52, 52a, 53, 54, 55, 56, 58, 73, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b, 100c, 100d, 100e, 100f и 102, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот могут включать аминокислоты в положениях 27d, 27e, 28, 29, 32, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 92, 93 и 94, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области тяжелой цепи, которая представляет собой любую из:

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 24;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 26;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 27;

Thr, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 28;

Phe, Ile, Leu, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 29;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 30;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 31;

Tyr, Phe или His в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Gly, Ile, Lys, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 33;

Gly, Ala, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 50;

Ile, Ala, Gly, Lys, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 51;

Ile, Ala, Glu, Phe, His, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 52;

Pro, Ala, Gly, Ser, Thr или Trp в качестве аминокислоты в положении 52a;

Ile, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 53;

Phe, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 54;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 55;

Thr, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 56;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 58;

Glu, Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 73;

Asp или Gly в качестве аминокислоты в положении 95;

Ala, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 96;

Pro, Ala, Asn или Ser в качестве аминокислоты в положении 97;

Val, Leu или Thr в качестве аминокислоты в положении 98;

Val, Ala, Asp, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или Tyr в качестве аминокислоты в положении 99;

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 100;

Arg, Ala, Asp, Glu, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr или Val в качестве аминокислоты в положении 100a;

Pro, Ala, Lys, Asn, Gln, Arg или Ser в качестве аминокислоты в положении 100b;

Arg, His, Lys или Gln в качестве аминокислоты в положении 100c;

Gly или Asn в качестве аминокислоты в положении 100d;

Ala, Gly или Ser в качестве аминокислоты в положении 100e;

Phe или Leu в качестве аминокислоты в положении 100f; или

Ile, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 102.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области легкой цепи, которая представляет собой любую из:

His, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 27d;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 27e;

Asp, Ala, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 28;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 29;

Tyr, Ala, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 32;

Leu, Ile, Met, Asn или Val в качестве аминокислоты в положении 46;

Tyr, Phe, His или Trp в качестве аминокислоты в положении 49;

Glu, Ala, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Gln, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 50;

Ile, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Leu, Met, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 51;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 52;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 53;

Arg, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 54;

Phe, Leu, Met, Arg или Tyr в качестве аминокислоты в положении 55;

Thr, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 92;

Gln, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 93; или

Phe, His, Ile, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 94.

В рамках настоящего изобретения, другой неограничивающий вариант осуществления нестрогих остатков, когда низкомолекулярным соединением является кинуренин, может включать, например, аминокислоты в положениях 28, 31, 33, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 96, 97, 99, 100, 100a, 100b и 100c, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот могут включать аминокислоты в положениях 27d, 27e, 28, 29, 32, 52, 53, 54, 56, 92 и 93, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда низкомолекулярное соединение представляет собой аденозин, можно идентифицировать нестрогие остатки и аминокислоты, которые могут быть заменены, для получения библиотеки посредством внесения мутаций и анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином. Например, из анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином, можно идентифицировать остатки антитела, которые не вовлечены в связывание аденозина. Можно выбирать аминокислоты, которые могут сохранять соответствующий уровень связывания соединения, даже когда остатки, которые идентифицированы как не вовлеченные в связывание аденозина, заменены этими аминокислотами. Таким образом, можно сконструировать библиотеку, чтобы она имела выбранные аминокислоты в идентифицированных остатках. В этом случае можно конструировать библиотеку, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, которые являются совокупностью антигенсвязывающих молекул,

в которых остатки, идентифицированные как не вовлеченные в связывание аденозина, заменены аминокислотами, которые отличаются друг от друга. Таким образом, объединение каждого из гибких остатков, которые были заменены различающимися аминокислотами, может обеспечить разнообразие последовательности в антигенсвязывающих молекулах, содержащих нестрогие остатки.

Антигенсвязывающие молекулы можно конструировать так, чтобы они включали остатки, где по меньшей мере один из остатков, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание аденозина, представлял собой любой остаток, выбранный из этого остатка и остатков, отличающихся от этого остатка. В неограничивающем варианте осуществления аминокислот, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание аденозина, примеры могут включать одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях A33, 150, G52, S56, T57, W58, G99, Y100 и T100a (нумерация Kabat) в H-цепи и в положениях Y95c и N96 (нумерация Kabat) в L-цепи.

В рамках настоящего изобретения неограничивающий вариант осуществления нестрогих остатков, когда низкомолекулярное соединение представляет собой аденозин, может включать, например, аминокислоты в положениях 31, 32, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 65, 96, 97, 98, 100, 100a, 101 и 102, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи. В другом неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот могут включать аминокислоты в положениях 28, 29, 32, 93, 94, 95, 95a, 95b и 95c, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области тяжелой цепи, которая представляет собой любую из:

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 31;

Tyr, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 53;

Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Gln, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 54;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Gln, Arg, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 55;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr или Val в качестве аминокислоты в положении 56;

Thr, Ala, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser или Val в качестве аминокислоты в положении 57;

Tyr, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 59;

Ser, Ala, Phe, His, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 61;

Trp, Ala, Asp, Glu, Phe или Gly в качестве аминокислоты в положении 62;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 65;

Arg, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Asn, Gln, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 96;

Phe, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 97;

Val, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser или Thr в качестве аминокислоты в положении 98;

Tyr или Phe в качестве аминокислоты в положении 100;

Thr, Ser или Val в качестве аминокислоты в положении 100a;

Asp, Ala, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 101; или

Pro, Asp или Asn в качестве аминокислоты в положении 102.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области легкой цепи, которая представляет собой любую из

Trp, Ala, Phe, His, Lys, Asn, Ser, Thr, Val, или Tyr в качестве аминокислоты в положении 28;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 29;

Tyr, Ala, Asp, Phe, Gly, или His в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, или Tyr в качестве аминокислоты в положении 93;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 94;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95a;

Trp, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95b; или

Tyr, Phe, His, Lys, Leu, Asn, или Val в качестве аминокислоты в положении 95c.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда низкомолекулярное соединение представляет собой аденозинмонофосфат, можно идентифицировать нестрогие остатки и аминокислоты, которые могут быть заменены, для получения библиотеки посредством внесения мутаций и анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином, который является аналогичным соединением. Например, остатки антитела, которые не вовлечены в связывание с аденозинмонофосфатом, можно моделировать с использованием анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозином. Можно выбирать аминокислоты, которые могут сохранять соответствующий уровень связывания соединения, даже когда остатки, которые идентифицированы как не вовлеченные в связывание аденозинмонофосфата, заменены этими аминокислотами. Таким образом, можно сконструировать библиотеку, чтобы она имела выбранные аминокислоты в идентифицированных остатках. В этом случае можно конструировать библиотеку, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, которые являются совокупностью антигенсвязывающих молекул, в которых остатки, идентифицированные как не вовлеченные в связывание аденозинмонофосфата, заменены аминокислотами, которые отличаются друг от друга. Таким образом, объединение каждого из нестрогих остатков, которые были заменены различающимися аминокислотами, может обеспечить разнообразие последовательности в антигенсвязывающих молекулах, содержащих нестрогие остатки.

Антигенсвязывающие молекулы можно конструировать так, чтобы они включали остатки, где по меньшей мере один из остатков, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание аденозинмонофосфата, представлял собой любой остаток, выбранный из этого остатка и остатков, отличающихся от этого остатка. В неограничивающем варианте осуществления аминокислот, идентифицированных как вовлеченные в связывание с рибозной частью и частью в виде аденинового кольца в аденозинмонофосфате, примеры могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях A33, 150, G52, S56, T57, W58, G99, Y100 и T100a (нумерация Kabat) в H-цепи и в положениях Y95c и N96 (нумерация Kabat) в L-цепи. В неограничивающем варианте осуществления примеры аминокислот, идентифицированных как вовлеченные в связывание с фосфатной частью аденозинмонофосфата, могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях D54, S55, S56, T57 и W58 в CDR2 H-цепи и в положениях G95a, W95b и Y95c (нумерация Kabat) в CDR3 L-цепи.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области тяжелой цепи, которая представляет собой любую из

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 31;

Tyr, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 53;

Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Gln, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 54;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Gln, Arg, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 55;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr или Val в качестве аминокислоты в положении 56;

Thr, Ala, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser или Val в качестве аминокислоты в положении 57;

Tyr, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 59;

Ser, Ala, Phe, His, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 61;

Trp, Ala, Asp, Glu, Phe или Gly в качестве аминокислоты в положении 62;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Thr, Val или Trp в качестве аминокислоты в положении 65;

Arg, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Asn, Gln, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 96;

Phe, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 97;

Val, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser или Thr в качестве аминокислоты в положении 98;

Tyr или Phe в качестве аминокислоты в положении 100;

Thr, Ser или Val в качестве аминокислоты в положении 100a;

Asp, Ala, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 101; или

Pro, Asp или Asn в качестве аминокислоты в положении 102.

Неограничивающим вариантом осуществления упомянутых выше нестрогих остатков является аминокислота, содержащаяся в вариабельной области легкой цепи, которая представляет собой любую из

Trp, Ala, Phe, His, Lys, Asn, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 28;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 29;

Tyr, Ala, Asp, Phe, Gly или His в качестве аминокислоты в положении 32;

Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 93;

Asn, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 94;

Ser, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95;

Gly, Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95a;

Trp, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val или Tyr в качестве аминокислоты в положении 95b; или

Tyr, Phe, His, Lys, Leu, Asn или Val в качестве аминокислоты в положении 95c.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда низкомолекулярное соединение представляет собой аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат, можно идентифицировать нестрогие остатки и аминокислоты, которые могут быть заменены, для получения библиотеки посредством анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозиндифосфатом или аденозинтрифосфатом, и внесения мутаций и моделирования на основе кристаллической структуры комплекса, образованного антителом и аденозином, который является аналогичным соединением. Например, остатки антитела, которые не вовлечены в связывание с аденозиндифосфатом или аденозинтрифосфатом, можно идентифицировать путем моделирования с использованием анализа кристаллической структуры комплексов, образованных антителом и аденозиндифосфатом или аденозинтрифосфатом. Можно выбирать аминокислоты, которые могут сохранять соответствующий уровень связывания соединения, даже когда остатки, которые идентифицированы как не вовлеченные в связывание аденозиндифосфата или аденозинтрифосфата, заменены этими аминокислотами. Таким образом, можно сконструировать библиотеку, чтобы она имела выбранные аминокислоты в идентифицированных остатках. В этом случае можно конструировать библиотеку, которая содержит в основном множество антигенсвязывающих молекул, которые являются совокупностью антигенсвязывающих молекул, в которых остатки, идентифицированные как не вовлеченные в связывание аденозиндифосфата или аденозинтрифосфата, заменены аминокислотами, которые отличаются друг от друга. Таким образом, объединение каждого из нестрогих остатков, которые были заменены различающимися аминокислотами, может обеспечить разнообразие последовательности в антигенсвязывающих молекулах, содержащих нестрогие остатки.

Антигенсвязывающие молекулы можно конструировать так, чтобы они включали остатки, где по меньшей мере один из остатков, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание аденозиндифосфата или аденозинтрифосфата, представлял собой любой остаток, выбранный из этого остатка и остатков, отличающихся от этого остатка. В неограничивающем варианте осуществления, аминокислоты, которые идентифицированы как вовлеченные в связывание с рибозной частью или частью, представляющей собой адениновое кольцо, в аденозиндифосфате или аденозинтрифосфате, являются сходными с такими аминокислотами аденозина, и примеры могут включать любые одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот в положениях A33, 150, G52, S56, T57, W58, G99, Y100 и T100a (нумерация Kabat) в H-цепи и в положениях Y95c и N96 (нумерация Kabat) в L-цепи. Для аминокислот, идентифицированных как вовлеченные в связывание с фосфатной частью аденозиндифосфата или аденозинтрифосфата, можно прогнозировать модификации, которые могут усилить связывание с аденозиндифосфатом или аденозинтрифосфатом, посредством исследований на основе кристаллических структур, сходных с исследованиями, описанными выше.

В рамках настоящего изобретения "нестрогие остатки" относится к варьированию аминокислотных остатков, присутствующему в гипервариабельных положениях аминокислот вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи, в которых существует несколько различных аминокислот, когда сравнивают аминокислотные последовательности известных и/или нативных антител или антигенсвязывающих доменов. Гипервариабельные положения, как правило, расположены в областях CDR. В одном варианте осуществления данные, предоставленные в Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National

Institute of Health Bethesda Md., 1987 and 1991), являются пригодными для определения гипервариабельных положений в известных и/или нативных антителах. Более того, в базах данных в Интернете (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/, и http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html) предоставлено множество собранных последовательностей легких цепей и тяжелых цепей человека и их положения. Информация об этих последовательностях и положениях является пригодной для определения гипервариабельных положений в рамках настоящего изобретения. В соответствии с настоящим изобретением, когда определенное аминокислотное положение имеет предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 20, предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 19, предпочтительно от приблизительно 4 до приблизительно 18, предпочтительно от 5 до 17, предпочтительно от б до 16, предпочтительно от 7 до 15, предпочтительно от 8 до 14, предпочтительно от 9 до 13, и предпочтительно от 10 до 12 возможных вариантов аминокислотных остатков, положение можно считать гипервариабельным. В некоторых вариантах осуществления определенное положение аминокислоты может иметь предпочтительно по меньшей мере приблизительно 2, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 4, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 6, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 8, предпочтительно приблизительно 10, и предпочтительно приблизительно 12 возможных вариантов аминокислотных остатков.

Библиотеку по настоящему изобретению, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, можно конструировать путем комбинирования вариабельных областей тяжелой цепи, продуцированных в качестве рандомизированной библиотеки последовательностей вариабельных областей с упомянутыми выше вариабельными областями легкой цепи, в которые внесен по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающих доменов в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярных соединений. Аналогично, библиотеку по настоящему изобретению, которая содержит множество антигенсвязывающих молекул, имеющих отличающиеся друг от друга последовательности, также можно получать путем комбинирования с вариабельными областями тяжелой цепи, в которые внесен по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающих доменов в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярных соединений, и которые имеют другие аминокислотные остатки, сконструированные в качестве нестрогих остатков.

Когда вариабельные области тяжелой цепи, продуцированные в качестве рандомизированной библиотеки вариабельных областей, и вариабельные области легкой цепи, в которые внесен по меньшей мере один аминокислотный остаток, который изменяет антигенсвязывающую активность антигенсвязывающей молекулы в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, комбинируют, как описано выше, последовательности вариабельных областей легкой цепи можно конструировать так, чтобы они содержали нестрогие остатки, аналогично тому, как описано выше.

Количество и положение таких нестрогих остатков конкретно не ограничивается конкретными вариантами осуществления при условии, что антигенсвязывающая активность антигенсвязывающий молекулы по настоящему изобретению варьируется в зависимости от присутствия или отсутствия аденозина и/или АТР. В частности, последовательности CDR и/или последовательности FR тяжелой цепи и/или легкой цепи могут содержать один или несколько нестрогих остатков.

Предпочтительные вариабельные области тяжелой цепи, подлежащие комбинированию, включают, например, рандомизированные библиотеки вариабельной области. Для получения рандомизированной библиотеки вариабельной области известные способы комбинируют соответствующим образом. В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения в качестве рандомизированной библиотеки вариабельной области предпочтительно можно использовать иммунную библиотеку, сконструированную на основе генов антител, происходящих из лимфоцитов животных, иммунизированных конкретным антигеном, пациентов с инфекциями, индивидумов с повышенным титром антител в крови в результате вакцинации, пациентов со злокачественной опухолью или пациентов с аутоиммунным заболеванием.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения, в качестве рандомизированной библиотеки вариабельной области также предпочтительно можно использовать синтетическую библиотеку, полученную путем замены последовательностей CDR V-генов в геномной ДНК или функциональных реконструированных V-генов набором синтетических олигонуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие наборы кодонов соответствующей длины. В этом случае, поскольку в последовательности CDR3 тяжелой цепи наблюдают разнообразие, также можно заменять только последовательность CDR3. Критерием возникновения разнообразия аминокислот в вариабельной области антигенсвязывающей молекулы является то, что разнообразие возникает в аминокислотных остатках в экспонированных на поверхности положениях антигенсвязывающей молекулы.

Экспонированное на поверхности положение относится к положению, которое считается способным экспонироваться на поверхности и/или контактировать с антигеном, исходя из структуры, группы структур и/или смоделированной структуры антигенсвязывающей молекулы. Как правило, такие положения представляют собой CDR.

Предпочтительно экспонированные на поверхности положения определяют с использованием координат из трехмерной модели антигенсвязывающей молекулы с использованием компьютерной программы, такой как программа InsightII (Accelrys).

Экспонированные на поверхности положения можно определять с использованием алгоритмов, известных в данной области (например, Lee and Richards (J. Mol. Biol. (1971) 55, 379-400); Connolly (J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558)). Определение экспонированных на поверхности положений можно проводить с использованием программного обеспечения, пригодного для моделирования белка, и информации о трехмерной структуре, полученной для антитела. Программное обеспечение, которое можно использовать для этих целей, предпочтительно включает программное обеспечение SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Главным образом или предпочтительно, когда алгоритм требует введения пользователем параметра размера, "размер" образца, который используют в вычислении, устанавливают как радиус, равный приблизительно 1,4 Ангстрем или менее. Более того, способы определения экспонированных на поверхности областей и участков с использованием программного обеспечения для персональных компьютеров описаны Pacios (Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386; J. Mol. Model. (1995) 1, 46-53).

Более того, в неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения аминокислоты вариабельной области, включающей область CDR и/или каркасную область, можно изменять соответствующим образом для повышения стабильности антитела. В неограничивающем варианте осуществления примеры таких аминокислот могут включать аминокислоты в положениях 1, 5, 10, 30, 48 и 58. Более конкретно, примеры могут включать Gln в положении 1, Gln в положении 5, Asp в положении 10, Asn в положении 30, Leu в положении 48, и Asn в положении 58. Для повышения стабильности антитела эти аминокислоты можно заменять соответствующими аминокислотами, содержащимися в последовательности эмбрионального типа. В неограничивающем варианте осуществления примером такой последовательности эмбрионального типа может быть последовательность VH3-21. В этом случае, Gln в положении 1 может быть заменен на Glu, Gln в положении 5 может быть заменен на Val, Asp в положении 10 может быть заменен на Gly, Asn в положении 30 может быть заменен на Ser, Leu в положении 48 может быть заменен на Val, и Asn в положении 58 может быть заменен на Tyr.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения наивную библиотеку, сконструированную из генов антител, происходящих из лимфоцитов здоровых индивидумов, и состоящую из наивных последовательностей, которые представляют собой последовательности антитела, которые не имеют смещенности в их репертуаре, можно особенно предпочтительно использовать в качестве рандомизированной библиотеки вариабельных областей (Gejima et al. (Human Antibodies (2002) 11, 121-129); Cardoso et al. (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344)). В настоящем описании "аминокислотная последовательность, содержащая наивную последовательность" относится к аминокислотной последовательности, полученной из такой наивной библиотеки.

Fc-область

Fc-область содержит аминокислотную последовательность, происходящую из константной области тяжелой цепи антитела. Fc-область представляет собой часть константной области тяжелой цепи антитела, которая включает N-конец шарнирной области, который представляет собой участок расщепления папаином в положении в области аминокислоты 216 (указанном с помощью нумерации EU), и шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. Fc-области также могут быть получены из IgG1 человека; однако они не ограничиваются каким-либо конкретным подклассом IgG. Предпочтительные примеры Fc-областей включают Fc-области, обладающие активностью связывания FcRn в диапазоне кислых значений pH, как описано ниже. Предпочтительные примеры Fc-областей включают Fc-области, обладающие активностью связывания Fcγ-рецептора, как описано ниже. В неограничивающем варианте осуществления примеры таких Fc-областей включают Fc-области IgG1 (SEQ ID NO: 5), IgG2 (SEQ ID NO: 6), IgG3 (SEQ ID NO: 7) или IgG4 (SEQ ID NO: 8) человека.

Fcγ-рецептор

Fcγ-рецептор (также называемый FcγR) относится к рецептору, способному связываться с Fc-областью моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и включает всех представителей, принадлежащих семейству белков, по существу кодируемых генами Fcγ-рецепторов. У человека это семейство включает FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотип H131 и R131, т.е., FcγRIIa(H) и FcγRIIa (R))), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2), и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16) включая изоформу FcγRIIIa (включая аллотип V158 и F158, т.е., FcγRIIIa(V) и FcγRIIIa (F))) и FcγRIIIb (включая аллотип FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2); а также неидентифицированные FcγR человека, изоформы FcγR и их аллотипы, однако семейство не ограничивается этими примерами. Не ограничиваясь этим, FcγR включает FcγR человека, мыши, крысы, кролика и обезьяны. FcγR может происходить из любого организма. FcγR мыши включает, но не ограничивается этими примерами, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (FcγRIV, CD16-2), а также неидентифицированные FcγR мыши, изоформы FcγR и их аллотипы. Предпочтительные примеры таких Fcγ-рецепторов включают, например, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16) и/или FcγRIIIb (CD16) человека. Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность

FcγRI человека представлены в SEQ ID NO: 9 (NM_00056.3) и 10 (NP 000557.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIa (аллотип H131) представлены в SEQ ID NO: 11 (BC020823.1) и 12 (AAH20823.1), соответственно (аллотип R131 представляет собой последовательность, в которой аминокислота в положении 166 SEQ ID NO: 12 заменена на Arg); полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγIIB представлены в SEQ ID NO: 13 (BC146678.1) и 14 (AAI46679.1), соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIa представлены в SEQ ID NO: 15 (BC033678.1) и 16 (AAH33678.1), соответственно; и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIb представлены в SEQ ID NO: 17 (BC128562.1) и 18 (AAI28563.1), соответственно (номер доступа RefSeq представлен в каждом случае в скобках). То, обладает ли Fcγ-рецептор активностью связывания с Fc-областью моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью скрининга ALPHA (анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции), способа BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и других способов (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010), в дополнение к описанным выше форматам FACS и ELISA.

В FcγRI (CD64), включая FcγRIa, FcγRIb, и FcγRIc, и FcγRIII (CD16), включающий изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2), α-цепь, которая связывается с Fc-областью IgG, ассоциирована с общей γ-цепью, имеющей ITAM, ответственный за передачу внутриклеточного активирующего сигнала. Между тем, цитоплазматический домен FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131) и FcγRIIc содержит ITAM. Эти рецепторы экспрессируются на многих иммунных клетках, таких как макрофаги, тучные клетки и антигенпредставляющие клетки. Активирующий сигнал, передаваемый при связывании этих рецепторов с Fc-частью IgG, приводит к усилению фагоцитарной активности макрофагов, продукции воспалительных цитокинов, дегрануляции тучных клеток и усилению функции антигенпредставляющих клеток. Fcγ-рецепторы, обладающие способностью передавать активирующий сигнал, как описано выше, также называют активирующими Fcу-рецепторами.

Между тем, внутрицитоплазматическии домен FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) содержит ITIM, ответственный за передачу ингибиторных сигналов. Связывание между FcγRIIb и B-клеточным рецептором (BCR) на B-клетках подавляет активирующий сигнал от BCR, что приводит к подавлению продукции антитела через BCR. Связывание FcγRIII и FcγRIIb на макрофагах подавляет фагоцитарную активность и продукцию воспалительных цитокинов. Fcγ-рецепторы, обладающие способностью передавать ингибирующий сигнал, как описано выше, также в настоящем описании называют ингибиторным Fcγ-рецептором.

Активность связывания Fc-области с FcγR

Как упоминалось выше, Fc-области, обладающие активностью связывания с Fcγ-рецептором, являются примерами Fc-областей, содержащихся в антигенсвязывающих молекулах по настоящему изобретению. Неограничивающий вариант осуществления такой Fc-области включает Fc-область IgG1 (SEQ ID NO: 5), IgG2 (SEQ ID NO: 6), IgG3 (SEQ ID NO: 7) или IgG4 (SEQ ID NO: 8) человека. Наличие у Fcγ-рецептора активности связывания с Fc-областью моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 можно оценивать с помощью скрининга ALPHA (анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции), способа BIACORE, который основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и т.п. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010), в дополнение к описанным выше форматам FACS и ELISA.

Скрининг ALPHA проводят с помощью технологии ALPHA на основе принципа, описанного ниже, где используется два типа гранул: донорные и акцепторные гранулы. Люминесцентный сигнал выявляется только когда молекулы, связанные с донорными гранулами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с акцепторными гранулами, и когда эти два типа гранул находятся вблизи друг друга. Возбуждаемый лазерным пучком фотосенсибилизатор в донорных гранулах преобразует кислород вокруг гранулы в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород распространяется среди донорных гранул и достигает акцепторных гранул, расположенных близко, в акцепторных гранулах индуцируется хемилюминесцентная реакция. Эта реакция в конечном итоге приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с донорными гранулами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с акцепторными гранулами, синглетный кислород, продуцируемый донорными гранулами, не достигает акцепторных гранул и хемилюминесцентная реакция не происходит.

Например, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc-область, иммобилизуют на донорных гранулах, и Fcγ-рецептор, меченный глутатион-S-трансферазой (GST), иммобилизуют на акцепторных гранулах. В отсутствие антигенсвязывающей молекулы, содержащей конкурирующий вариант Fc-области, Fcγ-рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой, содержащей нативную Fc-область, что приводит к индукции сигнала в области 520-620 нм. Антигенсвязывающая молекула, имеющая немеченый вариант Fc-области, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой, содержащей нативную Fc-область, для взаимодействия с Fcγ-рецептором. Относительную аффинность свя-

зывания можно определять путем количественного определения снижения флуоресценции в результате конкуренции. Способы биотинилирования антигенсвязывающих молекул, таких как антитела, с использованием сульфо-NHS-биотина и т.п., известны. Соответствующие способы добавления GST-метки к Fcγ-рецептору включают способы, которые вовлекают слияние полипептидов, кодирующих Fcγ и GST в рамке считывания, экспрессию слитого гена с использованием клеток, в которые введен вектор, с которым ген функционально связан, а затем очистку с использованием колонки с глутатионом. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, путем аппроксимации его к односторонней модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения, такого как GRAPHPAD PRISM (GraphPad, San Diego).

Одно из веществ при наблюдении их взаимодействия иммобилизуют в качестве лиганда на тонкую золотую пленку на сенсорном чипе. Когда свет падает на заднюю поверхность сенсорного чипа, так чтобы общее отражение происходило на поверхности контакта между тонкой золотой пленкой и стеклом, интенсивность отраженного света частично снижается в определенной области (сигнал SPR). Другое из веществ при выявлении взаимодействия инжектируют в качестве анализируемого соединения на поверхность сенсорного чипа. Когда анализируемое соединение связывается с лигандом, масса иммобилизованной молекулы лиганда возрастает. Это изменяет индекс рефракции растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменение индекса рефракции вызывает сдвиг положения сигнала SPR (с другой стороны, диссоциация вызывает сдвиг сигнала обратно в исходное положение). В системе Biacore величину сдвига, упомянутую выше (т.е. изменение массы на поверхности сенсорного чипа) наносят на график по вертикальной оси, и, таким образом, изменение массы с течением времени показывают в качестве данных измерения (сенсограмма). Параметры кинетики (константа скорости ассоциации (ka) и константу скорости диссоциации (kd)), определяют из кривых сенсограммы, и аффинность (KD) определяют из соотношения этих двух констант. В способе BIACORE, предпочтительно используют анализ ингибирования. Примеры такого анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci USA (2006) 103 (11): 4005-4010.

Fc-области с измененным связыванием Fcγ-рецептора (FcγR) В дополнение к Fc-области IgG1 (SEQ ID NO: 5), IgG2 (SEQ ID NO: 6), IgG3 (SEQ ID NO: 7) или IgG4 (SEQ ID NO: 8) человека, в качестве Fc-области в рамках настоящего изобретения можно соответственно использовать Fc-область с измененным связыванием FcγR, которая обладает более высокой активностью связывания Fcγ-рецептора, чем Fc-область нативного IgG человека. В рамках настоящего изобретения, "Fc-область нативного IgG человека" относится к Fc-области, в которой цепь сахара, связанная в положении 297 (нумерация EU) Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, представленных в качестве SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8, представляет собой содержащую фукозу цепь сахаров. Такие Fc-области с измененным связыванием FcγR можно получать путем изменения аминокислот Fc-области нативного IgG человека. То, является ли активность связывания с FcγR у Fc-области с измененным связыванием с FcγR более высокой, чем у Fc-области нативного IgG человека, можно определять соответствующим образом с использованием способов, описанных в упомянутом выше разделе об активности связывания.

В рамках настоящего изобретения "изменение аминокислот" или "аминокислотное изменение" Fc-области включает изменение аминокислотной последовательности, которое отличается от исходной Fc-области. Исходная Fc-область может представлять собой любую Fc-область при условии, что вариант, модифицированный из исходной Fc-области, может связываться с Fcγ-рецептором человека в диапазоне нейтральных значений pH. Более того, также предпочтительно в качестве Fc-области по настоящему изобретению можно использовать Fc-область, измененную от исходной Fc-области, которая уже была изменена. "Исходная Fc-область" может относиться к самому полипептиду, к композиции, содержащей исходную Fc-область, или к аминокислотной последовательности, кодирующей исходную Fc-область. Исходные Fc-области могут содержать известные Fc-области, полученные посредством рекомбинации, кратко описанные в разделе "Антитела". Источник исходных Fc-областей не ограничен, и они могут быть получены из человека или не являющихся человеком организмов. Такие организмы предпочтительно включают мышей, крыс, морских свинок, хомячков, песчанок, кошек, кроликов, собак, коз, овец, животных семейства бычьих, лошадей, верблюдов и организмы, выбранные из не являющихся человеком приматов. В другом варианте осуществления исходные Fc-области также можно получать из яванских макаков, мартышек, макаков-резус, шимпанзе или людей. Исходные Fc-области можно получать предпочтительно из IgG1 человека; однако они не ограничиваются каким-либо конкретным подклассом IgG. Это означает, что Fc-область, соответствующую IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, можно использовать соответствующим образом в качестве исходной Fc-области, и в рамках настоящего изобретения это также означает, что Fc-область произвольного класса или подкласса IgG, происходящую из любых организмов, описанных выше, предпочтительно можно использовать в качестве исходной Fc-области. Примеры встречающихся в природе вариантов IgG или измененных форм описаны в опубликованных документах (Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6): 685-91; Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470; Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4): 195-202; международные публикации № WO 2009/086320; WO 2008/092117; WO 2007/041635 и WO 2006/105338); однако они не ограничиваются примерами.

Примеры изменений включают изменения с одной или несколькими мутациями, например мута-

циями путем замены различными аминокислотными остатками аминокислот исходных Fc-областей, путем встраивания одного или нескольких аминокислотных остатков в исходные Fc-области, или путем делеции одной или нескольких аминокислот из исходной Fc-области. Предпочтительно, аминокислотные последовательности измененных Fc-областей содержат по меньшей мере часть аминокислотной последовательности ненативной Fc-области. Такие варианты обязательно обладают идентичностью или сходством последовательности менее 100% с их исходной Fc-областью. В предпочтительном варианте осуществления варианты обладают идентичностью или сходством аминокислотной последовательности от приблизительно 75 до менее чем 100%, более предпочтительно от приблизительно 80 до менее чем 100%, еще более предпочтительно от приблизительно 85 до менее чем 100%, еще более предпочтительно от приблизительно 90 до менее чем 100% и наиболее предпочтительно от приблизительно 95 до менее чем 100% с аминокислотной последовательностью их исходной Fc-области. В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна аминокислота отличается между измененной Fc-областью по настоящему изобретению и ее исходной Fc-областью. Аминокислотное отличие между измененной Fc-областью по настоящему изобретению и ее исходной Fc-областью также может быть предпочтительно установлено на основе аминокислотных отличий в описанных выше конкретных положениях аминокислот в соответствии с нумерацией EU. Примеры способов получения таких вариантов представлены в разделе "Изменение аминокислот".

Включенную в антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению Fc-область с измененным связыванием FcγR, которая обладает более высокой активностью связывания с Fcγ-рецептором, чем Fc-область нативного IgG человека (Fc-область с измененным связыванием с FcγR), можно получать любым способом. В частности, Fc-область с измененным связыванием FcγR можно получать путем изменения аминокислот иммуноглобулина человека IgG-типа, использованного в качестве исходной Fc-области. Предпочтительные Fc-области иммуноглобулинов IgG-типа для изменения включают, например Fc-области IgG человека, представленные в SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8 (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, соответственно, и их варианты).

Аминокислоты в любых положениях можно изменять на другие аминокислоты при условии, что активность связывания с Fcγ-рецептором является более высокой, чем у Fc-области нативного IgG человека. Когда антигенсвязывающая молекула содержит Fc-область IgG1 человека в качестве Fc-области человека, она предпочтительно содержит изменение, которое обеспечивает эффект более высокой активности связывания Fcγ-рецептора, чем у Fc-области нативного IgG человека, в которой цепь сахара, связанная в положении 297 (нумерация EU) представляет собой содержащую фукозу цепь сахара. Такие изменения аминокислот описаны, например, в международных публикациях, таких как WO 2007/024249, WO 2007/021841, WO 2006/031370, WO 2000/042072, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO 2006/105338, WO 2007/041635, WO 2008/092117, WO 2005/070963, WO 2006/020114, WO 2006/116260 и WO 2006/023403.

В качестве условий pH для измерения активности связывания связывающего Fcγ-рецептор домена и Fcγ-рецептора, содержащегося в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, можно соответственно использовать условия диапазона кислых значений pH или условия диапазона нейтральных значений pH. Диапазон кислых значений pH или диапазон нейтральных значений pH в качестве условий для измерения активности связывания связывающего Fcγ-рецептор домена и Fcγ-рецептора, содержащегося в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, как правило, указывается как от pH 5,8 до pH 8,0. Предпочтительно, он представляет собой диапазон, указываемый произвольными величинами pH от 6,0 до pH 7,4; и предпочтительно его выбирают из pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3 и pH 7,4; и особенно предпочтительно он представляет собой pH от 6, 15 до 7,4, что является близким к pH в злокачественных тканях (Vaupel et al., Cancer Res. (1989) 49, 6449-6665). Что касается температуры, используемой в качестве условий измерения, аффинность связывания между связывающим Fcγ-рецептор доменом и Fcγ-рецептором человека можно оценивать при любой температуре от 10 до 50°C. Предпочтительно для определения аффинности связывания между связывающим Fcγ-рецептор доменом человека и Fcγ-рецептором используют температуру от 15 до 40°C. Более предпочтительно, для определения аффинности связывания между связывающим Fcγ-рецептор доменом и Fcγ-рецептором можно сходным образом использовать любую температуру от 20 до 35°C, такую как любая из 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35°C. В одном варианте осуществления настоящего изобретения неограничивающим примером является температура 25°C.

В рамках настоящего изобретения "Fc-область с измененным связыванием FcγR имеет более высокую активность связывания Fcγ-рецептора, чем нативная Fc-область" означает, что активность связывания Fcγ-рецептора человека у Fc-области с измененным связыванием FcγR с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb является более высокой, чем активность связывания нативной Fc-области с этими Fcγ-рецепторами человека. Например, это означает, что, исходя из описанного выше аналитического способа, по сравнению с активностью связывания у антигенсвязы-

вающей молекулы, содержащей нативную Fc-область IgG человека в качестве контроля, активность связывания у антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-область с измененным связыванием FcγR, составляет 105% или более, предпочтительно 110% или более, 115% или более, 120% или более, 125% или более, особенно предпочтительно 130% или более, 135% или более, 140% или более, 145% или более, 150% или более, 155% или более, 160% или более, 165% или более, 170% или более, 175% или более, 180% или более, 185% или более, 190% или более, 195% или более или превышает в 2 раза или более, в 2,5 раза или более, в 3 раза или более, в 3,5 раза или более, в 4 раза или более, в 4,5 раза или более, в 5 раз или более, в 7,5 раз или более, в 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 40 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз или более, в 70 раз или более, в 80 раз или более, в 90 раз или более или в 100 раз или более. Исходную Fc-область можно использовать в качестве нативной Fc-области и также можно использовать нативные Fc-области антител того же подкласса.

В рамках настоящего изобретения Fc-область нативного IgG человека, в которой цепь сахаров, связанная с аминокислотой в положении 297 (нумерация EU), представляет собой содержащую фукозу цепь сахаров, пригодным образом используют в качестве нативной Fc-области IgG человека, подлежащей применению в качестве контроля. То, является ли цепь сахаров, связанная с аминокислотой в положении 297 (нумерация EU), содержащей фукозу цепью сахаров, можно определять с использованием известного способа (Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173). Например, с помощью такого способа, как указано ниже, возможно определить то, является ли цепь сахаров, связанная с нативной Fc-областью IgG человека, содержащей фукозу цепью сахаров. Посредством реакции N-гликозидазы F (Roche diagnostics) с нативным IgG человека, подлежащим исследованию, цепь сахаров диссоциирует от нативного IgG человека (Weitzhandler et al. (J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675)). Далее высушенный концентрат реакционного раствора, из которого были удалены белки посредством реакции с этанолом (Schenk et al. (J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695)), метят флуоресцентной меткой 2-аминопиридином или 2-аминобензамидом (Bigge et al. (Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)). Реагенты удаляют с помощью твердофазной экстракции с использованием кассеты с целлюлозой и флуоресцентно меченную модифицированную посредством 2-AP или 2-AB цепь сахаров анализируют с помощью нормально-фазовой хроматографии. Путем исследования выявленных пиков на хроматограмме можно определить, является ли цепь сахаров, связанная с нативной Fc-областью IgG человека, содержащей фукозу цепью сахаров.

В качестве антигенсвязывающей молекулы, содержащей нативную Fc-область антитела того же подкласса, которое используют в качестве контроля, можно соответственно использовать антигенсвязывающую молекулу, имеющую Fc-область моноклонального IgG-антитела. Структуры таких Fc-областей представлены в SEQ ID NO: 5 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAC82527.1), SEQ ID NO: 6 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59393.1), SEQ ID NO: 7 (номер доступа RefSeq CAA27268.1) и SEQ ID NO: 8 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59394.1). Более того, когда антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc-область конкретного изотипа антитела, используют в качестве исследуемого вещества, эффект антигенсвязывающей молекулы, содержащей исследуемую Fc-область, в отношении активности связывания Fcγ-рецептора, исследуют с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы, имеющей Fc-область моноклонального IgG-антитела этого конкретного изотипа. Таким путем пригодным образом выбирают антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-область, для которой продемонстрировано, что ее активность связывания Fcγ-рецептора является высокой.

Fc-области, обладающие активностью селективного связывания с Fcγ-рецептором

Примеры связывающих Fcγ-рецептор доменов, пригодных для применения в рамках настоящего изобретения, включают связывающие Fcγ-рецептор домены, обладающие более высокой активностью связывания с конкретным Fcγ-рецептором, чем с другими Fcγ-рецепторами (связывающие Fcγ-рецептор домены, обладающие активностью селективного связывания с Fcγ-рецептором). Когда антитело используют в качестве антигенсвязывающей молекулы (когда Fc-область используют в качестве связывающего Fcγ-рецептор домена), одна молекула антитела может связывать только одну молекулу Fcγ-рецептора. Таким образом, одна антигенсвязывающая молекула не может связываться с другими активирующими FcγR в связанном с ингибиторным Fcγ-рецептором состоянии и не может связываться с другими активирующими Fcγ-рецепторами или ингибиторными Fcγ-рецепторами в связанном с активирующим Fcγ-рецептором состоянии.

Fc-области с более высокой активностью связывания с активирующим Fcγ-рецептором, чем с ингибирующим Fcγ-рецептором

Как описано выше, предпочтительные активирующие Fcγ-рецепторы включают FcγRI (CD64), в том числе FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRIIa; и FcγRIII (CD16), в том числе FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NAl и FcγRIIIb-NA2). Между тем, предпочтительные примеры ингибиторных Fcγ-рецепторов включают FcγRIIb (в том числе FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2).

В рамках настоящего изобретения примером случая, где активность связывания с определенным

Fcγ-рецептором является более высокой, чем активность связывания с другим Fcγ-рецептором, является случай, где активность связывания с активирующим Fcγ-рецептором, является более высокой, чем активность связывания с ингибиторным Fcγ-рецептором. В этом случае активность связывания Fc-рецептора с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb считается более высокой, чем активность связывания с FcγRIIb. Например, это означает, что, исходя из описанного выше способа анализа, активность связывания антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-область, с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb, составляет 105% или более, предпочтительно 110% или более, 120% или более, 130% или более, 140% или более, особенно предпочтительно 150% или более, 160% или более, 170% или более, 180% или более, 190% или более, 200% или более, 250% или более, 300% или более, 350% или более, 400% или более, 450% или более, 500% или более, 750% или более по сравнению с активностью связывания с FcγRIIb или превышает ее в 10 раз или более, в 2 0 раз или более, в 30 раз или более, в 40 раз или более, в 50 раз или более, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз или в 100 раз. Fc-область с более высокой активностью связывания с активирующими Fcγ-рецепторами, чем с ингибиторными Fcγ-рецепторами, может быть подходящим образом включена в антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, антигенсвязывающий домен которых связывается с молекулой мембранного типа. Известно, что IgG1-антитела, содержащие такие Fc-области, усиливают активность ADCC, упомянутую ниже. Таким образом, антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-область, также пригодны в качестве антигенсвязывающих молекул, подлежащих включению в фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры Fc-области, обладающей более высокой активностью связывания с активирующими Fcγ-рецепторами, чем с ингибиторными Fcγ-рецепторами (или обладающей активностью селективного связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами) предпочтительно включают Fc-области, в которых по меньшей мере одна или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот в положениях 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 311, 313, 315, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 392, 396, 421, 427, 428, 429, 434, 436, и 440, указанных с помощью нумерации EU, упомянутой выше, изменены на аминокислоты, отличающиеся от аминокислот нативной Fc-области.

Fc-области, активность связывания которых с ингибиторным Fcγ-рецептором является более высокой, чем активность связывания с активирующим Fcγ-рецептором

В рамках настоящего изобретения, примером случая, когда активность связывания с определенным Fcγ-рецептором является более высокой, чем активность связывания с другим Fcγ-рецептором, является случай, когда активность связывания с ингибиторным Fcγ-рецептором является более высокой, чем активность связывания с активирующим Fcγ-рецептором. В этом случае активность связывания Fc-области с FcγRIIb считается более высокой, чем активность связывания с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb. Например, это означает, что, исходя из описанного выше способа анализа, активность связывания антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-область, с FcγRIIb составляет 105% или более, предпочтительно 110% или более, 120% или более, 130% или более, 140% или более, в частности предпочтительно 150% или более, 160% или более, 170% или более, 180% или более, 190% или более, 200% или более, 250% или более, 300% или более, 350% или более, 400% или более, 450% или более, 500% или более, 750% или более по сравнению с активностью связывания с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb, или превышает в 10 раз или более, в 2 0 раз или более, в 30 раз или более, в 40 раз или более, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз или в 100 раз или более. Fc-область с более высокой активностью связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами, чем с активирующими Fcγ-рецепторами, может быть подходящим образом включена в антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, антигенсвязывающий домен которых связывается с растворимой молекулой.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры Fc-области, обладающей более высокой активностью связывания с ингибирующими Fcγ-рецепторами, чем с активирующими Fcγ-рецепторами (или обладающей активностью селективного связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами) предпочтительно включают Fc-области, в которых из аминокислот указанной выше Fc-области аминокислоты в положениях 238 и 328, указанных с помощью нумерации EU, изменены на аминокислоты, отличающиеся от аминокислот нативной Fc-области.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры Fc-области, обладающей более высокой активностью связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами, чем с активирующими Fcγ-рецепторами (или обладающей активностью селективного связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами) предпочтительно включают Fc-области, измененные в любой одной или нескольких ами-

нокислотах в указанной выше Fc-области, как указано с помощью нумерации EU: аминокислота в положении 238 (указано с помощью нумерации EU) изменена на Asp; и аминокислота в положении 328 (указано с помощью нумерации EU) изменена на Glu. Более того, в качестве Fc-областей, обладающих активностью селективного связывания с ингибиторными Fcγ-рецепторами можно пригодным образом выбирать Fc-области или изменения, описанные в US 2009/0136485.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительные примеры включают Fc-области, измененные в любой или нескольких аминокислотах в указанной выше Fc-области, как указано с помощью нумерации EU: аминокислота в положении 238 (указано с помощью нумерации EU) изменена на Asp; и аминокислота в положении 328 (указано с помощью нумерации EU) изменена на Glu.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительные примеры включают Fc-области, которые имеют одно или несколько изменений, проиллюстрированных в PCT/JP 2012/054624: замена Pro в положении 238 (указано с помощью нумерации EU) на Asp; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Trp; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Phe; изменение аминокислоты в положении 267 (указано с помощью нумерации EU) на Val; изменение аминокислоты в положении 267 (указано с помощью нумерации EU) на Gln; изменение аминокислоты в положении 268 (указано с помощью нумерации EU) на Asn; изменение аминокислоты в положении 271 (указано с помощью нумерации EU) на Gly; изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Leu; изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Gln; изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Glu; изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Met; изменение аминокислоты в положении 239 (указано с помощью нумерации EU) на Asp; изменение аминокислоты в положении 267 (указано с помощью нумерации EU) на Ala; изменение аминокислоты в положении 234 (указано с помощью нумерации EU) на Trp; изменение аминокислоты в положении 234 (указано с помощью нумерации EU) на Tyr; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Ala; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Asp; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Glu; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Leu; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Met; изменение аминокислоты в положении 237 (указано с помощью нумерации EU) на Tyr; изменение аминокислоты в положении 330 (указано с помощью нумерации EU) на Lys; изменение аминокислоты в положении 330 (указано с помощью нумерации EU) на Arg, изменение аминокислоты в положении 233 (указано с помощью нумерации EU) на Asp, изменение аминокислоты в положении 268 (указано с помощью нумерации EU) на Asp, изменение аминокислоты в положении 268 (указано с помощью нумерации EU) на Glu, изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Asp, изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Ser, изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Thr, изменение аминокислоты в положении 323 (указано с помощью нумерации EU) на Ile, изменение аминокислоты в положении 323 (указано с помощью нумерации EU) на Leu, изменение аминокислоты в положении 323 (указано с помощью нумерации EU) на Met, изменение аминокислоты в положении 296 (указано с помощью нумерации EU) на Asp, изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Ala, изменение аминокислоты в положении 326 (указано с помощью нумерации EU) на Asn, и изменение аминокислоты в положении 330 (указано с помощью нумерации EU) на Met.

Fc-области с модифицированными цепями сахаров Fc-области, содержащиеся в антигенсвязывающих молекулах, предусматриваемых в рамках настоящего изобретения, могут включать Fc-области, которые модифицированы так, чтобы композиция Fc-областей с которыми связана цепь сахаров, имела более высокий процент Fc-областей, с которыми связана цепь сахаров с дефицитом фукозы, или более высокий процент Fc-областей, к которым добавлен биссекторный N-ацетилглюкозамин. Известно, что удаление остатка фукозы из N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце комплексных цепей сахаров с N-гликозидной связью, связанных с Fc-областью антитела, повышает аффинность в отношении FcγRIIIa (непатентный документ 6). Известно, что для IgG1-антител, содержащих такие Fc-области, активность ADCC, упомянутая ниже, усиливается; таким образом, антигенсвязывающие молекулы, содержащие такие Fc-области, также являются пригодными в качестве антигенсвязывающих молекул, предназначенных для содержания в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Примеры антител с удаленным остатком фукозы из N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце комплексных цепей сахаров с N-гликозидной связью, связанных с Fc-областями антител, представляют собой антитела, такие как антитела, модифицированные посредством гликозилирования (например, WO 1999/054342); и антитела, связанные с цепями сахаров с дефицитом фукозы (например, WO 2000/061739, WO 2002/031140 и WO 2006/067913).

Более конкретно, для получения антител, связанных с цепями сахаров с дефицитом фукозы (например, WO 2000/061739, WO 2002/031140 и WO 2006/067913) в качестве другого неограничивающего ва-

рианта осуществления антител с удаленным остатком фукозы из N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце комплексных цепей Сахаров с N-гликозидной связью, связанных с Fc-областями антител, получают клетки-хозяева, имеющие низкую способность присоединять фукозу к цепям Сахаров, путем изменения активности образования структуры цепи сахаров полипептида, подлежащего гликозилированию. Антитела, которые лишены фукозы на их цепях сахаров, можно собирать из культуры клеток-хозяев путем экспрессии желаемого гена антитела в клетках-хозяевах. Неограничивающие пригодные примеры активности в отношении образования структуры цепи сахаров в полипептиде включают активность переносчика или фермента, выбранного из группы, состоящей из фукозилтрансферазы (EC 2.4.1.152), переносчика фукозы (SLC35C1), GMD (GDP-манноза-4,6-дегидратаза) (EC 4.2.1.47), Fx (GDP-кето-6-дезоксиманноза-3,5-эпимераза, 4-редуктаза) (EC 1.1.1.271) и GFPP (GDP-β-L-фукозопирофосфорилаза (EC 2.7.7.30). При условии, что эти ферменты или переносчики могут проявлять их активность, их структуры не обязательно должны быть точно установленными. В рамках настоящего изобретения, белки, которые проявляют такую активность, обозначают как "функциональные белки". В неограничивающем варианте осуществления способы изменения этой активности включают удаление этой активности. Для получения клеток-хозяев с дефицитом этой активности, можно соответственно использовать известные способы, такие как способ разрушения генов этих функциональных белков, чтобы они стали неспособными функционировать (например, WO2 000/061739, WO 2002/031140 и WO 2006/067913). Клетки-хозяева с дефицитом такой активности можно получать, например, способом, который разрушает гены этих функциональных белков, эндогенных для клеток CHO, клеток BHK, клеток NS0, клеток SP2/0, клеток миеломы YO, клеток миеломы мыши P3X63, клеток PER, клеток PER.C6, клеток HEK293, клеток гибридомы и т.п., так чтобы гены были неспособны функционировать.

Известны антитела, которые имеют цепь сахаров, содержащую биссекторный GlcNAc (WO 2002/079255 и т.д.). В неограничивающем варианте осуществления получают клетки-хозяева, экспрессирующие ген, который кодирует функциональный белок, обладающий активностью GnTIII (β-1, 4-маннозилгликопротеин-4-β-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза) (EC 2.4.1.94) или активностью GalT (β-1, 4-галактозилтрансфераза) (EC 2.4.1.143), для получения антител, которые имеют биссекторные содержащие GlcNAc цепи сахаров. В другом подходящем неограничивающем варианте осуществления получают клетки-хозяева, которые экспрессируют, в дополнение к упомянутым выше функциональным белкам, ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью ManII человека (маннозидаза II) (3.2.1.114), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью GnTI (β-1,2-ацетилглюкозаминилтрансфераза I) (EC 2.4.1.94), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью GnTII (β-1,2-ацетилглюкозаминилтрансфераза II) (EC 2.4.1.143), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью ManI (манноидаза) (EC 3.2.1.113) и α-1, 6-фукозилтрансферазы (EC 2.4.1.68) (WO 2004/065540).

Антитела с удаленным остатком фукозы из N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце комплексных цепей сахаров с N-гликозидной связью, связанных с Fc-областями антитела, и антитела, обладающие цепями сахаров, содержащими биссекторный GlcNAc, можно получать, соответственно, путем трансфекции экспрессирующего вектора, содержащего ген антитела, в клетки-хозяева с низкой способностью присоединять фукозу к цепям сахаров, и в клетки-хозяева, обладающие активностью образования биссекторных содержащих структуру GlcNAc цепей сахаров. Способы получения этих антител можно применять в способах получения антигенсвязывающих молекул, содержащих измененные Fc-области, которые модифицированы так, чтобы композиция Fc-областей с присоединенной цепью сахаров по настоящему изобретению имела высокий процент Fc-областей с присоединенной цепью сахаров с дефицитом фукозы или высокий процент Fc-областей с присоединенным биссекторным N-ацетилглюкозамином. Композиция Fc-областей с присоединенными к ней цепями сахаров, содержащимися в антигенсвязывающих молекулах по настоящему изобретению, продуцированных такими способами получения, можно оценивать способом, описанным в разделе "Fc-области с измененным связыванием Fcγ-рецептора (FcγR)" выше.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультипаратопные антигенсвязывающие молекулы

Антигенсвязывающая молекула, содержащая по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, где по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов связывается с первым эпитопом в молекуле антигена и по меньшей мере один другой из антигенсвязывающих доменов связывается со вторым эпитопом в молекуле антигена, называют "мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой" с точки зрения ее реакционной специфичности. Когда два типа антигенсвязывающих доменов, содержащихся в одной антигенсвязывающей молекуле, допускают связывание с двумя различными эпитопами антигенсвязывающей молекулы, эту молекулу называют "биспецифической антигенсвязывающей молекулой". Когда три типа антигенсвязывающих доменов, содержащихся в одной антигенсвязывающей молекуле, допускают связывание с тремя различными эпитопами антигенсвязывающей молекулой, эту антигенсвязывающую молекулу называют "триспецифической антигенсвязывающей молекулой".

Паратоп в антигенсвязывающем домене, который связывается с первым эпитопом в молекуле анти-

гена и паратоп в антигенсвязывающем домене, который связывается со вторым эпитопом, который структурно отличается от первого эпитопа, имеют различные структуры. Таким образом, антигенсвязывающая молекула, содержащая по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, где по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов связывается с первым эпитопом в молекуле антигена и по меньшей мере один другой из антигенсвязывающих доменов связывается со вторым эпитопом в молекуле антигена, называют "мультипаратопной антигенсвязывающей молекулой" с точки зрения специфичности ее структуры. Когда два типа антигенсвязывающих доменов, содержащихся в одной антигенсвязывающей молекуле, допускает связывание с двумя различными эпитопами антигенсвязывающей молекулой, эту молекулу называют "бипаратопной антигенсвязывающей молекулой". Когда три типа антигенсвязывающих доменов, содержащихся в одной антигенсвязывающей молекуле, допускают связывание с тремя различными эпитопами антигенсвязывающей молекулой, эту молекулу называют "трипаратопной антигенсвязывающей молекулой".

Поливалентные мультиспецифические или мультипаратопные антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или несколько антигенсвязывающих доменов, и способы их получения описаны в непатентных документах, таких как Conrath et al. (J.Biol.Chem. (2001) 276 (10) 7346-7350), Muyldermans (Rev. Mol. Biotech. (2001) 74, 277-302), и Kontermann R.E. (2011) Bispecific Antibodies (Springer-Verlag) и в патентных документах, таких как WO 1996/034103 и WO 1999/023221. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению можно получать с использованием мультиспецифических или мультипаратопных антигенсвязывающих молекул и способов их получения, описанных в этих документах. Биспецифические антитела и способы их получения В одном варианте осуществления биспецифические антитела и способы их получения упомянуты ниже в качестве примеров упомянутых выше мультиспецифических или мультипаратопных антигенсвязывающих молекул и способов их получения. Биспецифические антитела представляют собой антитела, содержащие два типа вариабельных областей, которые специфически связываются с различными эпитопами. Биспецифические антитела IgG-типа можно секретировать из гибридной гибридомы (квадромы), полученной путем слияния двух типов гибридом, которые продуцируют IgG-антитела (Milstein et al., Nature (1983) 305, 537-540).

Когда биспецифическое антитело получают с использованием рекомбинантных способов, таких как способы, описанные в упомянутом выше разделе, касающемся антител, можно использовать способ, который вводит гены, кодирующие тяжелые цепи, содержащие два типа представляющих интерес вариабельных областей, в клетки для их коэкспрессии. Однако при рассмотрении только комбинации тяжелых цепей, такой способ будет обеспечивать смесь (i) комбинации пары тяжелых цепей, в которых одна из тяжелых цепей содержит вариабельную область, которая связывается с первым эпитопом, а другая тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая связывается со вторым эпитопом, (ii) комбинации пары тяжелых цепей, которые включают только тяжелые цепи, содержащие вариабельную область, которая связывается с первым эпитопом, и (iii) комбинации пары тяжелых цепей, которые включают только тяжелые цепи, содержащие вариабельную область, которая связывается со вторым эпитопом, которые присутствуют в молекулярном соотношении 2:1:1. Трудно очистить антигенсвязывающие молекулы, содержащие желаемую комбинацию тяжелых цепей, из смеси трех типов комбинаций тяжелых цепей.

При получении биспецифических антител с использованием таких рекомбинантных способов, биспецифические антитела, содержащие гетеромерную комбинацию тяжелых цепей, можно предпочтительно секретировать путем добавления соответствующих аминокислотных замен в CH3-домены, составляющие тяжелые цепи. В частности, этот способ проводят путем замены аминокислотой, имеющей более крупную боковую цепь (выступ (что означает "выпуклая часть")) аминокислоты в CH3-домене одной из тяжелых цепей, и замены аминокислотой, имеющей меньшую боковую цепь (углубление (что означает "полость")) аминокислоты в CH3-домене другой тяжелой цепи, так чтобы выступ размещался в полости. Это обеспечивает образование гетеромерной тяжелой цепи и одновременно ингибирует образование гомомерной тяжелой цепи (международная публикация № WO 1996027011; Ridgway et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621; Merchant et al., Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681).

Более того, также существуют известные способы получения биспецифического антитела с использованием способов контроля ассоциации полипептидов или ассоциации образованных полипептидом гетеромерных мультимеров для ассоциации между тяжелыми цепями. В частности, способы контроля образования тяжелых цепей можно использовать для получения биспецифического антитела (международная публикация № WO 2006/106905), в котором аминокислотные остатки, образующие поверхность контакта между тяжелыми цепями, изменяют для ингибирования ассоциации между тяжелыми цепями, имеющими ту же последовательность, и для обеспечения образования тяжелых цепей с различными последовательностями. Такие способы можно использовать для получения биспецифических антител.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения два полипептида, образующих Fc-область, происходящие из биспецифического антитела, описанного выше, можно соответствующим образом использовать в качестве Fc-области, содержащейся в антигенсвязывающей молекуле. Более конкретно, предпочтительно использовать два полипептида, образующих Fc-область, которые содержат Cys в качестве аминокислоты в положении 349 и Trp в качестве аминокислоты в положении 366 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов; и Cys в

качестве аминокислоты в положении 356, Ser в качестве аминокислоты в положении 366, Ala в качестве аминокислоты в положении 368, и Val в качестве аминокислоты в положении 407, как указано с помощью нумерации EU, в аминокислотной последовательности другого полипептида.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Asp в качестве аминокислоты в положении 409 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Lys в качестве аминокислоты в положении 399 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида, можно соответственно использовать в качестве Fc-области. В упомянутом выше варианте осуществления аминокислота в положении 409 может представлять собой Glu вместо Asp, и аминокислота в положении 399 может представлять собой Arg вместо Lys. Более того, в дополнение к аминокислоте Lys в положении 399, Asp можно соответственно добавлять в качестве аминокислоты в положении 360 или Asp можно соответственно добавлять в качестве аминокислоты в положении 392.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Glu в качестве аминокислоты в положении 370 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Lys в качестве аминокислоты в положении 357 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида, можно соответственно использовать в качестве Fc-области.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Lys в качестве аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида, можно соответственно использовать в качестве Fc-области.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения любой из указанных ниже вариантов осуществления для упомянутых выше комбинаций можно соответственно использовать в качестве Fc-области:

(i) два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Asp в качестве аминокислоты в положении 409 и Glu в качестве аминокислоты в положении 370 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Lys в качестве аминокислоты в положении 399 и Lys в качестве аминокислоты в положении 357 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида (в этом варианте осуществления аминокислота в положении 370 в соответствии с нумерацией EU может представлять собой Asp вместо Glu, и аминокислоту Asp в положении 392 можно использовать вместо аминокислоты Glu в положении 370 в соответствии с нумерацией EU);

(ii) два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Asp в качестве аминокислоты в положении 409 и Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов; и Lys в качестве аминокислоты в положении 399 и Lys в качестве аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида (в этом варианте осуществления аминокислоту Asp в положении 360, аминокислоту Asp в положении 392 или аминокислоту Asp в положении 439 можно использовать вместо аминокислоты Glu в положении 439 в соответствии с нумерацией EU);

(iii) два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Glu в качестве аминокислоты в положении 370, и Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Lys в качестве аминокислоты в положении 357, и Lys в качестве аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида; или два полипептида, которые составляют Fc-область и которые содержат Asp в качестве аминокислоты в положении 409, Glu в качестве аминокислоты в положении 370 и Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов; и Lys в качестве аминокислоты в положении 399, Lys в качестве аминокислоты в положении 357, и Lys в качестве аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида (в этом варианте осуществления аминокислота в положении 370 может не быть замещена на Glu, и более того, когда аминокислота в положении 370 не замещена на Glu, аминокислота в положении 439 может представлять собой Asp вместо Glu или аминокислоту Asp в положении 392 можно использовать вместо аминокислоты Glu в положении 439, в соответствии с нумерацией EU).

Кроме того, в другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения также может быть пригодным использование двух полипептидов, которые составляют Fc-область и которые содержат Lys в качестве аминокислоты в положении 356 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Arg в качестве аминокислоты в положении 435 и Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения также может быть

пригодным использование двух полипептидов, которые составляют Fc-область и которые содержат Lys в качестве аминокислоты в положении 356, и Lys в качестве аминокислоты в положении 357 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности одного из полипептидов, и Glu в качестве аминокислоты в положении 370, Arg в качестве аминокислоты в положении 435, и Glu в качестве аминокислоты в положении 439 в соответствии с нумерацией EU в аминокислотной последовательности другого полипептида.

Более того, в дополнение к упомянутому выше способу связывания гетерологичных тяжелых цепей, также для получения мультиспецифических или мультипаратопных антигенсвязывающих молекул, предусматриваемых в рамках настоящего изобретения, можно использовать технологию CrossMab, которая известна в качестве технологии связывания гетерологичных легких цепей, в которой легкую цепь, образующую вариабельную область, которая связывается с первым эпитопом, и легкую цепь, образующую вариабельную область, которая связывается со вторым эпитопом, соответственно связывают с тяжелой цепью, образующей вариабельную область, которая связывается с первым эпитопом, и тяжелой цепью, образующей вариабельную область, которая связывается со вторым эпитопом (Scaefer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011) 108, 11187-11192)). Более того, также для получения мультиспецифических или мультипаратопных антигенсвязывающих молекул, предусматриваемых в рамках настоящего изобретения, можно использовать обмен плечами Fab, который известен как технология для связывания гетерологичных тяжелых цепей, в которой тяжелую цепь, образующую вариабельную область, которая связывается с первым эпитопом, и тяжелую цепь, образующую вариабельную область, которая связывается со вторым эпитопом, с использованием этих гетерологичных тяжелых цепей IgG4 обменивают между собой (Labrijn et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013) 110, 5145-5150), WO2008119353).

Эффекторные клетки

В рамках настоящего изобретения термин "эффекторные клетки" можно использовать в наиболее широком значении, включающем Т-клетки ($CD4^+$ (хелперный лимфоцитарные) Т-клетки и/или $CD8^+$ (цитотоксические) Т-клетки, многоядерные лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилэозинофилы, базофилы, тучные клетки), моноциты, макрофаги, гистиоциты или лейкоциты, такие как натуральные киллерные клетки (NK-клетки), NK-подобные Т-клетки, клетки Купфера, клетки Лангерганса или активируемые лимфокинами киллерные клетки (LAK-клетки), В-лимфоциты или антигенпредставляющие клетки, такие как дендритные клетки или макрофаги. Предпочтительные примеры эффекторных клеток включают $CD8^+$ (цитотоксические) Т-клетки, NK-клетки или макрофаги. В качестве антигена, с которым связывается по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, содержащийся в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, можно использовать молекулы мембранного типа, экспрессируемые на клеточной мембране эффекторных клеток. Неограничивающие примеры предпочтительной молекулы мембранного типа могут представлять собой CD3, CD2, CD28, CD44, CD16, CD32, CD64 или NKG2D, активирующие NK-клетки лиганды или полипептиды, составляющие TCR.

Цитотоксические вещества

Чтобы антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению связывались со злокачественными клетками и проявляли цитотоксическую активность, цитотоксические вещества можно связывать с антигенсвязывающими молекулами. Цитотоксические вещества могут представлять собой химиотерапевтические средства, проиллюстрированные ниже, или соединения, описанные в Curr Opin Chem Biol (2010) 14, 529-37 и WO 2009/140242; и эти соединения связаны с антигенсвязывающими молекулами подходящими линкерами и т.п. Когда антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению используют в качестве фармацевтических композиций, эти цитотоксические вещества можно связывать с антигенсвязывающими молекулами перед введением, или их можно вводить до, после или одновременно с введением антигенсвязывающих молекул индивидумам (исследуемым индивидумам, пациентам и т.п.).

Описанные ниже модифицированные антигенсвязывающие молекулы, с которыми связаны цитотоксические вещества, такие как химиотерапевтические средства, токсические пептиды или радиоактивные химические вещества, также можно предпочтительно использовать в качестве антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, обладающих цитотоксической активностью. Такие модифицированные антигенсвязывающие молекулы (далее в настоящем описании обозначаемые как конъюгат антигенсвязывающая молекула-лекарственное средство) можно получать путем химической модификации полученных антигенсвязывающих молекул. В качестве способов модификации антигенсвязывающих молекул можно использовать соответственно способы, которые уже являются установившимися в области конъюгатов антитело-лекарственное средство и т.п. Более того, модифицированную антигенсвязывающую молекулу, с которой связан токсический пептид, можно получать путем экспрессии в соответствующих клетках-хозяевах слитого гена, полученного путем связывания гена, кодирующего токсический пептид, в рамке считывания с геном, кодирующим антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, а затем выделения его из клеточной культуры.

Примеры химиотерапевтических средств, связанных с антигенсвязывающим молекулами по настоящему изобретению, могут включать: азарибин, анастрозол, азацитидин, блеомицин, бортезомиб, бриостатин-1, бусульфан, камптотецин, 10-гидроксикамптотецин, кармустин, целебрекс, хлорамбуцил, цисплатин, иринотекан, карбоплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, доцетаксел,

актиномициндактиномицин, дауномицин глюкуронид, даунорубицин, дексаметазон, диэтилстилбестрол, доксорубицин, доксорубицин глюкуронид, эпирубицин, этинилэстрадиол, эстрамустин, этопозид, этопозид глюкуронид, флоксиуридин, флударабинфлударабин, флутамид, фторурацил, флуоксиместерон, гемцитабин, гидроксипрогестерон капроат, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, лейковорин, ломустин, майтанзиноид, мехорэтамин, медроксипрогестерона ацетат, магестрола ацетат, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, митрамицин, митомицин, митотан, фенилбутират, преднизон, прокарбазин, паклитаксел, пентостатин, семустин, стрептозоцин, тамоксифен, таксаны, таксол, тестостерона пропионат, талидомид, тиогуанин, тиотепа, тенипозид, топотекан, урацил мустард, винбластин, винорелбин и винкристин.

В рамках настоящего изобретения предпочтительные химиотерапевтические средства представляют собой низкомолекулярные химиотерапевтические средства.

Низкомолекулярные химиотерапевтические средства маловероятно будут препятствовать функции антигенсвязывающих молекул, даже после их связывания с антигенсвязывающими молекулами по настоящему изобретению. В рамках настоящего изобретения низкомолекулярные химиотерапевтические средства обычно имеют молекулярную массу от 100 до 2000, предпочтительно от 200 до 1000. Все химиотерапевтические средства, проиллюстрированные в настоящем описании, представляют собой низкомолекулярные химиотерапевтические средства. Химиотерапевтические средства по настоящему изобретению включают пролекарства, которые конвертируются в активные химиотерапевтические средства in vivo. Активация пролекарства может представлять собой ферментативное конвертирование или неферментативное конвертирование.

Более того, цитотоксические вещества, которые связаны с антигенсвязывающими молекулами по настоящему изобретению, включают, например, токсические пептиды (токсины), такие как экзотоксин A Pseudomonas, сапорин-s6, дифтерийный токсин, токсин книдарий; радиоактивный йод и фотосенсибилизаторы. Подходящие примеры токсических пептидов включают следующие:

А-цепь дифтерийного токсина (Langone *et al.* (Methods in Enzymology (1983) 93, 307-308));

Экзотоксин Pseudomonas (Nature Medicine (1996) 2, 350-353);

цепь рицина (А-цепь рицина) (Fulton *et al.* (J. Biol. Chem. (1986) 261, 5314-5319), Sivam *et al.* (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173), Cumber *et al.* (J. Immunol. Metehods (1990) 135, 15-24), Wawrzynczak *et al.* (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562), и Gheeite *et al.* (J. Immunol. Methods (1991) 142, 223-230));

Дегликозилированная А-цепь рицина (Thorpe *et al.* (Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931));

А-цепь абрина (Wawrzynczak *et al.* (Br. J. Cancer (1992) 66, 361-366), Wawrzynczak *et al.* (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562), Sivam *et al.* (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173) и Thorpe *et al.* (Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931));

Гелонин (Sivam *et al.* (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173), Cumber *et al.* (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24), Wawrzynczak *et al.* (Cancer Res., (1990) 50, 7519-7562) и Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

PAP-s; противовирусный белок из семян лаконоса (Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

бриодин (Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

сапорин (Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

момордин (Cumber *et al.* (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24); Wawrzynczak *et al.* (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562); и Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

моморкохин (Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

диантин 32 (Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

диантин 30 (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

модессин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

вискумин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

волкесин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

додекандрин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

тритин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8));

луффин (Stirpe F., Barbieri L. (FEBS letter (1986) 195, 1-8)); и

трихокирин (Casellas *et al.* (Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588), и Bolognesi *et al.* (Clin. exp. Immunol., (1992) 89, 341-346)).

Антигенсвязывающая молекула

В рамках настоящего изобретения, термин "антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого в присутствии низкомолекулярного соединения (специфического для ткани-мишени соединения) является более высокой, чем в отсутствие специфического для ткани-мишени соединения" используют в наиболее широком значении; и, в частности, он включает различные типы молекул при условии, что ни проявляют антигенсвязывающую активность. Молекулы, в которых антигенсвязывающий домен связан с Fc-областью, включают, например, антитела. Антитела могут включать единичные моноклональные антитела (включая антитела-агонисты и антитела-антагонисты), антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела и т.п.

Альтернативно при использовании в качестве фрагментов антител, они предпочтительно включают антигенсвязывающие домены и антигенсвязывающие фрагменты (например, Fab, $F(ab')_2$, scFv и Fv). Каркасные молекулы, где трехмерные структуры, такие как уже известная стабильная белковая структура α/β-бочонок, используются в качестве каркаса (основы) и только некоторые части структур преобразованы в библиотеки для конструирования антигенсвязывающих доменов, также включены в антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может содержать, по меньшей мере, некоторые части Fc-области, которые опосредуют связывание с Fcγ-рецептором и/или FcRn. В неограничивающем варианте осуществления антигенсвязывающая молекула включает, например, антитела и слитые белки Fc. Слитый белок относится к химерному полипептиду, содержащему полипептид, имеющий первую аминокислотную последовательность, который связан с полипептидом, имеющим вторую аминокислотную последовательность, которые не связаны в природе. Например, слитый белок может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере части Fc-области (например, часть Fc-области, ответственная за связывание с Fcγ-рецептором или часть Fc-области, ответственная за связывание с FcRn). Аминокислотные последовательности могут находиться в отдельных белках, которые переносят вместе в слитый белок, или, как правило, они могут находиться в одном белке; однако они включены в слитый полипептид в новом порядке. Слитые белки можно получать, например, посредством химического синтеза или способами генетической рекомбинации для экспрессии полинуклеотида, кодирующего области пептидов в желаемом порядке.

Соответствующие домены по настоящему изобретению могут быть связаны через линкеры или прямо через полипептидную связь. Линкеры включают произвольные пептидные линкеры, которые можно вносить способами генетической инженерии, синтетические линкеры и линкеры, описанные, например, в Holliger et al., Protein Engineering (1996) 9(3), 299-305. Однако пептидные линкеры являются предпочтительными в рамках настоящего изобретения. Длина пептидных линкеров конкретно не ограничена, и ее могут надлежащим образом выбирать специалисты в данной области в зависимости от назначения. Длина предпочтительно составляет пять аминокислот или более (без конкретных ограничений, верхний предел обычно составляет 30 аминокислоты или менее, предпочтительно 20 аминокислоты или менее) и особенно предпочтительно 15 аминокислот.

Например, такие пептидные линкеры предпочтительно включают

Ser
Gly·Ser
Gly·Gly·Ser
Ser·Gly·Gly
Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 19)
Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 20)
Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 21)
Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 22)
Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 23)
Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 24)
Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 25)
Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 26)
(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 21))n
(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 22))n

где n представляет собой целое число, равное 1 или более.

Длину или последовательности пептидных линкеров могут соответствующим образом выбирать специалисты в данной области, в зависимости от назначения.

Обычно для сшивания пептидов используют синтетические линкеры (химические сшивающие агенты) и, например, N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS^3), дитиобис(сукцинимидил пропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), этиленгликоль бис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS), дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST), бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) и бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES). Эти сшивающие агенты являются коммерчески доступными.

Когда используют множество линкеров для связывания соответствующих доменов, все они могут быть одного типа или они могут быть различных типов. В дополнение к линкерам, проиллюстрированным выше, также можно соответствующим образом использовать линкеры с пептидными метками, такими как His-метка, HA-метка, myc-метка и FLAG-метка. Более того, также можно соответствующим образом использовать образование водородных связей, образование дисульфидных связей, образование ковалентных связей, ионное взаимодействие и свойства связывания друг с другом в результате их комбинации. Например, можно использовать аффинность между CH1 и CL антитела и также можно использовать Fc-области, происходящие из описанных выше биспецифических антител для гетероассоциации Fc-областей. Более того, также можно соответствующим образом использовать дисульфидные связи, образующиеся между доменами.

Для связывания соответствующих доменов пептидной связью, полинуклеотиды, кодирующие домены, связывают вместе в рамке считывания. Известные способы связывания полинуклеотидов в рамке считывания включают способы, такие как лигирование фрагментов рестрикции, ПЦР со слиянием и перекрывающаяся ПЦР. Такие способы можно соответствующим образом использовать отдельно или в комбинации для получения антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. В рамках настоящего изобретения термины "связанный" и "слитый", или "связывание" и "слияние" используют взаимозаменяемо. Эти термины означают, что два или более элементов или компонентов, таких как полипептиды, слиты вместе с образованием единой структуры любыми способами, включая описанные выше способы химического связывания и способы генетической рекомбинации. Когда два или более доменов, элементов или компонентов представляют собой полипептиды, связывание в рамке считывания означает связывание двух или более элементов рамок считывания с образованием более длинной непрерывной рамки считывания при сохранении правильных рамок считывания полипептидов. Когда две молекулы Fab используют в качестве антигенсвязывающего домена, в качестве предпочтительной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению можно использовать антитело, которое представляет собой антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, в которой антигенсвязывающий домен связан в рамке считывания с константной областью, включающей Fc-область, через пептидную связь, но не через линкер.

Низкомолекулярное антитело

Антитела, используемые в рамках настоящего изобретения, не ограничиваются полноразмерными молекулами антител, и они могут представлять собой низкомолекулярные антитела (миниантитела) и их модифицированные продукты. Низкомолекулярное антитело включает фрагмент антитела, который лишен части полноразмерного антитела (например, целое антитело, такое как целый IgG); и оно конкретно не ограничено при условии, что оно обладает антигенсвязывающей активностью. Низкомолекулярное антитело по настоящему изобретению конкретно не ограничено при условии, что оно является частью полноразмерного антитела, но предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и/или вариабельную область легкой цепи (VL). Аминокислотная последовательность VH или VL может

иметь замену(ы), делецию(и), вставку(и) и/или инсерцию(и). Более того, при условии наличия антигенсвязывающей активности, VH и/или VL могут быть частично удалены. Вариабельная область может быть химеризованной или гуманизированной. Конкретные примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv. Конкретные примеры низкомолекулярных антител включают Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), диантитело и $sc(Fv)_2$ (одноцепочечный $(Fv)_2$). Мультимеры этих антител (например, димеры, тримеры, тетрамеры и полимеры) также включены в низкомолекулярные антитела по настоящему изобретению.

Фрагменты антител можно получать путем обработки антитела ферментом, таким как папаин и пепсин. Альтернативно гены, кодирующие эти фрагменты антител, можно конструировать, встраивать в экспрессирующие векторы, а затем экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах (см., например, Co et al., (J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976); Better and Horwitz (Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496), Plueckthun and Skerra (Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496); Lamoyi (Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663); Rousseaux (Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669) и Bird et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

Диантитело относится к двухвалентному низкомолекулярному антителу, сконструированному посредством слияния генов (Hollinger et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993)); EP 404097; WO 1993/11161 и т.п.). Диантитело представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей. Как правило, в каждой полипептидной цепи, составляющей димер, VL и VH связаны с помощью линкера в одной и той же цепи. Линкер в диантителе, как правило, является достаточно коротким, чтобы предотвратить связывание между VL и VH. В частности, аминокислотные остатки, составляющие линкер, представляют собой, например, приблизительно пять остатков. Линкер между VL и VH, которые кодируются одной и той же полипептидной цепью, является лишком коротким, чтобы образовать одноцепочечный фрагмент вариабельной области, и между полипептидными цепями образуется димер. В результате диантитела имеют два антигенсвязывающих центра.

scFv можно получать путем связывания V-области H-цепи и V-области L-цепи антитела. В scFv V-область H-цепи и V-область L-цепи лигированы через линкер, предпочтительно пептидный линкер (Huston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). V-область H-цепи и V-область L-цепи scFv могут происходить из любого из антител, описанных в настоящем описании. Пептидный линкер для лигирования V-областей конкретно не ограничен; и, например, в качестве линкера можно использовать любой одноцепочечный пептид, состоящий из 3-25 остатков и т.п., или пептидные линкеры, описанные ниже и т.п. Для лигирования V-областей можно использовать способы ПЦР, такие как способы, описанные выше. ДНК, кодирующую scFv, можно амплифицировать способом ПЦР с использованием в качестве матрицы либо целой ДНК, либо частичной ДНК, кодирующей желаемую аминокислотную последовательность, которая выбрана из последовательности ДНК, кодирующей H-цепь или V-область H-цепи упомянутого выше антитела, и ДНК, кодирующей L-цепь или V-область L-цепи упомянутого выше антитела; и с использованием пары праймеров, имеющих последовательности, соответствующие последовательностям двух концов. Далее ДНК, имеющую желаемую последовательность, можно получать путем проведения реакции ПЦР с использованием комбинации ДНК, кодирующей часть, представляющую собой пептидный линкер, и пары праймеров, имеющих последовательности, сконструированные так, чтобы оба конца ДНК лигировались с H-цепью и L-цепью, соответственно. После конструирования кодирующей scFv ДНК можно получать экспрессирующие векторы, имеющие ДНК, и рекомбинантные клетки, трансформированные экспрессирующим вектором, в соответствии с общепринятыми способами. Более того, scFv можно получать путем культивирования полученных рекомбинантных клеток для экспрессии ДНК, кодирующей scFv.

$sc(Fv)_2$ представляет собой низкомолекулярное антитело, полученное путем связывания двух VH и двух VL с линкерами и т.п. с получением единой цепи (Hudson et al. (J. Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)). sc(Fv)2 можно получать, например, путем связывания scFv с помощью линкера.

Более того, являются предпочтительными антитела, в которых два VH и два VL расположены в порядке VH, VL, VH и VL, начиная с N-конца одноцепочечного полипептида ([VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]). Порядок двух VH и двух VL конкретно не ограничивается указанным выше расположением, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры включают следующие расположения:

- [VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]
- [VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]
- [VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]
- [VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]
- [VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]

Линкер, сходный с линкером, описанным в разделе "антигенсвязывающие молекулы", выше, можно использовать в качестве линкера для связывания вариабельных областей антитела.

Особенно предпочтительный вариант осуществления sc(Fv)2 в рамках настоящего изобретения включает, например, следующие sc(Fv)2:

[VH]-пептидный линкер (15 аминокислот)-[VL]-пептидный линкер (15 аминокислот)-[VH]-пептидный линкер (15 аминокислот)-[VL]

Как правило, для связывания четырех вариабельных областей антитела требуется три линкера. Используемые линкеры могут быть одного типа или различных типов. Примеры неограничивающего варианта осуществления низкомолекулярного антитела в рамках настоящего изобретения включают диантитело или sc(Fv)2, где паратопы отличаются друг от друга; один из паратопов связывается с эпитопом в молекуле мембранного типа, которая связывается с мембраной злокачественных клеток, клеток, инфильтрировавших воспаленные ткани, и т.п.; и другой паратоп связывается с эпитопом в молекуле мембранного типа, экспрессируемой на мембране эффекторных клеток. В упомянутом выше диантителе или sc(Fv)2 активность связывания паратопов в отношении эпитопа в молекуле мембранного типа, которая связывается с мембраной злокачественных клеток, клеток, инфильтрировавших воспаленные ткани, и т.п., может зависеть от низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения или неприродного соединения) причем активность связывания одного из паратопов с эпитопом в молекуле мембранного типа, которая связывается с мембраной эффекторной клетки, может зависеть от низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения или неприродного соединения), или активность связывания обоих паратопов может зависеть от низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения или неприродного соединения).

Неограничивающий вариант осуществления низкомолекулярного антитела в рамках настоящего изобретения включает, например, диантитело или sc(Fv)2, где паратопы отличаются друг от друга; один из паратопов связывается с эпитопом в молекуле мембранного типа, которая связывается с мембраной злокачественных клеток, клеток, инфильтрировавших воспаленные ткани и т.п.; и другой паратоп связывается с эпитопом в цитотоксическом веществе. В диантителе или sc(Fv)2, упомянутых выше, активность связывания одного из паратопов, который связывается с эпитопом в молекуле мембранного типа, которая связывается с мембраной злокачественных клеток, клеток, инфильтрировавших воспаленные ткани, и т.п., может зависеть от низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения или неприродного соединения), активность связывания другого паратопа, который связывается с эпитопом в цитотоксическом веществе, может зависеть от низкомолекулярного соединения (например, специфического для злокачественной ткани соединения, специфического для воспаленной ткани соединения или неприродного соединения), или активность связывания обоих паратопов может зависеть от специфического для злокачественной ткани соединения.

Такое низкомолекулярное антитело можно получать путем обработки антитела ферментом, таким как папаин или пепсин, для получения фрагментов антител, или путем конструирования ДНК, которые кодируют эти фрагменты антител или низкомолекулярные антитела, встраивания их в экспрессирующие векторы, а затем экспрессии их в соответствующих клетках-хозяевах (см., например, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better M. and Horwitz A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun A. and Skerra A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 и Bird R. E. and Walker B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

FcRn

В отличие от Fcγ-рецептора, принадлежащего семейству иммуноглобулинов, FcRn, в частности, FcRn человека, структурно сходен с полипептидами главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I, проявляя 22-29% идентичность последовательности с молекулами MHC класса I (Ghetie el al., Immunol. Today (1997) 18 (12): 592-598). FcRn экспрессируется в качестве гетеродимера, состоящего из растворимой β- или легкой цепи (β32-микроглобулин) в комплексе с трансмембранной а- или тяжелой цепью. Подобно MHC, α-цепь FcRn содержит три внеклеточных домена (αl, α2 и α3) и ее короткий цитоплазматически домен заякоривает белок на клеточной поверхности, αl- и α2-домены взаимодействуют с FcRn-связывающим доменом Fc-области антитела (Raghavan et al., Immunity (1994) 1: 303-315).

FcRn экспрессируется в материнской плаценте и желточном мешке млекопитающих, и он вовлечен в перенос IgG от матери к плоду. Кроме того, в тонком кишечнике новорожденных грызунов, где FcRn экспрессируется, FcRn вовлечен в перенос материнских IgG через эпителий щеточной каемки из проглоченного молозива или молока. FcRn экспрессируется во множестве других тканей и системах эндотелиальных клеток различных видов. FcRn также экспрессируется у взрослого человека в эндотелии, кровеносных сосудах мышц и синусоидных капиллярах печени. Полагают, что FcRn участвует в поддержании концентрации IgG в плазме путем опосредования рециклирования IgG в сыворотку при связывании с IgG. Как правило, связывание FcRn с молекулами IgG строго зависит от pH. Оптимальное связывание наблюдают при кислом диапазоне pH ниже 7,0.

FcRn человека, предшественником которого является полипептид, имеющий сигнальную последовательность SEQ ID NO: 28 (полипептид с сигнальной последовательностью представлен в SEQ ID NO:

29), образует комплекс с β2-микроглобулином человека in vivo. Растворимый FcRn человека в комплексе с β2-микроглобулином получают с использованием общепринятых способов рекомбинантной экспрессии. Fc-области по настоящему изобретению можно оценивать в отношении их активности связывания с таким растворимым FcRn человека в комплексе с β2-микроглобулином. В рамках настоящего изобретения, если нет иных указаний, FcRn человека относится к форме, способной связываться с Fc-областью по настоящему изобретению. Примеры включают комплекс между FcRn человека и β2-микроглобулином человека.

Варианты осуществления комбинирования настоящего изобретения со способами модификации константной области представляют собой, например, комбинации со способами модификации антител, такими как способы модификации Fc для усиления связывания FcRn при кислых значениях pH (WO 2002060919, WO 2004035752 и WO 000042072), способы модификации Fc для усиления связывания FcRn при нейтральных значениях pH (WO 2011122011 и WO 2012133782), способы усиления селективного связывания ингибиторного Fcγ-рецептора (WO 2012115241 и WO 2013125667), способы усиления активации селективного связывания Fcγ-рецептора (способы повышения активности ADCC) (WO 2013002362), и способы снижения активности связывания с ревматоидным фактором (WO 2013046704).

Неограничивающий вариант осуществления комбинирования настоящего изобретения со способами модификации вариабельной области включает, например, комбинации со способами модификации pH-зависимых антител (WO2009125825), кальцийзависимых антител (WO 2012073992) и т.п.

Гетерокомплекс, содержащий четыре молекулы, включая две молекулы FcRn и одну молекулу активирующего Fcγ-рецептора

Кристаллографические исследования FcRn с IgG-антителами продемонстрировали, что комплекс FcRn-IgG состоит из одной молекулы IgG на две молекулы FcRn, и полагают, что эти две молекулы связываются в области поверхности контакта доменов CH2 и CH3, расположенных по обеим сторонам Fc-области IgG (Burmeister et al. (Nature (1994) 372, 336-343)). Между тем, как продемонстрировано в примере 3 PCT/JP 2012/058603, было показано, что Fc-область антитела способна образовывать комплекс, содержащий четыре молекулы, включая две молекулы FcRn и одну молекулу активирующего рецептора Fcγ (PCT/JP 2012/058603). Это образование гетерокомплекса представляет собой явление, которое было выявлено в результате анализа свойств антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-область, обладающую активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH.

Хотя настоящее изобретение не ограничивается конкретным принципом, можно считать, что антигенсвязывающие молекулы, введенные in vivo, оказывают описанные ниже эффекты на фармакокинетику in vivo (удержание в плазме) антигенсвязывающих молекул и иммунный ответ (иммуногенность) на введенные антигенсвязывающие молекулы в результате образования гетерокомплексов, содержащих четыре молекулы, включающих Fc-область, содержащуюся в антигенсвязывающих молекулах, две молекулы FcRn и одну молекулу активирующего Fcγ-рецептора. В дополнение к различным типам активирующих Fcγ-рецепторов на иммунных клетках экспрессируется FcRn. Полагают, что образование таких тетрамерных комплексов на иммунных клетках антигенсвязывающими молекулами ускоряет включение антигенсвязывающих молекул в иммунные клетки путем увеличения аффинности в отношении иммунных клеток и путем обеспечения ассоциации внутриклеточных доменов для усиления сигнала интернализации. Указанное выше также применимо для антигенпредставляющих клеток и вероятности того, что антигенсвязывающие молекулы, возможно, включаются в антигенпредставляющие клетки путем образования тетрамерных комплексов на клеточной мембране антигенпредставляющих клеток. Как правило, антигенсвязывающие молекулы, включенные в антигенпредставляющие клетки, деградируют в лизосомах антигенпредставляющих клеток и представляются Т-клеткам. В результате время удержания в плазме антигенсвязывающих молекул может снижаться, поскольку включение антигенсвязывающих молекул в антигенпредставляющие клетки ускоряется посредством образования описанных выше тетрамерных комплексов на клеточной мембране антигенпредставляющих клеток. Аналогично, может индуцироваться (усиливаться) иммунный ответ.

По этой причине понятно, что, когда антигенсвязывающую молекулу, обладающую сниженной способностью образовывать такие тетрамерные комплексы, вводят in vivo, время удержания антигенсвязывающих молекул в плазме может увеличиваться, и индукция иммунного ответа in vivo будет подавляться. Предпочтительные варианты осуществления таких антигенсвязывающих молекул, которые ингибируют образование этих комплексов на иммунных клетках, включающих антигенпредставляющие клетки, представляют собой, например, три варианта осуществления, описанных ниже.

Антигенсвязывающие молекулы, которые ингибируют образование гетерокомплексов

Вариант осуществления 1.

Антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc-область, обладающую активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH и активность связывания которой с активирующим FcγR является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим FcγR.

Антигенсвязывающая молекула согласно варианту осуществления 1 образует тримерный комплекс посредством связывания с двумя молекулами FcRn; однако она не образует какой-либо комплекс, содер-

жащий активирующий FcγR. Fc-область, активность связывания которой с активирующим FcγR является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим FcγR, можно получать путем изменения аминокислот нативной Fc-области, как описано выше. То, является ли активность связывания измененной Fc-области с активирующим FcγR более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим FcγR, можно соответствующим образом исследовать с использованием способов, описанных в разделе "активность связывания" выше.

Предпочтительные активирующие Fcγ-рецепторы включают FcγRI (CD64), который включает FcγRIa, FcγRIb, и FcγRIc; FcγRIIa (включая аллотипы R131 и H131); и FcγRIII (CD16), который включает изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2).

В рамках настоящего изобретения "активность связывания варианта Fc-области с активирующим Fcγ-рецептором является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим Fcγ-рецептором" означает, что активность связывания варианта Fc-области с любым из Fcγ-рецепторов человека (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb) является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с этими Fcγ-рецепторами человека. Например, это означает, что, исходя из описанного выше способа анализа, активность связывания антигенсвязывающей молекулы, содержащей вариант Fc-области, по сравнению с активностью связывания антигенсвязывающей молекулы, содержащей нативную Fc-область в качестве контроля, составляет 95% или менее, предпочтительно 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее и особенно предпочтительно 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее или 1% или менее. В качестве нативной Fc-области можно использовать исходную Fc-область, и также можно использовать Fc-области антител дикого типа отличающихся изотипов.

Между тем, активность связывания нативной формы с активирующим FcγR предпочтительно представляет собой активность связывания с Fcγ-рецептором для IgG1 человека. Помимо проведения описанных выше изменений, активность связывания с Fcγ-рецептором может быть снижена путем изменения изотипа IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека. Альтернативно, помимо проведения упомянутых выше изменений, активность связывания с Fcγ-рецептором также может быть снижена путем экспрессии антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-область, обладающую активностью связывания с Fcγ-рецептором в хозяевах, которые не присоединяют цепи сахаров, таких как Escherichia coli.

В качестве антигенсвязывающей молекулы, содержащей контрольную Fc-область, можно соответственно использовать антигенсвязывающую молекулу, обладающую Fc-областью моноклонального IgG-антитела. Структуры таких Fc-областей представлены в SEQ ID NO: 5 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAC82527.1), SEQ ID NO: 6 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59393.1), SEQ ID NO: 7 (номер доступа RefSeq CAA27268.1) и SEQ ID NO: 8 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59394.1). Более того, когда антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc-область конкретного изотипа антитела, используют в качестве исследуемого вещества, эффект антигенсвязывающей молекулы, содержащей исследуемую Fc-область, в отношении активности связывания Fcγ-рецептора, исследуют с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы, имеющей Fc-область моноклонального IgG-антитела этого конкретного изотипа. Таким путем пригодным образом выбирают антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-область, для которой продемонстрировано, что ее активность связывания Fcγ-рецептора является высокой.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительные примеры Fc-областей, активность связывания которых с активирующим FcγR является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим FcγR, включают Fc-области с изменением одной или нескольких аминокислот в любом из положений 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 328 и 329, как указано с помощью нумерации EU, в аминокислотах описанной выше Fc-области так, чтобы она отличалась от нативной Fc-области. Изменения в Fc-области не ограничиваются описанным выше примером, и они могут представлять собой, например, модификации, такие как дегликозилгликозилирование (N297A и N297Q), IgG1-L234A/L235A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A и IgG4-L236E, описанные в Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691; изменения, такие как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325L/L328R, описанные в WO 2008/092117; вставки аминокислот в положениях 233, 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU; и изменения в положениях, описанных в WO 2000/042072.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры предпочтительной Fc-области включают Fc-области, имеющие одно или несколько из следующих изменений, как указано с помощью нумерации EU, в упомянутой выше Fc-области:

Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr или Trp в качестве аминокислоты в положении 234;

Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val или Arg в качестве аминокислоты в положении 235;

Arg, Asn, Gln, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro или Tyr в качестве аминокислоты в положении 236;

Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val, Tyr или Arg в качестве аминокислоты в положении 237;

Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Thr, Trp или Arg в качестве аминокислоты в положении 238;

Gln, His, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr или Arg в качестве аминокислоты в положении 239;

Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 265;

Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 266;

Arg, His, Lys, Phe, Pro, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 267;

Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 269;

Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 270;

Arg, His, Phe, Ser, Thr, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 271;

Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Ser, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 295;

Arg, Gly, Lys или Pro в качестве аминокислоты в положении 296;

Ala в качестве аминокислоты в положении 297;

Arg, Gly, Lys, Pro, Trp или Tyr в качестве аминокислоты в положении 298;

Arg, Lys или Pro в качестве аминокислоты в положении 300;

Lys или Pro в качестве аминокислоты в положении 324;

Ala, Arg, Gly, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 325;

Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val в качестве аминокислоты в положении 327;

Arg, Asn, Gly, His, Lys или Pro в качестве аминокислоты в положении 328;

Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или Arg в качестве аминокислоты в положении 329;

Pro или Ser в качестве аминокислоты в положении 330;

Arg, Gly или Lys в качестве аминокислоты в положении 331; или

Arg, Lys или Pro в качестве аминокислоты в положении 332.

Вариант осуществления 2. Антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc-область, обладающую активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH и активность связывания которой с ингибиторным FcγR превышает активность связывания с активирующим Fcγ-рецептором

Путем связывания с двумя молекулами FcRn и одной молекулой ингибирующего FcγR, антигенсвязывающая молекула согласно варианту осуществления 2 может образовывать комплекс, содержащий эти четыре молекулы. Однако, поскольку одна антигенсвязывающая молекула может связываться только с одной молекулой FcγR, одна антигенсвязывающая молекула в состоянии, связанном с ингибиторным FcγR, не может связываться с другими активирующими FcγR. Более того, было описано, что антигенсвя-

зывающая молекула, которая включается в клетки в состоянии, связанном с ингибиторным FcγR, рециклируют на клеточную мембрану и, таким образом, ускользает от деградации внутри клеток (Immunity (2005) 23, 503-514). Более конкретно, считается, что антигенсвязывающие молекулы, обладающие активностью селективного связывания с ингибиторным FcγR, не могут образовывать гетерокомплексы, содержащие активирующий FcγR и две молекулы FcRn, которые вызывают иммунный ответ.

Предпочтительные активирующие Fcγ-рецепторы включают FcγRI (CD64), который включает FcγRIa, FcγRIb, и FcγRIc; FcγRIIa (включая аллотипы R131 и H131); и FcγRIII (CD16), который включает изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2). Между тем, примеры предпочтительных ингибиторных Fcγ-рецепторов включают FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2).

В рамках настоящего изобретения "активность связывания с ингибиторным FcγR является более высокой, чем активность связывания с активирующим Fcγ-рецептором" означает, что активность связывания варианта Fc-области с FcγRIIb является более высокой, чем активность связывания с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb. Например, это означает, что, исходя из описанного выше способа анализа, активность связывания с FcγRIIb антигенсвязывающей молекулы, содержащей вариант Fc-области, по сравнению с активностью связывания с любым из Fcγ-рецепторов человека: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или FcγRIIIb составляет 105% или более, предпочтительно 110% или более, 120% или более, 130% или более, 140% или более, и в частности предпочтительно 150% или более, 160% или более, 170% или более, 180% или более, 190% или более, 200% или более, 250% или более, 300% или более, 350% или более, 400% или более, 450% или более, 500% или более, 750% или более, или превышает 10 раз или более, в 20 раз или более, в 30 раз или более, в 40 раз или более, в 50 раз или более.

Наиболее предпочтительно, активность связывания с FcγRIIb является более высокой, чем каждая из активностей связывания с FcγRIa, FcγRIIa (включая аллотипы R131 и H131) и FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158). FcγRIa демонстрирует выраженную высокую аффинность в отношении нативного IgG1; таким образом, полагают, что связывание является насыщенным in vivo вследствие присутствия большого количества эндогенного IgG1. По этой причине может быть возможным ингибирование образования комплекса, даже если активность в отношении FcγRIIb является более высокой, чем активность связывания с FcγRIIa и FcγRIIIa, и является более низкой, чем активность связывания с FcγRIa.

В качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-область, предпочтительно можно использовать антигенсвязывающие молекулы, имеющие Fc-область моноклонального IgG-антитела. Структуры таких Fc-областей представлены в SEQ ID NO: 5 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAC82527.1), SEQ ID NO: 6 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59393.1), SEQ ID NO: 7 (номер доступа RefSeq CAA27268.1) и SEQ ID NO: 8 (A добавлен на N-конец последовательности с номером доступа RefSeq AAB59394.1). Более того, когда антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc-область конкретного изотипа антитела, используют в качестве исследуемого вещества, эффект антигенсвязывающей молекулы, содержащей исследуемую Fc-область, в отношении активности связывания Fcγ-рецептора, исследуют с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы, имеющей Fc-область моноклонального IgG-антитела этого конкретного изотипа. Таким путем пригодным образом выбирают антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-область, для которой продемонстрировано, что ее активность связывания с Fcγ-рецептором является высокой.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительные примеры Fc-областей, обладающих активностью селективного связывания с ингибиторным FcγR, включают Fc-области, в которых среди аминокислот описанной выше Fc-области аминокислота в положении 238 или 328, как указано с помощью нумерации EU, изменена на аминокислоту, отличающуюся от аминокислоты в нативной Fc-области. Более того, в качестве Fc-области, обладающей активностью селективного связывания с ингибиторным Fcγ-рецептором, можно соответственно выбирать Fc-области или изменения, описанные в US 2009/0136485.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительным примером является Fc-область, имеющая одно или несколько из следующих изменений, как указано с помощью нумерации EU, в упомянутой выше Fc-области: аминокислота в положении 238 представляет собой Asp или аминокислота в положении 328 представляет собой Glu.

В другом неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры предпочтительной Fc-области включают Fc-области, имеющие замену Pro в положении 238 в соответствии с нумерацией EU на Asp и имеющие одно или несколько из изменений: изменение аминокислоты в положении 237 в соответствии с нумерацией EU на Trp, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Phe, аминокислота в положении 267 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Val, аминокислота в положении 267 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Gln, аминокислота в положении 268 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asn,

аминокислота в положении 271 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Gly, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Leu, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Gln, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Glu, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Met, аминокислота в положении 239 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 267 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Ala, аминокислота в положении 234 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Trp, аминокислота в положении 234 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Tyr, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Ala, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Glu, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Leu, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Met, аминокислота в положении 237 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Tyr, аминокислота в положении 330 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Lys, аминокислота в положении 330 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Arg, аминокислота в положении 233 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 268 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 268 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Glu, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Ser, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Thr, аминокислота в положении 323 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Ile, аминокислота в положении 323 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Leu, аминокислота в положении 323 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Met, аминокислота в положении 296 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asp, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Ala, аминокислота в положении 326 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Asn, и аминокислота в положении 330 в соответствии с нумерацией EU представляет собой Met.

Вариант осуществления 3. Антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc-область, в которой один из двух полипептидов, составляющих Fc-область, обладает активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH, а другой полипептид не обладает активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH.

Посредством связывания с одной молекулой FcRn и одной молекулой FcγR антигенсвязывающая молекула согласно варианту осуществления 3 может образовывать тримерный комплекс; однако она не образует какой-либо гетерокомплекс, содержащий четыре молекулы, включая две молекулы FcRn и одну молекулу FcγR. В качестве Fc-области, в которой один из двух полипептидов, составляющих Fc-область, обладает активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH, а другой полипептид не обладает какой-либо активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH, которой обладает антигенсвязывающая молекула согласно варианту осуществления 3, можно соответствующим образом использовать Fc-области, происходящие из биспецифических антител. Биспецифические антитела представляют собой два типа антител, обладающие специфичностью в отношении различных антигенов. Биспецифические антитела IgG-типа можно секретировать из гибридных гибридом (квадром), полученных путем слияния двух типов гибридом, продуцирующих IgG-антитела (Milstein et al. (Nature (1983) 305, 537-540).

Когда антигенсвязывающую молекулу согласно варианту осуществления 3 получают с использованием рекомбинантных способов, таких как способы, описанные в упомянутом выше разделе "Антитела", можно использовать способ, в котором гены, кодирующие полипептиды, которые составляют два типа представляющих интерес Fc-областей, трансфицируют в клетки для их коэкспрессии. Однако продуцированные Fc-области будут представлять собой смесь, в которой следующие компоненты существуют в молекулярном соотношении 2:1:1: Fc-область, в которой один из двух полипептидов, составляющих Fc-область, обладает активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH, а другой полипептид не обладает никакой активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH; Fc-область, в которой оба из двух полипептидов, составляющих Fc-область, обладают активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH; и Fc-область, в которой оба из двух полипептидов, составляющих Fc-область, не обладают активностью связывания FcRn в условиях диапазона нейтральных значений pH. Трудно очищать антигенсвязывающие молекулы, содержащие желаемую комбинацию Fc-областей, из трех типов IgG.

При получении антигенсвязывающих молекул согласно варианту осуществления с использованием таких рекомбинантных способов, антигенсвязывающие молекулы, содержащие гетеромерную комбинацию тяжелых цепей, можно предпочтительно секретировать путем добавления соответствующих аминокислотных замен в CH3-домены, составляющие Fc-области. В частности, этот способ проводят путем замены аминокислотой, имеющей более крупную боковую цепь (выступ (что означает "выпуклая часть")) аминокислоты в CH3-домене одной из тяжелых цепей, и замены аминокислотой, имеющей

меньшую боковую цепь (углубление (что означает "полость")) аминокислоты в CH3-домене другой тяжелой цепи, так чтобы выступ размещался в полости. Это обеспечивает образование гетеромерной тяжелой цепи и одновременно ингибирует образование гомомерной тяжелой цепи (WO 1996027011; Ridgway et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621; Merchant et al., Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681).

Более того, также существуют известные способы получения биспецифического антитела с использованием способов контроля ассоциации полипептидов или ассоциации образованных полипептидом гетеромерных мультимеров для ассоциации между двумя полипептидами, которые составляют Fc-область. В частности, способы контроля образования тяжелых цепей можно использовать для получения биспецифического антитела (WO 2006/106905), в котором аминокислотные остатки, образующие поверхность контакта между двумя полипептидами, которые составляют Fc-область, изменяют для ингибирования ассоциации между Fc-областями, имеющими ту же последовательность, и для обеспечения образования полипептидных комплексов, образованных двумя Fc-областями с различными последовательностями. В частности, в качестве неограничивающего варианта осуществления для получения антигенсвязывающей молекулы согласно варианту осуществления 3 по настоящему изобретению можно использовать способы, описанные в представленном выше разделе, касающемся биспецифических антител и способов их получения.

Ожидается, что эти антигенсвязывающие молекулы согласно вариантам осуществления 1-3 способны снижать иммуногенность и увеличивать время удержания в плазме по сравнению с антигенсвязывающими молекулами, способными образовывать тетрамерные комплексы.

Способы получения антигенсвязывающих доменов

Настоящее изобретение относится к способам получения антигенсвязывающих доменов, антигенсвязывающая активность которых в присутствии специфического для ткани-мишени соединения является более высокой, чем антигенсвязывающая активность в отсутствие соединения.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e), ниже:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии низкомолекулярного соединения;

(c) отбор антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого в отсутствие низкомолекулярного соединения является более низкой, чем в присутствии соединения;

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e) ниже:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(c) отбор антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения является более низкой, чем в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан; и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e), ниже:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов или их библиотеки с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов, которые связались с антигеном на указанной стадии (a), в условия отсутствия соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, который диссоциировал на указанной стадии (b);

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e), ниже:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов или их библиотеки с антигеном в присутст-

вии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на указанной стадии (a), в условия присутствия низкой концентрации соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, который диссоциирует на указанной стадии (b);

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан; и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(f), ниже:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) выбор антигенсвязывающих доменов, которые не связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, выбранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии с (a) по (f), ниже:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) выбор антигенсвязывающих доменов, которые не связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, выбранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e), ниже:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающих доменов, которые связываются с колонкой на указанной стадии (a), из колонки в отсутствие соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, элюированного на указанной стадии (b);

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(e), ниже:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающих доменов, которые связываются с колонкой на указанной стадии (a), из колонки в присутствии низкой концентрации соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, элюированного на указанной стадии (b);

(d) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), функционально связан и

(e) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (d).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(f), ниже:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающих доменов, которые элюировались без связывания с колонкой на стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, собранным на стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на стадии (c);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(f), ниже:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающих доменов, которые элюируются без связывания с колонкой на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, собранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(f), ниже:

(a) приведение в контакт антигена с библиотекой антигенсвязывающих доменов в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) получение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающего домена, полученного на стадии (b), в условия отсутствия соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого на стадии (c) является более слабой, чем у эталона, выбранного на стадии (b);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего домена, который включает стадии (a)-(f), ниже:

(a) приведение в контакт антигена с библиотекой антигенсвязывающих доменов в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) получение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающих доменов, полученных на стадии (b), в условиях присутствия низкой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого на стадии (c) является более слабой, чем у эталона, выбранного на стадии (b);

(e) культивирование клеток, трансфицированных вектором, с которым полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающего домена из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используют в настоящем описании синонимично, и такие обозначения могут включать всех потомков клетки или клеточной линии. Таким образом, например, термины "трансформант" и "трансформированные клетки" включают культуры и первичные клетки-мишени, происходящие из них, не зависимо от количества пассирований. Более того понятно, что все потомки могут не быть точно идентичными по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. Также могут быть включены мутантные потомки, которые обладают по существу той же функцией или биологической активностью, например, в отношении которых проводили скрининг первоначально трансформированных клеток. Если подразумевается другое обозначение, это будет очевидно из контекста описания. Клетки, которые являются пригодными для применения, соответственно выбирают из клеток, описанных в разделе "Антитела", выше.

При указании на экспрессию кодирующей последовательности, термин "последовательности контроля" относится к нуклеотидным последовательностям ДНК, которые необходимы для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Последо-

вательности контроля, пригодные, например, для прокариот, включают промотор, необязательную последовательность оператора, участок связывания рибосом и, возможно, другие последовательности, которые все еще предстоит изучить. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры для экспрессии кодирующей последовательности.

Для нуклеиновой кислоты термин "функционально связанный" означает, что нуклеиновая кислота имеет функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК препоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если он экспрессируется в качестве белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида. Промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Участок связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать трансляции. Обычно выражение "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляют посредством лигирования в подходящих участках рестрикции. Если такие участки не существуют, используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры в соответствии с общепринятой практикой. Более того, связанные нуклеиновые кислоты можно получать с помощью упомянутой выше технологии перекрывающейся ПЦР.

"Цитирование" относится к процессу формирования фосфодиэфирной связи между двумя фрагментами нуклеиновой кислоты. Для лигирования двух фрагментов концы этих фрагментов должны быть совместимыми друг с другом. В некоторых случаях эти концы обладают совместимостью сразу после расщепления эндонуклеазой. Однако может быть необходимо, чтобы сначала липкие концы, обычно образующиеся при расщеплении эндонуклеазой, были преобразованы в тупые концы, чтобы они стали совместимыми для лигирования. Для преобразования в тупые концы ДНК обрабатывают в подходящем буфере в течение по меньшей мере 15 минут при 15°C приблизительно 10 единицами фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I или ДНК-полимеразой T4 в присутствии четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в соответствующем буферном растворе. Далее ДНК очищают экстракцией фенолом-хлороформом и преципитацией этанолом, или очисткой на диоксиде кремния. Фрагменты ДНК, подлежащие лигированию, добавляют в эквимолярных количествах к раствору. Этот раствор содержит ATP и буфер лигазы, лигазу, такую как ДНК-лигаза T4 в количестве приблизительно 10 единиц на 0,5 мкг ДНК. Если ДНК подлежит лигированию с вектором, вектор сначала линеаризуют посредством расщепления соответствующей эндонуклеазой(ами) рестрикции. Затем линеаризованный фрагмент обрабатывают бактериальной щелочной фосфатазой или фосфатазой кишечника теленка, тем самым препятствуя самолигированию фрагмента на стадии лигирования.

В способах получения по настоящему изобретению, антигенсвязывающий домен, который обладает более высокой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкомолекулярного соединения, чем в его отсутствие, который может быть отобран с помощью способа, описанного в представленном выше разделе "Антигенсвязывающий домен, зависимый от низкомолекулярного соединения", является выделенным. Например, когда антигенсвязывающий домен, выделенный таким образом, отобран из библиотеки, полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающий домен выделяют обычно амплификацией генов из вируса, такого как фаг, как описано в разделе "Примеры", ниже. Более того, когда антигенсвязывающий домен или антитело, выделенные таким образом, являются отобранными из культуральной среды клеток, таких как гибридомы, ген антитела и т.п. можно выделять обычной амплификацией генов из клеток, как показано в разделе "Антитела", выше.

Способы получения антигенсвязывающих молекул

Настоящее изобретение относится к способам получения антигенсвязывающих молекул, антигенсвязывающая активность которых в присутствии низкомолекулярного соединения является более высокой, чем антигенсвязывающая активность в отсутствие соединения.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающих молекул, который включает стадии:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии низкомолекулярного соединения;

(c) отбор антигенсвязывающего домена с более низкой антигенсвязывающей активностью в отсутствие низкомолекулярного соединения, чем в присутствии соединения;

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) определение антигенсвязывающей активности антигенсвязывающего домена в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(c) отбор антигенсвязывающего домена с более низкой антигенсвязывающей активностью в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения, чем в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов или их библиотеки с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на указанной стадии (a), в условия отсутствия соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, который диссоциирует на указанной стадии (b);

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающей молекулы из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт антигенсвязывающих доменов или их библиотеки с антигеном в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) помещение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на указанной стадии (a), в условия присутствия низкой концентрации соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, который диссоциирует на указанной стадии (b);

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c) с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан и

(f) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) выбор антигенсвязывающих доменов, которые не связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, отобранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e), функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) отбор антигенсвязывающих доменов, которые не связываются с антигеном на указанной стадии

(a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, отобранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e), функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающих доменов, которые связываются с колонкой на указанной стадии (a), из колонки в отсутствие соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, элюированного на указанной стадии (b);

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан; и

(f) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с колонкой с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) элюирование антигенсвязывающих доменов, которые связываются с колонкой на указанной стадии (a), из колонки в присутствии низкой концентрации соединения;

(c) выделение антигенсвязывающего домена, элюированного на указанной стадии (b);

(d) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (c), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(e) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (d), функционально связан; и

(f) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (e).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающих доменов, которые элюируются без связывания с колонкой на указанной стадии (a) ;

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, собранным на стадии (b), связаться с антигеном в присутствии соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на стадии (c);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e), функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) позволение библиотеке антигенсвязывающих доменов пройти через колонку с иммобилизованным на ней антигеном в присутствии низкой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающих доменов, которые элюируются без связывания с колонкой на указанной стадии (a);

(c) позволение антигенсвязывающим доменам, собранным на указанной стадии (b), связаться с антигеном в присутствии высокой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на указанной стадии (c);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e), функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) получение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающих доменов, полученных на указанной стадии (b), в условия отсутствия соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого на указанной стадии (c) является более слабой, чем у эталона, выбранного на стадии (b);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e), функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки антигенсвязывающих доменов с антигеном в присутствии высокой концентрации низкомолекулярного соединения;

(b) получение антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антигеном на указанной стадии (a);

(c) помещение антигенсвязывающих доменов, полученных на стадии (b), в условия присутствия низкой концентрации соединения;

(d) выделение антигенсвязывающего домена, антигенсвязывающая активность которого на стадии (c) является более слабой, чем у эталона, отобранного на стадии (b);

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d), с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (e) функционально связан; и

(g) сбор антигенсвязывающих молекул из культуральной среды клеток, культивированных на стадии (f).

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по настоящему изобретению с антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) отбор антигенсвязывающего домена, который не связывается с антигеном на стадии (a) выше;

(c) приведение в контакт антигенсвязывающего домена, отобранного на стадии (b) выше, с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(d) отбор антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на стадии (c) выше;

(e) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d) выше, с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым функционально связан полинуклеотид, полученный на стадии (e) выше; и

(g) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клеток, культивированиях на стадии (f) выше.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который далее включает, в дополнение к упомянутому выше варианту осуществления, стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по настоящему изобретению с низкомолекулярным соединением; и

(b) отбор антигенсвязывающего домена, полученного на стадии (a) выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьиру-

ется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по настоящему изобретению с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающего домена посредством диссоциации с использованием более низкой концентрации низкомолекулярного соединения, чем на стадии (a) выше;

(c) связывание полинуклеотида, кодирующего антигенсвязывающий домен, собранный на стадии (b) выше, с полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий Fc-область;

(d) культивирование клеток, в которые введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (c) выше, функционально связан; и

(e) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клеток, культивированных на стадии (d) выше.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антигенсвязывающей молекулы, которая содержит антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который далее включает, в дополнение к упомянутому выше варианту осуществления, стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по настоящему изобретению с низкомолекулярным соединением и

(b) отбор антигенсвязывающего домена, собранного на стадии (a) выше.

Неограничивающий вариант осуществления Fc-области, полинуклеотидная последовательность которой связана с полинуклеотидом, кодирующим антигенсвязывающий домен, представляет собой, например, Fc-область, содержащуюся в константной области антитела IgG1 (SEQ ID NO: 5), IgG2 (SEQ ID NO: 6), IgG3 (SEQ ID NO: 7) или IgG4 (SEQ ID NO: 8) человека. Fc-область представляет собой часть константной области тяжелой цепи антитела, начинающаяся с N-конца шарнирной области, который соответствует участку расщепления папаином в области аминокислота вблизи положения 216 в соответствии с нумерацией EU, и содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. Fc-область можно получать из IgG1 человека, однако она не ограничивается конкретным подклассом IgG.

Неограничивающий вариант осуществления Fc-области, полинуклеотидная последовательность которой связана с полинуклеотидом, кодирующим антигенсвязывающий домен, включает, например, Fc-области, активность связывания которых с активирующим FcγR, является более низкой, чем активность связывания нативной Fc-области с активирующим FcγR. Другой неограничивающий вариант осуществления Fc-области предпочтительно включает, например, Fc-области, в которых одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 328, и 329 в соответствии с нумерацией EU изменены на аминокислоты, которые отличаются от аминокислот нативной Fc-области SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8. Изменения в Fc-области не ограничиваются описанным выше примером, и они могут представлять собой, например, такие изменения, как дегликозилгликозилирование (N297A и N297Q), IgG1-L234A/L235A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A и IgG4-L236E, описанные в Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691; изменения, такие как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325L/L328R, описанные в WO 2008/092117; вставки аминокислот в положениях 233, 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU; и изменения в положениях, описанных в WO 2000/042072.

Когда Fc-область, содержащаяся в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, представляет собой Fc-область, которая модифицирована так, чтобы процент Fc-областей, с которыми связана цепь сахаров с дефицитом фукозы или биссекторный N-ацетилглюкозамин, был более высоким, упомянутые выше трансформированные клетки-хозяева, которые соответственно используют, представляют собой клетки-хозяева, которые обладают низкой способностью присоединять фукозу к цепи сахаров в результате модификации активности для формирования структуры цепи сахаров полипептида, подлежащего модификации цепью сахаров (например, WO 2000/061739, WO 2002/031140, и WO 2006/067913). В неограничивающем варианте осуществления таких клеток-хозяев, можно соответственно использовать клетки-хозяева с дефицитом активности фермента или переносчика, выбранного из группы, состоящей из фукозилтрансферазы (EC 2.4.1.152), переносчика фукозы (SLC35C1), GMD (GDP-маннозa-4,6-дегидратаза) (EC 4.2.1.47), Fx (GDP-кето-6-дезоксиманноза-3,5-эпимераза, 4-редуктаза) (EC 1.1.1.271) и GFPP (GDP-β-L-фукозопирофосфорилаза (EC 2.7.7.30) (например, WO 2000/061739, WO 2002/031140 и WO 2006/067913). Клетки-хозяева с дефицитом такой активности можно получать, например, способом, который разрушает гены этих функциональных белков, эндогенных для клеток CHO, клеток BHK, клеток NS0, клеток SP2/0, клеток миеломы YO, клеток миеломы мыши P3X63, клеток PER, клеток PER.C6, клеток HEK293, клеток гибридомы и т.п., так чтобы гены были неспособны функционировать.

Когда Fc-область, содержащаяся в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, представляет собой Fc-область, имеющую цепь сахаров, содержащую биссекторный GlcNAc, описанные выше трансформированные клетки, которые соответственно используют, представляют собой клетки-хозяева, экспрессирующие ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью GnTIII

(β-1, 4-маннозилгликопротеин-4-β-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза) (EC 2.4.1.94) или активностью GalT (β-1, 4-галактозилтрансфераза) (EC 2.4.1.143), для получения антител, которые имеют биссекторные содержащие GlcNAc цепи сахаров (WO 2002/079255 и т.п.). В другом подходящем неограничивающем варианте осуществления пригодным образом используют клетки-хозяева, которые экспрессируют, в дополнение к упомянутым выше функциональным белкам, ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью ManII человека (маннозидаза II) (3.2.1.114), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью GnTI (β-1,2-ацетилглюкозаминилтрансфераза I) (EC 2.4.1.94), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью GnTII (β-1,2-ацетилглюкозаминилтрансфераза II) (EC 2.4.1.143), ген, кодирующий функциональный белок, обладающий активностью ManI (манноидаза) (EC 3.2.1.113) и α-1, 6-фукозилтрансферазы (EC 2.4.1.68) (WO 2004/065540).

Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению получают с использованием способов, которые аналогичны способам получения антител, такими как выделение из культуральной среды упомянутых выше клеток, которые описаны в разделе "Антитела", выше. Неограничивающий вариант осуществления упомянутых выше полипептидов, содержащих Fc-область, включает, например, константную область антитела SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8. Неограничивающий вариант осуществления антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению представляет собой, например, полноразмерную молекулу антитела.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающую молекулу, которая не действует системно в крови или нормальных клетках, а действует на очаги повреждения, такие как рак и области воспаления, проявляя эффективность лекарственного средства, одновременно избегая побочных эффектов. Связывание антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, с антигеном-мишенью регулируется в зависимости от концентрации специфических для ткани-мишени соединений, которые специфически присутствуют или продуцируются в ткани-мишени, и/или неприродных соединений, которые накапливаются в ткани. Таким образом, например, когда антигенсвязывающая молекула нацелена на антиген в ткани злокачественной опухоли или воспаленной ткани, она связывается с антигеном, экспрессируемым в злокачественных клетках, иммунных клетках, стромальных клетках и т.п. в злокачественных тканях; антигеном, секретируемым в злокачественных тканях; или антигеном, экспрессируемым иммунными клетками и т.п. в воспаленных тканях; и антигеном, секретируемым в воспаленных тканях; и она не может связываться с антигенами, экспрессируемыми в нормальных тканях; таким образом, побочные эффекты вследствие цитотоксической активности, нейтрализующей активности и т.п. против нормальной ткани устраняются; и в то же время обеспечиваются мощные цитотоксические эффекты, эффекты подавления роста и усиливающее иммунитет действие на злокачественные опухоли, или иммунодепрессивные эффекты против воспалительных клеток в воспаленных тканях. Например, биспецифическая или бипаратопная антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR, экспрессируемым на злокачественных клетках, и антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3, экспрессируемым на Т-клетках в зависимости от специфического для злокачественной ткани соединения, не связывается с EGFR, экспрессируемым в нормальных тканях, но связывается с EGFR, экспрессируемым на злокачественных клетках; тем самым, проявляя мощные противоопухолевые эффекты, одновременно избегая побочных эффектов. В частности, в то время как антигенсвязывающая молекула связывается с CD3, экспрессируемым на Т-клетках вблизи злокачественных клеток, в зависимости от специфического для злокачественной ткани соединения, молекула не связывается с CD3, экспрессируемым на Т-клетках, которые не находятся вблизи злокачественных клеток. Таким образом, молекула активирует Т-клетки вблизи злокачественных клеток, проявляя мощные противоопухолевые эффекты, и одновременно избегая побочных эффектов.

Такие антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с антигеном в тканях-мишенях, но не в других нормальных тканях и крови, проявляют эффективность лекарственного средства, одновременно избегая побочных эффектов. Антигенсвязывающие молекулы, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, которые связываются с антигеном с использованием низкомолекулярного соединения, присутствующего в высоких концентрациях в тканях-мишенях in vivo в качестве переключающего фактора, а именно, антигенсвязывающие молекулы с низкомолекулярным переключателем, не связываются с антигеном в нормальных условиях, где низкомолекулярное соединение отсутствует, но могут связываться с антигеном в тканях-мишенях, где низкомолекулярное соединение присутствует в высоких концентрациях.

Неограничивающий вариант осуществления таких антигенсвязывающих молекул с низкомолекулярным переключателем включает специфические для злокачественной ткани, зависимые от соединений или специфические для воспаленной ткани зависимые от соединений антигенсвязывающие молекулы; где специфическое для злокачественной опухоли или специфическое для воспаленной ткани соединение, такое как аденозин, аденозин-5'-трифосфат (ATP), инозин, кинуренин, простагландин E2 (PGE2), янтар-

ная кислота и молочная кислота, которые присутствуют в злокачественных тканях или воспаленных тканях в высоких концентрациях и способны функционировать в качестве переключающего фактора, обеспечивают функцию переключения вследствие размещения между антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению (паратопом, содержащимся в ней) и антигеном (эпитопом, содержащимся в нем) или вследствие связывания с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, тем самым изменяя структуру паратопа антигенсвязывающей молекулы для антигена. В отсутствие соединения взаимодействие между паратопом в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению и эпитопом в антигене не является достаточным, чтобы антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению была способна связаться с антигеном. В присутствии соединения соединение располагается между паратопом в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению и эпитопом в антигене или изменяет структуру паратопа; и антигенсвязывающая молекула, которая связалась с антигеном в ткани-мишени, такой как злокачественная ткань или воспаленная ткань, где соединение присутствует в высоких концентрациях, может проявлять эффективность лекарственного средства в отношении клеток, экспрессирующих антиген. Более того, поскольку это связывание переключающего соединения является обратимым, связывание антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с антигеном с помощью этих переключающих соединений можно контролировать обратимым образом. Таким образом, антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, которые могут проявлять эффективность лекарственного средства в очаге повреждения, таком как злокачественная ткань или воспаленная ткань, путем связывания с патогенными клетками, такими как злокачественные клетки или иммунные клетки в злокачественной ткани или воспаленной ткани, или путем связывания с антигеном, секретируемым в злокачественной ткани или воспаленной ткани, являются пригодными в качестве фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель.

В рамках настоящего изобретения фармацевтические композиции, как правило, относятся к фармацевтическим средствам для лечения, или предупреждения, или исследования и диагностики заболевания. Более того, в рамках настоящего изобретения, выражение "фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, антигенсвязывающая активность которой варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения" (в этом отношении низкомолекулярное соединение включает специфическое для ткани-мишени соединение, неприродное соединение и т.п.) может быть переформулировано как "способ лечения заболевания, который включает введение индивидуму, подлежащему лечению, антигенсвязывающей молекулы, антигенсвязывающая активность которой варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения" или может быть переформулировано как "применение антигенсвязывающей молекулы, антигенсвязывающая активность которой варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения для получения фармацевтического препарата для лечения заболевания". Более того, выражение "фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, антигенсвязывающая активность которой варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения" можно переформулировать как "применение антигенсвязывающей молекулы, антигенсвязывающая активность которой варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, для лечения заболевания".

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены способами, известными специалистам в данной области. Например, их можно использовать парентерально в форме инъекций стерильных растворов или суспензий, включающих воду или другую фармацевтически приемлемую жидкость. Например, такие композиции могут быть составлены путем смешения в форме единичной дозы, требуемой повсеместно одобренной практикой производства лекарственных средств, путем комбинирования надлежащим образом с фармакологически приемлемыми носителями или средами, в частности, со стерильной водой, физиологическим раствором, растительным маслом, эмульгатором, суспензией, поверхностно-активным веществом, стабилизатором, вкусовой добавкой, эксципиентом, носителем, консервантом, связующим веществом и т.п. В таких составах количество активного ингредиента корректируют так, чтобы получить соответствующее количество в заданном диапазоне.

Стерильные композиции для инъекций могут быть составлены с использованием носителей, таких как дистиллированная вода для инъекций, в соответствии со стандартной практикой составления.

Водные растворы для инъекций включают, например, физиологический солевой раствор и изотонические растворы, содержащие декстрозу или другие адъюванты (например, D-сорбит, D-маннозу, D-маннит и хлорид натрия). Также их можно использовать в комбинации с соответствующими солюбилизаторами, например спиртами (этанол и т.п.), полиспиртами (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), неионными поверхностно-активными веществами (полисорбат 80(TM), HCO-50 и т.п.).

Масла включают кунжутное масло и соевые масла. В комбинации с солюбилизаторами можно использовать бензилбензоат и/или бензиловый спирт. Также можно комбинировать буферы (например, фосфатный буфер натрий-ацетатный буфер), успокаивающие средства (например, прокаина гидрохлорид), стабилизаторы (например, бензиловый спирт и фенол) и/или антиоксиданты. Полученными инъекционными препаратами заполняют подходящие ампулы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно вводят парентераль-

но. Например, вводят композиции в дозированной форме для инъекций, трансназального введения, введения через легкие или чрескожного введения. Например, их можно вводить системно или локально путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции и т.п.

Способы введения можно надлежащим образом выбирать, учитывая возраст и симптомы пациента. Доза фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу, может составлять, например, от 0,0001 до 1,000 мг/кг для каждого введения. Альтернативно доза может составлять, например, от 0,001 до 100000 мг на пациента. Однако настоящее изобретение не ограничивается числовыми величинами, описанными выше. Дозы и способы введения варьируют, в зависимости от массы тела пациента, возраста, симптомов и т.п. Специалисты в данной области могут установить подходящие дозы и способы введения, учитывая факторы, описанные выше.

Аминокислоты, содержащиеся в аминокислотных последовательностях по настоящему изобретению, могут быть посттрансляционно модифицированными (например, модификация N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования хорошо известна специалистам в данной области). Естественно, такие посттрансляционно модифицированные аминокислоты включены в аминокислотные последовательности по настоящему изобретению.

Специалистам в данной области будет естественным образом понятно, что любая произвольная комбинация одного или нескольких вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, включена в настоящее изобретение при условии, что она не противоречит технически общему знанию специалистов в данной области.

Все цитированные в описании документы уровня техники включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Примеры

Пример 1. Концепция и стратегия получения антител с переключателем, которые связываются с антигенами с исопльзованием низкомолекулярных соединений, которые присутствуют в тканях-мишенях в качестве переключателей в высоких концентрациях (1-1)

Концепция антител с переключателем, у которых способность связывать антиген варьируется в присутствии соединений, специфических для ткани-мишени.

Для обеспечения эффективности лекарственного средства, одновременно избегая неблагоприятных эффектов, существует потребность в технологии разработки лекарственных средств, которые действуют в очагах повреждения, таких как злокачественная опухоль или области воспаления, без системного действия на нормальные ткани или кровь. Молекулы антител, которые могут связываться с антигенами, экспрессируемыми на злокачественных клетках, но не способны связываться с антигенами, экспрессируемыми в нормальных тканях, после введения могут проявлять мощные цитотоксические эффекты против злокачественной опухоли, одновременно избегая неблагоприятных эффектов на нормальные ткани в результате цитотокического действия. Например, антигенсвязывающие молекулы, которые были изменены относительно описанной выше EGFR-BiTE (непатентный документ 9), которая не может связываться с EGFR, экспрессированным в нормальных тканях, но способна связываться с EGFR, экспрессируемым на злокачественных клетках, может проявлять мощный противоопухолевый эффект, одновременно избегая побочных эффектов. Между тем, BiTE проявляет противоопухолевый эффект путем привлечения и активации Т-клеток через CD3 (непатентный документ 8); и, если бы было возможно сообщить EGFR-BiTE свойство связывания с CD3, экспрессируемым на Т-клетках вблизи злокачественных клеток, но не с CD3, экспрессируемым на Т-клетках не вблизи злокачественных клеток, EGFR-BiTE, измененная так, чтобы иметь это свойство, могла бы активировать Т-клетки в злокачественной опухоли и, таким образом, могла бы проявлять мощные противоопухолевые эффекты, одновременно избегая неблагоприятных эффектов.

Однако это не ограничивается только антительными фармацевтическими препаратами против злокачественной опухоли. Когда молекула антитела связывается с цитокинами и ингибирует их в синовиальной жидкости воспаленных суставов при ревматоидном артрите, но не ингибирует системно цитокины, молекула может проявлять мощные терапевтические эффекты против воспалительных/аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, одновременно избегая увеличенных рисков инфекции вследствие системной нейтрализации цитокинов.

Как описано выше, антитела, которые связываются с антигенами в злокачественных тканях, но не с антигенами в других тканях, таких как нормальные ткани и кровь, могут проявлять эффективность лекарственного средства, одновременно избегая неблагоприятных эффектов. Однако идеальные антитела, имеющие такие свойства, не были описаны до настоящего времени. Между тем, как показано на фиг. 1, молекулы антител, которые связываются с антигенами через низкомолекулярные соединения в качестве переключающего фактора, который присутствует в высоких концентрациях в злокачественных тканях in vivo или через соединения, которые обладают свойством накапливаться в злокачественных тканях после введения in vivo (т.е. антитела с низкомолекулярными переключающими факторами), не связываются с антигенами в условиях отсутствия таких низкомолекулярных соединений; и они могут связываться с антигенами в тканях-мишенях, где низкомолекулярные соединения присутствуют в высоких концентрациях.

При разработке таких антител с низкомолекулярными переключающими факторами сначала проводили поиск низкомолекулярных соединений, которые присутствуют в высоких концентрациях в злокачественной опухоли, и рассматривали их как пригодные для применения в качестве переключающего фактора. Результат показал, что перспективными в качестве переключающих факторов были аденозин, аденозинтрифосфат (аденозин-5'-трифосфат (ATP)), инозин, кинуренин, простагландин E2 (PGE2), янтарная кислота и молочная кислота. Каждое из этих низкомолекулярных соединений либо продуцируется злокачественными клетками, либо высвобождается из злокачественных клеток после гибели клеток, либо продуцируется иммунными клетками и т.д., инфильтрирующими ткани злокачественной опухоли, и, таким образом, они присутствуют в высоких концентрациях в злокачественных тканях; однако они присутствуют в более низких концентрациях в нормальных тканях и крови по сравнению со злокачественными тканями.

Далее проводили поиск молекул, обладающих свойством накапливаться в злокачественных тканях после введения in vivo. Пролекарства, такие как Кселода и TH302, при введении in vivo метаболизируются метаболическими ферментами, экспрессируемыми в злокачественных тканях, и продуцируют низкомолекулярные молекулы, которые могут служить в качестве переключателя. Таким образом, ожидалось, что 5-фторурацил (5-FU), Br-IPM и т.п. будут пригодными в качестве переключателя. 5-FU является метаболическим продуктом капецитабина (Кселода), и известно, что он метаболизируется ферментами, специфическими для злокачественной ткани - цитидиндезаминазой и тимидинфосфорилазои (Desmoulin F. et al., Drug Metab Dispos. 2002). Между тем, известно, что TH-302 конвертируется в Br-IPM путем восстановления в гипоксических условиях, таких как условия вокруг злокачественных тканей (Duan JX, et al., J Med Chem. 2008). Таким образом, полагают, что после введения in vivo, пролекарства метаболизируются метаболическими ферментами, экспрессируемыми в злокачественными тканями, и существуют в высоких концентрациях, хотя в нормальных тканях и крови, они, как полагают, существуют в низких концентрациях по сравнению со злокачественными тканями.

Если бы эти низкомолекулярные соединения можно было расположить в комплексе между антителом и антигеном так, как показано на фиг. 2, низкомолекулярные соединения могли бы осуществлять функцию переключающего фактора. Альтернативно, если бы эти низкомолекулярные соединения могли изменять способность к связыванию антигена у антитела посредством связывания с ним и изменения конформации антигенсвязывающего участка антитела, эти низкомолекулярные соединения могли бы выполнять функцию переключающего фактора. В частности, в отсутствие низкомолекулярных соединений взаимодействие антиген-антитело является недостаточным и антитело не может связываться с его антигеном; однако в присутствии низкомолекулярного соединения антитело может связываться с антигеном. Иными словами, в присутствии низкой концентрации низкомолекулярных соединений взаимодействие между антигеном антителом является недостаточным и антитело не может связываться с его антигеном, однако в присутствии высокой концентрации низкомолекулярных соединений антитело может связываться с антигеном. Более того, поскольку связывание низкомолекулярных соединений, которые являются переключателем, является обратимым, регуляция связывания антигена посредством этого низкомолекулярного переключателя также является обратимой.

Альтернативно действие антитела может регулироваться введением перорального средства путем перорального введения экзогенного соединения, служащего в качестве переключателя. В частности, когда антитело с переключателем, которое связывается с антигеном с использованием экзогенного соединения в качестве переключателя, которое соединение можно вводить неинвазивным путем, таким как пероральное введение, вводят инвазивно, например внутривенно или подкожно, действие антитела можно регулировать путем неинвазивного введения экзогенного соединения, которое становится переключателем при пероральном введении и т.п. Антительные фармацевтические препараты имеют длительное время полужизни; таким образом, если происходят неблагоприятные эффекты, эффекты будут длительными, и это является недостатком. Однако, если действие антитела можно регулировать таким путем посредством неинвазивного введения экзогенных соединений, такого как пероральное введение, действие фармацевтического препарата может быть прекращено путем прерывания введения молекулы переключателя, когда возникают неблагоприятные эффекты. Более того, посредством предварительного введения антитела с переключателем, фармакологические эффекты могут проявляться, только когда это необходимо, посредством неинвазивного введения, такого как пероральное введение, путем введения молекул переключателя, только когда возникают симптомы заболевания.

(1-2) Стратегия получения антител с переключателем, способность к связыванию антигена у которых варьируется в присутствии специфических для ткани-мишени соединений

Способы более эффективного получения антител с переключателем, которые связываются с антигенами обратимым образом в зависимости от присутствия специфических для ткани-мишени соединений включают способы, в которых используются технологии библиотек. Когда при использовании в качестве матрицы антитела, которое сохраняет связывание со специфическим для ткани-мишени соединением, его вариабельную область, которая не вовлечена в связывание с соединением, преобразуют в библиотеку, антитела, способные связываться с соединением, появляются с более высокой частотой, чем в обычных библиотеках антител, что указывает на то, что антигенсвязывающие молекулы, обладающие желаемыми

свойствами, можно эффективно получать. Таким образом, чтобы первоначально получить антитело для применения в качестве матричной последовательности для библиотеки, проводили получение антител, которые связываются с аденозином или ATP, которые, как известно, присутствуют в злокачественных клетках в высоких концентрациях.

Пример 2. Получение антител против аденозина посредством клонирования B-клеток кролика

(2-1) Моделирование иммуногена для конструирования связывающей аденозин библиотеки

Иммуногены, использованные у кроликов, представляли собой 2'-аденозин-PEG-хелперный пептид столбнячного токсина p30 (2'-аденозин-PEC-пептид), представленный на фиг. 3 и 5'-аденозин-PEG-хелперный пептид p30 столбнячного токсина (5'-аденозин-PEG-пептид), представленный на фиг. 4. Хелперный пептид p30 столбнячного токсина состоит из аминокислотной последовательности FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 4), и он представляет собой пептид, идентифицированный в качестве эпитопа T-клеточного рецептора, экспрессируемого на хелперных T-клетках (Eur. J. Immunol. (1989) 19, 2237-2242). Известно, что пептид активирует продукцию антител (J. Immunol. (1992) 149, 717-721). Когда он связан с аденозином, пептид служит в качестве адъюванта и, таким образом, ожидается, что он будет усиливать продукцию антител против аденозина. Связывание между аденозином и хелперным пептидом p30 столбнячного токсина моделировали через PEG, так чтобы эпитопы антител против аденозина не включали хелперный пептид p30 столбнячного токсина. Аденозин представляет собой метаболит ATP, и, поскольку фосфатфосфатные группы ATP связаны с 5'-гидроксильной группой аденозина, антитела, которые не распознают 5'-гидроксильную группу аденозина в качестве эпитопа, также могут связываться с ATP, в дополнение к аденозину. Следовательно, было бы легче получить антитела, которые могут связываться как с аденозином, так и с ATP, с использованием в качестве иммуногена конструкции 5'-аденозин-PEG-хелперный пептид p30 столбнячного токсина, в то время как было бы легче получить антитела, которые связывается с аденозином, но не с ATP, с использованием в качестве иммуногена конструкции 2'-аденозин-PEG-хелперный пептид p30 столбнячного токсина. По этой причине было получено два типа иммуногенов, которые содержат хелперный пептид p30 столбнячного токсина, связанный с 2'- или 5'-положением аденозина, аналогично тому, как описано в (2-2).

Кроме того, 2'-аденозин-PEG-биотин (фиг. 5) и 5'-аденозин-PEG-биотин (фиг. 6), в котором биотин конъюгирован вместо хелперного пептида p30 столбнячного токсина получали, как описано ниже. Путем оценки связывания с этими двумя типами конструкции аденозин-PEG-биотин, антитела можно исследовать, чтобы продемонстрировать, что их эпитопы не включают хелперный пептид p30 столбнячного токсина.

(2-2) Синтез иммуногенов для получения связывающей аденозин библиотеки

2'-Аденозин-PEG-пептид (конъюгат аденозин 2'-PEG-пептид или 2'-(PEG-пептид)аденозин) и 2'-аденозин-PEG-биотин (конъюгат аденозин 2'-PEG-биотин или 2'-(PEG-биотин)аденозин) синтезировали, как описано ниже. Синтезированный 2'-аденозин-PEG-пептид и 2'-аденозин-PEG-биотин анализировали или фракционировали в условиях, описанных ниже.

Условия анализа LCMS описаны ниже.

Таблица 1

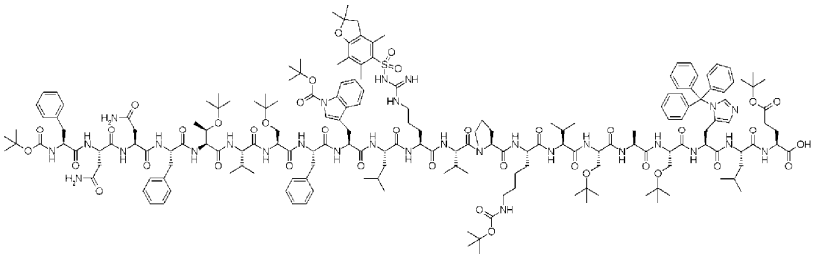
Условия анализа	Устройство	Колонка (длина, мм)	Подвижная фаза	Градиент (A/B)	Скорость потока (мл/мин)	Температура колонки (°C)	Длина волны
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Experss C18 (2,1×50)	A) 10 мМ AcONH4, H2O B) MeOH	95/5=>0/100 (1,0 мин)=>0/100 (0,4 мин)	1,0	35	210-400 нм, PDA, тотальное сканирование
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Experss C18 (2,1×50)	A) 10 мМ AcONH4, H2O B) MeOH	50/50=>0/100 (0,7 мин)=>0/100 (0,7 мин)	1,0	35	210-400 нм, PDA, тотальное сканирование
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Experss C18 (2,1×50)	A) 0,1% FA, H2O B) 0,1% FA, CH3CN	95/5=>0/100 (1,0 мин)=>0/100 (0,4 мин)	1,0	35	210-400 нм, PDA, тотальное сканирование
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Experss C18 (2,1×50)	A) 0,1% FA, H2O B) 0,1% FA, CH3CN	50/50=>0/100 (0,7 мин)=>0/100 (0,7 мин)	1,0	35	210-400 нм, PDA, тотальное сканирование

Таблица 2

Условия препаративного способа	Устройство	Колонка (длина, мм)	Подвижная фаза	Градиент (A/B)	Скорость потока (мл/мин)	Температура колонки (°C)	Длина волны
A	Система препаративной ВЭЖХ с инжекцией/фракционированием (Gilson, Inc)	Aldrich Ascentis RP-amide (21,2×150 мм, 5 мкм)	A) 0,1% FA, H2O B) 0,1% FA, MeCN	Изократический (A/B): 15/85	20,0	40	254, 258 нм
B	Система препара-тивной ВЭЖХ с инжекцией/фракцио-нированием (Gilson, Inc)	YMC Actus ODS-A (20×100 мм, 5 мкм)	A) 20 мМ AcONH4, H2O B) 20 мМ AcONH4, MeOH/MeCN (1/1)	Изократический (A/B): 47/53	20,0	40	254, 258 нм

(2-2-1) Синтез соединения 006 (Boc-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr(tBu)-Val-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Lue-Arg(Pbf)-Val-Pro-Lys (Boc)-Val-Ser (tBu)-Ala-Ser (tBu)-His (Trt)-Leu-Glu (tBu)-OH)

Соединение 6



Пептидный синтез проводили способом Fmoc с использованием устройства для синтеза пептидов (Multipep RS; Intavis). Все аминокислоты аминокислоты с Fmoc приобретали от WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. Подробное описание методики обработки представлено в руководстве, прилагаемом к устройству для синтеза.

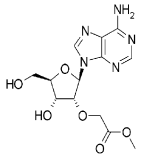
Fmoc-Glu(tBu)-OH, связанный на его C-конце с 2-хлортритилсмолой (250 мг/колонка, 30 колонок, 11,7 ммоль), раствор N,N-диметилформамида, содержащий различные Fmoc-аминокислоты (0,6 моль/л) и 1-гидрокси-7-азабензотриазолтриазол (0,375 моль/л), и раствор диизопропилкарбодиимида в N,N-диметилформамиде (10% об./об.) загружали в устройство для синтеза. Реакцию синтеза проводили с использованием в качестве раствора для удаления Fmoc раствора N,N-диметилформамида (20% об./об.), содержавшего пиперидинпиперидин и 5% (мас./об.) мочевину. После промывания смолы N,N-диметилформамидом проводили удаление защитной группы Fmoc, а затем проводили один цикл реакции конденсации с Fmoc-аминокислотом. Этот цикл повторяли для удлинения пептидов на поверхности смолы. После удлинения смолу промывали трифторэтанолом. Пептиды отщепляли от смолы добавлением трифторэтанола/дихлорметанэтана (=1/1). Таким образом, соединение получили соединение 006 (7,2 г) в виде неочищенного продукта.

LCMS(ESI)m/z=1185(M+3H)3+

Время удержания: 1,24 мин (условия анализа: SQDAA05) (2-2-2)

Синтез соединения 007

Соединение 7



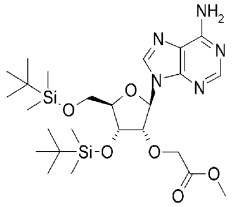
Суспензию аденозина (2,00 г, 7,48 ммоль) в N,N-диметилформамиде (40 мл) охлаждали до 0°C, и к ней добавляли 60% гидрид натрия (0,42 г, 10,48 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение одного часа при 0°C. После добавления метилбромацетата (0,76 мл, 8,01 ммоль), полученную реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч при комнатной температуре, и к ней добавляли уксусную кислоту (1 мл) и метанол (3 мл). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали нормально-фазовой хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол). Таким образом, было получено соединение 007 (0,93 г, 37%).

LCMS(ESI) m/z=340(M+H)+

Время удержания: 0,27 мин (условия анализа: SQDFA05) (2-2-3)

Синтез соединения 008

Соединение 8



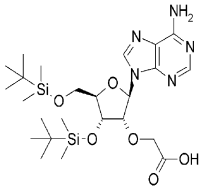
Трет-бутилдиметилсилилхлорид (999 мг, 6,63 моль) и имидазол (722 мг, 10,61 моль) добавляли к раствору соединения 007 (900 мг, 2,65 ммоль) в пиридине. Реакционную смесь перемешивали в течение четырех часов при комнатной температуре и экстрагировали этилацетатом/водой. Экстрагированный органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. После фильтрации органический слой концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол). Таким образом, было получено соединение 008 (1,17 г, 78%).

LCMS(ESI)m/z=568(M+H)+

Время удержания: 1,10 мин (условия анализа: SQDFA05) (2-2-4)

Синтез соединения 009

Соединение 9



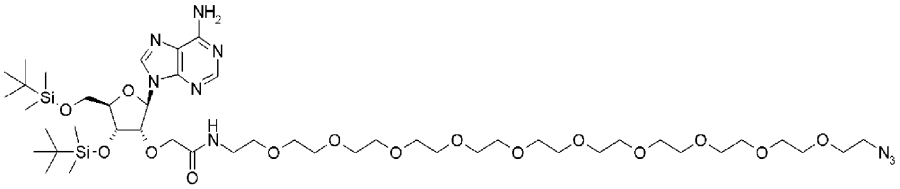
Гидроксид лития (61 мг, 2,5 моль), растворенный в воде (0,17 мл) добавляли к раствору соединения 008 (290 мг, 0,51 ммоль) в метаноле (0,34 мл)/тетрагидрофуране (0,34 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Смесь нейтрализовывали 1 М хлористоводородной кислотой и концентрировали при пониженном давлении. Концентрированный осадок экстрагировали этилацетатом/водой. Полученный органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. После фильтрации органический слой концентрировали при пониженном давлении. Таким образом, было получено соединение 009 (319 мг, 90%).

LCMS(ESI)m/z=552(M-H)-

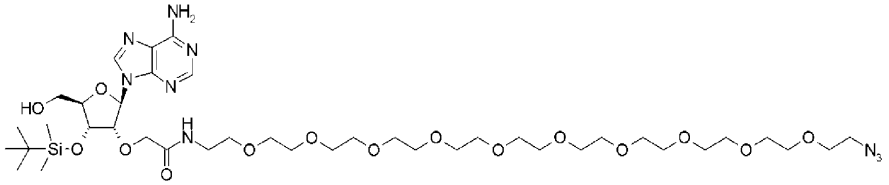
Время удержания: 0,97 мин (условия анализа: SQDFA05) (2-2-5)

Синтез соединений 010 и 011

Соединение 10



Соединение 11



1-гидроксибензотриазолтриазол (75 мг, 0,553 моль) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (106 мг, 0,553 моль) добавляли к раствору соединения 009 (255 мг, 0,460 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1,5 мл), и их перемешивали в течение 3 мин при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли O-(2-аминоэтил)-O'-2-азидоэтил) нонаэтиленгликоль (291 мг, 0,53 ммоль) и ее перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный осадок очищали обращено-фазовой хроматографией на силикагеле (10 мМ водный раствор ацетата аммония /метанол. Получали соединения 010 (177 мг, 42%) и 011 (72 мг, 19%).

Соединение 010

LCMS(ESI)m/z=1063(M+H)+

Время удержания: 0,98 мин (условия анализа: SQDFA05)

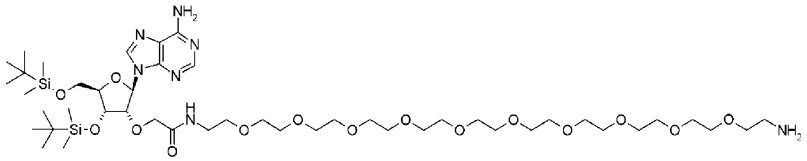
Соединение 011

LCMS(ESI)m/z=949(M+H)+

Время удержания: 0,67 мин (условия анализа, SQDFA05) (2-2-6)

Синтез соединения 012

Соединение 12



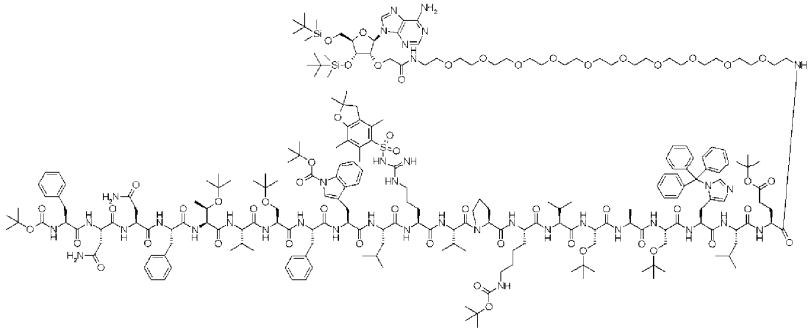
10% палладий на угле (34 мг) добавляли к раствору соединения 010 (170 мг, 0,160 ммоль) в этаноле (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч в атмосфере водорода и вновь добавляли к ней 10% палладий на угле (34 мг). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч в атмосфере водорода для завершения реакции. Фильтрат реакционного раствора концентрировали при пониженном давлении. Получили соединение 012 (34 мг, 95%).

LCMS(ESI)m/z=1037(M+H)+

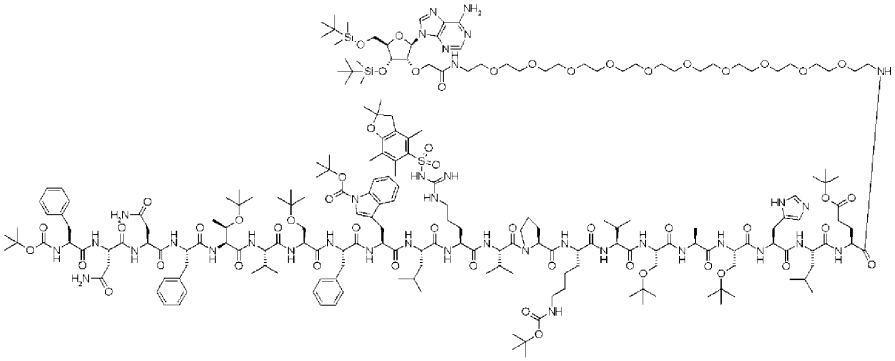
Время удержания: 0,70 мин (условия анализа: SQDFA05) (2-2-7)

Синтез соединений 013 и 014

Соединение 13



Соединение 14



Соединение 006 (354 мг, 0,110 ммоль), 1-гидроксибензотриазолтриазол (13 мг, 0,100 моль) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (19 мг, 0,100 моль) добавляли к раствору соединения 012 (86 мг, 0,083 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1,5 мл), и их перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Фильтрат реакционной смеси очищали с помощью условий препаративного анализа A, описанных в табл. 2. Получили смесь соединений 013 и 014 (72 мг).

Соединение 013

LCMS(ESI)m/z=1525(M+3H)3^+, 1144(M+4H)4^+

Время удержания: 1,13 мин (условия анализа: SQDAA50)

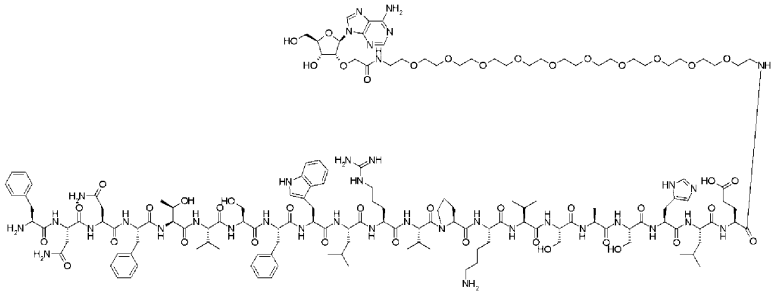
Соединение 014

LCMS(ESI)m/z=1444(M+3H)3^+, 1083(M+4H)4^+

Время удержания: 1,02 мин (условия анализа: SQDAA50) (2-2-8)

Синтез 2'-аденозин-PEG-пептида (конъюгат аденозин 2'-PEG-пептид или 2'-(PEG-пептид)аденозин) (соединение 015)

Соединение 15



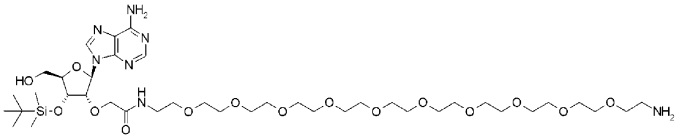
Трифторуксусную кислоту (16 мл), дихлорметан (8 мл), воду (1,3 мл) и тетраизопропилсилан (1,3 мл) добавляли к смеси соединений 013 и 014 (42 мг) и перемешивали в течение 6 ч при комнатной температуре. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали с использованием условий препаративного анализа B, описанных в табл. 2. Таким образом, получили соединение 015 (10 мг).

LCMS(ESI)m/z=1090(M+3H)3+, 818(M+4H)4+

Время удержания: 0,52 мин (условия анализа: SQDAA50) (2-2-9)

Синтез соединения 016

Соединение 16

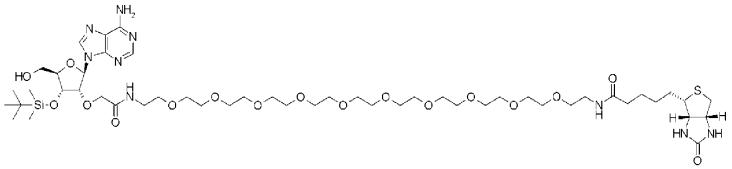


К раствору соединения 011 (70 мг, 0,074 ммоль) в этаноле (1 мл) добавляли 10% палладий на угле (34 мг) и реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч в атмосфере водорода. Фильтрат реакционной смеси концентрировали при пониженном давлении. Таким образом, получили соединение 016 (58 мг, 85%). LCMS(ESI)m/z=923(M+H)+

Время удержания: 0,50 мин (условия анализа: SQDFA05) (2-2-10)

Синтез соединения 017

Соединение 17



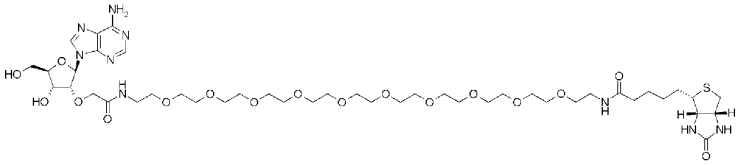
D-биотин-N-сукцинимидил (24 мг, 0,069 ммоль) и триэтиламин (13 мкл, 0,094 моль) добавляли к раствору соединения 016 (58 мг, 0,063 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1 мл) и перемешивали в течение двух часов при комнатной температуре. Затем после добавления D-биотин-N-сукцинимидила (5 мг, 0,015 ммоль) реакция завершалась через 1,5 ч при перемешивании при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали обращено-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (10 мМ водный раствор ацетата аммония/метанол). Получили соединение 017 (50 мг, 69%).

LCMS(ESI) m/z=1149(M+H)+

Время удержания: 1,04 мин (условия анализа: SQDFA05)

(2-2-11) Синтез 2'-аденозин-PEG-биотина (конъюгат аденозин 2'-PEG-биотин или 2'-(PEG-биотин) аденозин) (соединение 018)

Соединение 18



Раствор 1 М фторида тетра-н-бутиламмония в тетрагидрофуране (65 мкл, 0,065 ммоль) добавляли к раствору соединения 017 (62 мг, 0,054 ммоль) в тетрагидрофуране (2 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем добавляли 1 М раствор фторида тетра-н-бутиламмония в тетрагидрофуране (20 мкл, 0,020 ммоль) и реакцию завершали перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и осадок очищали обращено-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (0,11% водный раствор муравьиной кислоты/0,11% муравьиная кислота в ацетонитриле). Получили соединение 018 (12 мг, 21%).

LCMS(ESI)m/z=1035(M+H)+

Время удержания: 0,71 мин (условия анализа: SQDAA05)

Более того, также посредством той же реакции синтезировали 5'-аденозин-PEG-пептид и 5'-аденозин-PEG-биотин.

(2-3) Получение связывающих аденозин антител у животных и скрининга антител

Кроликов иммунизировали 2'-аденозин-PEG-пептидом и/или 5'-аденозин-PEG-пептидом общепринятым способом. Клетки-кандидаты с активностью связывания аденозина отбирали из суспензии клеток, полученной из крови иммунизированных кроликов, с использованием autoMACS Pro Separator и FACSAria (BD), которые используют активность связывания аденозин-PEG-биотина и экспрессию IgG у кролика в качестве показателей. Затем проводили скрининг с антителами, секретированными в культуральные супернатанты отобранных клеток. Во время скрининга проводили ELISA для оценки наличия активности связывания с аденозин-PEG-биотином. Также ELISA проводили для оценки того, подавляет ли аденозин при добавлении в комбинации с аденозин-PEG-биотином на уровне, в 1000 раз или более превышающем уровень аденозин-PEG-биотина, связывание аденозин-PEG-биотина. Вариабельные области H-цепи и L-цепи выделяли способом ПЦР из клеток, отобранных с использованием в качестве индикатора наличия активности связывания аденозин-PEG-биотина, а также подавления связывания с аденозин-PEG-биотином аденозином, добавленным в комбинации с аденозин-PEG-биотином. Полученные вариабельные области экспрессировались в комбинации с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи IgG1 человека.

Пример 3. Оценка клонов, полученных клонированием B-клеток кролика (3-1)

Оценка клонов, полученных клонированием B-клеток кролика, в отношении активности связывания с 2'-аденозин-PEG-биотином

Клоны, полученные клонированием B-клеток кролика, оценивали в отношении активности связывания с аденозином способом SPR. Реакцию антиген-антитело между клонами и 2'-аденозин-PEG-биотин кинетически анализировали с использованием Biacore 4000 (GE Healthcare). На сенсорный чип CM5 (GE Healthcare) иммобилизовывали соответствующее количество белка A/G (Invitrogen) способом присоединения аминов. Представляющие интерес антитела улавливали на чипе. Затем после взаимодействия 100 нмоль/л 2'-аденозин-PEG-биотина в качестве анализируемого соединения в течение 60 с проводили мониторинг и измерение диссоциации анализируемого соединения в течение 60 с. Использованный подвижный буфер представлял собой HBS-P+ (GE Healthcare). Все измерения проводили при 25°C. Анализируемое соединение разбавляли с использованием подвижного буфера.

Соответствующие антитела сравнивали в отношении активности связывания с 2'-аденозин-PEG-биотином с использованием в качестве индикатора величины (N связывание 100), полученной делением величины связывания при взаимодействии с 2'-аденозин-PEG-биотином на величину улавливания (RU) для каждого антитела, и величины (N_стабильность_100), полученной делением величины диссоциации 2'-аденозин-PEG-биотина от каждого антитела в течение 60 с после взаимодействия с 2'-аденозин-PEG-биотином на величину улавливания (RU) для каждого антитела. Что касается антител, для которых величина улавливания составляла 1500 RU или менее, их связывание не достаточно поддавалось обнаружению и, таким образом, они были исключены из исследуемых образцов. Результат представлен на фиг. 7. Результат, представленный на фиг. 7, демонстрирует, что способ клонирования B-клеток обеспечивал связывающие аденозин клоны с различной аффинностью.

(3-2) Оценка связывающих 2'-аденозин-PEG-биотин клонов в отношении их активность связывания с аденозином и ATP и анализ последовательности клонов

Клоны, для которых было продемонстрировано, что они связываются с 2'-аденозин-PEG-биотином, анализировали в отношении их связывания с аденозином и ATP способом SPR и конкурентного ELISA.

(3-2-1) Оценка с использованием SPR связывающих 2'-аденозин-PEG-биотин клонов в отношении их связывания с аденозином

С использованием Biacore T200 (GE Healthcare) антитело SMB0002, полученное способом клонирования B-клеток, анализировали в отношении взаимодействия с аденозином в реакции антиген-антитело. На сенсорный чип CM5 (GE Healthcare) иммобилизовывали соответствующее количество белка A (Invitrogen) способом присоединения аминов. Представляющие интерес антитела улавливали на чипе для обеспечения взаимодействия с аденозином в качестве антигена. Использованный подвижный буфер представлял собой 50 ммоль/л TrisHCl, 150 ммоль/л NaCl, 0,02% (мас./об.) Tween20, pH 7,6. Все измерения проводили при 25°C. Антигены разбавляли с использованием подвижного буфера.

Что касается SMB0002, разбавленные растворы антигена и подвижный буфер, который представляет собой пустой образец, загружали при скорости потока 30 мкл/мин в течение 75 с, чтобы позволить каждому из антигенов взаимодействовать с антителом, иммобилизованном на сенсорном чипе. Затем прогоняли подвижный буфер со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 4 мин и наблюдали диссоциацию антигена от антитела. Далее загружали 10 ммоль/л глицин-HCl, pH 1,5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с для регенерации сенсорного чипа.

Параметры кинетики, такие как константа скорости ассоциации ka

(1/Mc) и константа скорости диссоциации kd (1/c), вычисляли на основе сенсограмм, полученных

посредством измерений. Из этих констант вычисляли константу диссоциации KD (M). Каждый параметр вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Результат показал, что SMB0002 связывалось с аденозином. Клон оценивали в отношении его связывания при концентрациях аденозина 100 (в двух экземплярах), 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,13 нМ. Полученные сенсограммы обобщенно представлены на фиг. 8A. KD SMB0002 в отношении аденозина составляла $1,5\times10^{-8}$ (моль/л).

(3-2-2) Оценка клонов, связывающих 2'-аденозин-PEG-биотин, в отношении связывания ATP способом SPR

Biacore T200 (GE Healthcare) использовали для анализа взаимодействия в реакции антиген-антитело с ATP.

Представляющее интерес антитело улавливали с помощью белка A/G (Invitrogen), иммобилизованного в соответствующем количестве на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) способом присоединения аминов, и позволяли взаимодействовать ATP, который является антигеном.

Использованный подвижный буфер представлял собой 10 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4. Все измерения проводили при 25°C. Антиген разбавляли подвижным буфером.

Что касается SMB0002, разбавленные растворы антигена и подвижный буфер, который представляет собой пустой образец, загружали при скорости потока 20 мкл/мин в течение 2 мин, чтобы позволить каждому из антигенов взаимодействовать с антителом, уловленном на сенсорном чипе. Затем прогоняли подвижный буфер со скоростью потока 20 мкл/мин в течение 3 мин и наблюдали диссоциацию антигена от антитела. Далее загружали 10 ммоль/л глицин-HCl, pH 1,5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с для регенерации сенсорного чипа. Параметры кинетики, такие как константа скорости ассоциации ka (1/Mc) и константа скорости диссоциации kd (1/c), вычисляли на основе сенсограмм, полученных посредством измерений. Из этих констант вычисляли константу диссоциации KD (M). Каждый параметр вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Результат показал, что SMB0002 также связывалось с ATP. Каждый клон оценивали в отношении его связывания при концентрациях ATP 5000, 1250, 313, и 78,1 нМ. Полученные сенсограммы обобщенно представлены на фиг. 8A и 8B, SMB0002 связывалось как с аденозином, так и с ATP. KD SMB0002 в отношении аденозина составляла $1,5E^{-8}$ (моль/л) и KD SMB0002 в отношении ATP составляла $1,0E^{-5}$ (моль/л).

(3-2-3) Оценка связывающих 2'-аденозин-PEG-биотин клонов в отношении их связывания с аденозином и ATP в конкурентном ELISA

Антитела, для которых было показано связывание с 2'-аденозин-PEG-биотином, разбавляли до 1 мкг/мл посредством PBS и добавляли в каждую лунку 384-луночного MAXISorp (Nunc). Для иммобилизации антител планшету позволяли стоять в течение 1 ч или более при комнатной температуре. После удаления антител, разбавленных PBS, из каждой лунки, добавляли TBS, содержащий 1% BSA, и планшету позволяли стоять в течение одного часа или более. Затем TBS (pH 7,4), содержавший 1% BSA, удаляли из планшета. В планшет добавляли 2'-аденозин-PEG-биотин, разбавленный до 50 нМ посредством PBS, смесь 2'-аденозин-PEG-биотина и аденозин, разбавленный до 50 нМ и 500 мкМ соответственно посредством PBS, смесь 2'-аденозин-PEG-биотина и ATP, разбавленных до 50 нМ и 500 мкМ соответственно, с PBS или PBS отдельно. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение одного часа, а затем промывали три раза 80 мкл PBS, содержавшего 0,05% Tween-20. Затем в каждую лунку добавляли стрептавидин-HRP (Thermo fisher scientific), разбавленный в 20000 раз посредством PBS, и планшету позволяли стоять в течение одного часа или более при комнатной температуре. Планшет промывали три раза 80 мкл PBS, содержавшего 0,05% Tween-20, а затем в каждую лунку добавляли хромогенный субстрат (субстрат пероксидазы ABTS). Планшет инкубировали в течение 1 ч, а затем развитие окраски в растворе в каждой лунке оценивали путем измерения поглощения при 405 нм с использованием SpectraMax от Molecular Device.

Как показано на фиг. 9, результат показал, что связывание SMB0002 с 2'-аденозин-PEG-биотином ингибировалось добавлением избыточных количеств аденозина и ATP. Таким образом, было показано, что клоны антител связываются не только с 2'-аденозин-PEG-биотином, но также как с аденозином, так и с ATP.

(3-2-4) Анализ последовательности клона, связывающего аденозин и ATP

Аминокислотная последовательность клона SMB0002, который связывался как с аденозином, так и с ATP, показана в табл. 3.

Таблица 3

Название клона	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
SMB0002	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31

Пример 4. Конструирование библиотеки для получения антител с переключателями, представляющими собой AMP/ADP/ATP/аденозин, на основе всестороннего изменения с использованием антитела против ATP/аденозина

Известно, что аденозин и ATP присутствуют в высоких концентрациях в злокачественных тканях и в воспаленных тканях. Многие антитела, демонстрирующие способность связывать антиген только в присутствии ATP, получали из рационально сконструированной библиотеки, полученной с использованием ATP-связывающего антитела в качестве матрицы, как описано в справочном примере 2 ниже. Это позволило предположить, что антитела, демонстрирующие способность связывать антиген только в присутствии аденозина, AMP, ADP или ATP, можно было сходным образом получить путем конструирования библиотеки с использованием антитела, которое демонстрирует способность к связыванию аденозина, AMP, ADP или ATP, в качестве матрицы.

(4-1) Оценка связывания аденозинсвязывающего антитела SMB0002 с AMP и ADP способом SPR

SMB0002, экспрессированное и очищенное способом, описанным в справочном примере 1 ниже, анализировали в отношении связывания AMP способом, сходным со способом измерения с использованием Biacore, описанным в примере 3-2. Связывание SMB0002 оценивали при концентрациях AMP 500, 250 (в двух экземплярах), 125, 62,5, 31,25, 15,625 и 7,8125 мкМ. Полученные сенсограммы показаны на фиг. 10A. Как показано на фиг. 10A, наблюдали связывание SMB0002 с AMP. KD SMB0002 в отношении AMP составила $5{,}9\times10^{-5}$ (моль/л).

Связывание с ADP оценивали способом, сходным со способом измерения с использованием Biacore, описанным в примере 3-2, за исключением того, что концентрацию NaCl изменяли до 600 мМ. Связывание SMB0002 оценивали при концентрациях ADP 2000, 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 250, 125, 62,5 и 31,3 мкМ. Полученные сенсограммы показаны на фиг. 10B. Как показано на фиг. 10B, наблюдали связывание SMB0002 с ADP. KD SMB0002 в отношении ADP составила $2{,}4\times10^{-4}$ (моль/л).

(4-2) Рентгеноструктурный анализ аденозинсвязывающего антитела SMB0002

Трехмерную структуру комплекса аденозина и аденозин-связывающего антитела SMB0002, полученного из иммунизированных кроликов согласно примеру 3, определяли с использованием рентгеноструктурного анализа.

(4-2-1) Получение полноразмерного антитела SMB0002 для кристаллизации Полноразмерное антитело SMB0002 для кристаллизации получали и очищали способом, известным специалистам в данной области.

(4-2-2) Получение Fab-фрагментов SMB0002 из полноразмерного антитела

После концентрирования полученного полноразмерного антитела SMB0002 с использованием ультрафильтрационной мембраны с пороговым значением молекулярной массы (MWCO) 10000, образец приготавливали путем разбавления до 1,5 мг/мл посредством 4 мМ L-цистеина, 5 мМ EDTA, 25 мМ MES, pH 6,5. К образцу добавляли папаин (Roche Applied Science) в количестве 1/100 от полноразмерного антитела по массе и ему позволяли стоять при 35°C в течение 2 ч. Затем реакцию завершали добавлением 20 мл 25 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, в котором была растворена таблетка коктейля ингибиторов протеаз mini, без EDTA (Roche Applied Science). Далее этот образец загружали в 1-мл катионообменную колонку HiTrap SP HP (GE Healthcare), ниже которой была последовательно подсоединена колонка с белком A HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) размером 1 мл и которая была уравновешена 25 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,0. Элюирование проводили посредством линейного увеличения концентрации NaCl в буфере и получали очищенную фракцию Fab-фрагментов антитела SMB0002. Затем полученную очищенную фракцию концентрировали с использованием ультрафильтрационной мембраны с MWCO 5000 и загружали на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 16/60 препаративной категории (GE Healthcare), уравновешенную 25 мМ буфером HEPES, pH 7,0, 100 мМ NaCl. Колонку элюировали тем же буфером с получением Fab-фрагментов SMB0002 для кристаллизации. Все действия на колонке проводили при низкой температуре.

(4-2-3) Кристаллизация комплекса аденозина и Fab-фрагмента SMB0002

Образец SMB0002_Fab для кристаллизации, очищенный описанным выше способом, концентрировали с использованием ультрафильтрационной мембраны с MWCO 5000 до A280=22,3. Затем добавляли аденозин в конечной концентрации 0,9 мМ, и кристаллизацию проводили способом паровой диффузии с сидячей каплей. С использованием резервуарного раствора, состоявшего из 20% PEG3350 и 0,2 М двухосновного цитрата аммония, получали кристаллизационные капли путем смешения в соотношении резервуарный раствор: образец для кристаллизации=0,2 мкл:0,2 мкл с помощью Hydra II Plus One (MATRIX). Каплям позволяли стоять при 20°C, и были успешно получены плоские кристаллы.

(4-2-4) Измерение данных рентгенодиффракции кристалла комплекса Fab-фрагмента SMB0002 и аденозина

Полученный монокристалл комплекса Fab-фрагмента SMB0002 и аденозина погружали в раствор 0,2 М двухосновного цитрата аммония, 0,025 М HEPES, pH 7, 25% PEG3350, 0,1 М NaCl, 1 мМ аденозина и 16% глицерина. Затем монокристалл зачерпывали с раствором с использованием булавки с прикрепленной тонкой нейлоновой петлей и замораживали в жидком азоте. Данные рентгенодифракции получали на устройстве BL-17A установки с магнитотормозным излучением Photon Factory от High Energy Accelerator Research Organization. На протяжении измерения поддерживали замороженное состояние, помещая образец в поток газообразного азота при -178°C. Было собрано всего 300 рентгенограмм, полученных с использованием CCD-детектора Quantum 315r (ADSC), подсоединенного к линии пучка, посредством вращения кристалла на 0,6°. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку дифракционных данных из полученных рентгенограмм проводили с использованием программы Xia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190), XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) и Scala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82). В итоге, это успешно обеспечило данные об интенсивности дифракции при разрешении вплоть до 1,76 ангстрем. Этот кристалл относится к пространственной группе P1 с параметрами решетки a=49,960 ангстрем, b=105,730 ангстрем, c=106,166 ангстрем, α=62,58°, β=77,29°, γ=77,49°.

(4-2-5) Рентгеноструктурный анализ комплекса аденозина и Fab-фрагмента SMB0002

Для определения структуры кристалла комплекса Fab-фрагмента SMB0002 и аденозина проводили способ молекулярного замещения с использованием программы Phaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674). Из размера полученной кристаллической решетки и молекулярной массы Fab-фрагмента SMB0002 было оценено, что количество комплексов в асимметричном элементе равно четырем. Модель гомологию для антитела конструировали с использованием Discovery Studio 3.5 (Accelrys). Модель разделяли на вариабельную область и константную область, и с использованием координат каждой структуры в качестве модели для поиска, определяли их ориентацию и положение в кристаллической решетке на основе функции вращения и функции трансляции. Кроме того, кристаллографический фактор достоверности R для данных интенсивности дифракции при от 25 до 3,0 ангстрем составлял 46,36% и свободный R составлял 46,10%, когда проводили уточнение жесткого тела на полученной структурной модели, в которой части вариабельной области и константной области независимо перемещались. Затем, проводили уточнение структурной модели путем повторения следующих процессов: уточнение структуры с использованием программы REFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-367), и пересмотр структурной модели, полученной с использованием программы Coot (Acta Cryst. (2010) D66, 486-501), ссылаясь на карты электронной плотности, имеющие в качестве коэффициентов 2Fo-Fc и Fo-Fc, которые вычисляли на основе экспериментально определенного структурного фактора Fo, структурного фактора Fc, которые были вычислены из этой модели, и фазы, вычисленной из этой модели. В конечном итоге, с использованием 168160 данных об интенсивности дифракции при разрешении от 25 до 1,76 ангстрем, кристаллографический фактор достоверности R и свободный R структурной модели, содержавшей 14681 неводородных атома, составили 19,82 и 23,15% соответственно.

(4-2-6) Идентификация участков взаимодействия SMB0002 и аденозина

В конечном итоге, кристаллографическая структура комплекса Fab-фрагмента SMB0002 и аденозина была определена при разрешении 1,76 ангстрем. В асимметричном элементе кристалла было четыре Fab-фрагмента SMB0002, аденозин был связан со всеми из них и характер связывания был практически одинаковым для всех из них. Кристаллографическая структура продемонстрировала, что аденозин связывался с карманом, образованным между H-цепью и L-цепью Fab-фрагмента антитела, так, что адениновой кольцо было ориентировано вглубь кармана. Как показано на фиг. 11A, часть в виде аденинового кольца распознается каждой из боковых цепей A33, I50, W58 и Y100 H-цепи и Y95c и N96 L-цепи, а также каждой из боковых цепей G99 и T100a H-цепи антитела. Было выявлено, что стабильное распознавание достигалось, в частности, посредством образования двух водородных связей между боковой цепью N96 L-цепи и как N в положении 1, так и NH2 в положении 6 аденозина, а также посредством образования водородных связей между кислородом карбонила основной цепи и NH-группой амида T100a H-цепи и NH2 в положении 6 и N в положении 7 аденинового кольца, соответственно. Более того, адениновое кольцо окружено каждой из боковых цепей A33, I50, W58, Y100 H-цепи и Y95c L-цепи антитела и формирует ван-дер-ваальсовы взаимодействия и взаимодействия CH-π с этими остатками остатки. Как G99, так и T100a H-цепи формируют взаимодействие с адениновым кольцом в их частях основной цепи. Однако, поскольку G99 имеет угловую характеристику ϕ-ψ Gly на графике Рамачандрана, полагают, что он является важным для поддержания структуры петли CDR3 H-цепи при связывании с аденозином. Более того, также полагают, что боковая цепь T100a играет важную роль в поддержании структуры петли CDR3 H-цепи при связывании с аденозином посредством взаимодействия с другими остатками в CDR3 H-цепи. Как показано на фиг. 11B, рибозная часть аденозина распознается соответствующими боковыми цепями S56 и W58 H-цепи и Y95c L-цепи, а также основной цепью T57 и G52 H-цепи. Взаимодействие с этими остатками в основном объясняется ван-дер-ваальсовым взаимодействием; однако наблюдают образование водородной связи, хотя и слабое, между боковой цепью S56 H-цепи и 3'-OH рибозы. G52 H-цепи, включая его Cα-атом, образует множественные ван-дер-ваальсовы взаимодействия с рибозной ча-

стью, и полагают, что он играет важную роль в распознавании аденозина. Между тем, T57 H-цепи взаимодействует с рибозной частью только в его основной цепи, и боковая часть не прямо вовлечена в связывание.

Как показано в примере 4-1, антитело связывается не только с аденозином, но также и с AMP, хотя и со сниженной активностью связывания. В кристаллографической структуре 5'-OH рибозы в аденозине осуществляет внутримолекулярное взаимодействие с N в положении 3 части аденинового кольца; однако это связывание не может осуществляться в AMP и положение 5'-0 немного изменяется, так что в результате предполагается, что фосфатная группа AMP находится в области, указанной пунктирной линией на фиг. 11B. Поскольку эта область находится в положении, которое позволяет взаимодействие с остатками в H-цепи CDR2 и L-цепи CDR3, можно ожидать, что связывание с AMP будет увеличено посредством внесения соответствующих мутаций в CDR2 H-цепи и CDR3 L-цепи.

Из результатов, описанных выше, был установлен способ распознавания аденозина антителом и были идентифицированы аминокислотные остатки вариабельной области антитела, которые в значительной степени вовлечены в связывание аденозина. Аминокислотные остатки, которые в значительной степени вовлечены в связывание аденозина, включают: A33, I50, G52, S56, T57, W58, G99, Y100 и T100a (нумерация Kabat) в H-цепи, и Y95c и N96 (нумерация Kabat) в L-цепи. Более того, спрогнозированные остатки, которые возможно расположены вблизи 5'-фосфатной группы в AMP, представляли собой: D54, S55, S56, T57 и W58 CDR2 H-цепи, и G95a, W95b и Y95c CDR3 L-цепи. Модификация этих остатков может приводить к увеличению связывания с AMP.

Более того, с использованием сходных соображений для ADP и ATP, исходя из кристаллографических структур, были спрогнозированы модификации, которые могут повысить связывание с ADP и ATP.

(4-3) Гуманизация происходящего из кролика антитела SMB0002 SMB0002 представляет собой происходящее из кролика антитело; таким образом, для конструирования библиотеки антител человека последовательность гуманизировали способом, известным специалистам в данной области (публикация патента EP № 239400; международные публикации № WO 1996/002576; WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735; WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388; Cancer Res., (1993) 53, 851-856; BBRC., (2013) 436 (3): 543-50 и т.д.).

Гуманизированное SMB0002 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи: SEQ ID NO: 85; последовательность вариабельной области легкой цепи: SEQ ID NO: 86) экспрессировали и очищали способом, описанным в справочном примере 1-1. Связывание гуманизированного SMB0002 с аденозином и AMP измеряли и анализировали способом с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Белку A (Invitrogen), иммобилизованному в соответствующем количестве на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) способом присоединения аминов позволяли улавливать представляющее интерес антитело и наблюдали взаимодействие с антигеном аденозином, AMP, ADP или ATP. Использованный подвижный буфер представлял собой 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,02% (мас./об.) Tween 20, pH 7,6, для аденозина и AMP, и 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,02% (масс./об.) Tween 20, 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,6, для ADP и ATP. Все измерения проводили при 25°C. Антигены разбавляли подвижным буфером.

Разбавленные растворы антигена и подвижный буфер в качестве пустого образца добавляли при скорости потока 30 мкл/мин в течение 75 с к антителу, иммобилизованному на сенсорном чипе, и наблюдали связывание между антителом и антигенами. Затем подвижный буфер прогоняли при скорости потока 30 мкл/мин в течение 5 мин и наблюдали диссоциацию антигенов от антитела. Далее добавляли 10 мМ глицин-HCl, pH 1,5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 с для регенерации сенсорного чипа. Исходя из сенсограмм, полученных во время измерений, вычисляли параметры кинетики, такие как константа скорости ассоциации ka (1/Mc) и константа скорости диссоциации kd (1/c). Из этих констант вычисляли константу диссоциации KD (M). Каждый параметр вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Результат показал, что гуманизированное SMB0002 связывалось с аденозином, AMP, ADP и ATP. Сенсограммы, полученные, когда образцы с концентрациями аденозина 200, 100, 50 (в двух экземплярах), 25, 12,5, 6,25 и 3,125 нМ взаимодействовали с клоном, обобщенно представлены на фиг. 12. KD гуманизированного SMB0002 в отношении аденозина составляла $7{,}5\times10^{-9}$ M. Далее, сенсограммы, полученные когда образцы с концентрациями AMP 500, 250, 125 (в двух экземплярах), 62,5, 31,3, 15,6 и 7,8 мкМ взаимодействовали с клоном, обобщенно представлены на фиг. 13. KD гуманизированного SMB0002 в отношении AMP составляла $3{,}5\times10^{-5}$ M.

Далее сенсограммы, полученные, когда образцы с концентрациями ADP 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 125 и 62,5 мкМ взаимодействовали с клоном, обобщенно представлены на фиг. 14. KD гуманизированного SMB0002 в отношении ADP составила $7{,}9\times10^{-5}$ M. Наконец, сенсограммы, полученные, когда образцы с концентрациями ATP 1000 (в двух экземплярах), 500, 250, 125 и 62,5 мкМ взаимодействовали с клоном, обобщенно представлены на фиг. 15. KD гуманизированного SMB0002 в отношении ATP составила $1{,}4\times10^{-4}$ M. Поскольку гуманизированное SMB0002 имело активность связывания в отношении аденозина, AMP, ADP, и ATP, последовательность использовали в качестве матричной последовательно-

сти для конструирования библиотеки антител человека.

(4-4) Оценка всесторонних вариантов для конструирования библиотеки на основе результата рентгеноструктурного анализа

Кристаллографическую структуру комплекса аденозина и аденозин-связывающего антитела SMB0002 анализировали согласно примеру (4-2). Способ распознавания, посредством которого антитело распознает аденозин (и AMP), и аминокислотные остатки вариабельной области антитела, которые предположительно не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина (и AMP), устанавливали, исходя из результата кристаллографического анализа структуры. Было предположено, что посредством всесторонней оценки вариантов, остатки которых, расположенные вблизи участка распознавания аденозина, заменены каждой из аминокислот, можно было определить участки, которые могут быть преобразованы в библиотеку, и аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку. В частности, было предположено, что, посредством оценки участков, которые не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина, AMP, ADP или ATP, участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от участков нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с аденозином, AMP, ADP или ATP (не сводят связывание к нулю), а также можно определить аминокислотные участки, которые могут быть преобразованы в библиотеку, и аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку. Несколько вариантов было получено путем внесения модификаций в эти остатки в гуманизированном SMB0002, полученном согласно примеру (4-3).

Среди участков тяжелой цепи, модифицированные участки (участки, показанные согласно нумерации Kabat и указанные как "Kabat" в табл.), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице), и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 4.

Таблица 4

		HCDR1		HCDR2									HCDR3										
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
	Нативная последова-тельность	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	G	Y	T	N	A	F	D	P
Измененная аминокислота	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			A	A
	D	D	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D						D
	E	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E	E	E	E	E	E					E	E
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F					F	F
	G	G	G	G	G	G	G	G	G		G		G	G	G		G	G	G	G	G	G	G
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H			H	H	H	H	H					H	H
	I	I	I	I	I	I	I	I	I			I	I	I	I	I	I					I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		K	K	K	K	K	K					K	K
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L	L	L					L	L
	N		N				N	N		N		N	N	N	N		N					N	N
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			P	P	P	P	P					P	
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q				Q	Q	Q
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R					R	R
	S	S	S	S	S			S	S				S	S	S	S	S	S	S			S	S
	T	T	T	T	T	T	T		T	T		T	T	T	T	T	T		T			T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V		V	V	V				V	V
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W					W	W
	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y		Y			Y	Y	Y	Y						Y	Y

Среди участков в легкой цепи, модифицированные участки (участки, показанные согласно нумерации Kabat и указанные как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице), и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 5.

Таблица 5

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	Нативная последова-тельность	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
Измененная аминокислота	A	A	A	A		A	A	A	A	A
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	G	G	G	G	G	G	G		G	G
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	N	N					N	N	N	N
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S			S	S
	T	T	T	T	T	T	T		T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	W		W	W	W	W	W	W		W
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	

Связывание каждого варианта, экспрессированного и очищенного способом, описанном в справочном примере 1, описанном ниже, с аденозином и AMP измеряли способом с использованием Biacore, описанным в примере 4-3, за исключением того, что концентрация $MgCl_2$ составляла 2 мМ. В результате измерений аффинность каждого варианта в отношении аденозина и AMP вычисляли в качестве величины KD. Результат сравнения величин KD в отношении аденозина между каждым вариантом тяжелой цепи и родительской последовательностью, гуманизированным SMB0002, показан в табл. 6, и результат сравнения величин KD для AMP показан в табл. 7. Результат сравнения величин KD в отношении аденозина каждого варианта легкой цепи и гуманизированного SMB0002 показан в табл. 8, и результат сравнения величин KD в отношении AMP показан в табл.9.

Таблица 6

		HCDR1		HCDR2									HCDR3										
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
	Нативная последова-тельность	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	G	Y	T	N	A	F	D	P
Измененная аминокислота	A	0,9	0,1		0,0	0,5	0,4	0,3	0,9	1,0	0,7	0,8	0,5	0,3	0,7	0,4	0,0	0,2	0,1			0,7	0,2
	D	0,6	0,1	0,5		0,5	0,4	0,2	0,7	0,0	1,0	0,7	0,2	0,3	0,4	0,4	0,0						0,3
	E	0,7	0,1	0,5	0,3	0,5	0,4	0,2	0,8		0,9	0,7	1,0	0,3	0,5	0,2	0,0					0,6	0,2
	F	0,7	0,7	0,2	0,5	0,5	0,2	0,2	0,6	1,1	0,8	0,9	1,6		0,6	0,1	0,9					0,5	0,1
	G	0,5	0,3	0,8	0,3	0,6	0,3	0,2	0,7		0,9		0,7	0,2	0,4		0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,6	0,2
	H	0,4	0,7	0,2	0,3	0,6	0,3	0,2	0,9	0,6			0,7	0,5	0,6	0,2	0,2					0,6	0,1
	I	1,1	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,7			0,7	0,2	0,4	0,9	0,1	0,0					0,5	0,2
	K	0,9	0,5	0,8	0,1	0,3	0,4	0,2	0,6	0,5		0,7	0,9	0,4	0,7	0,1	0,0					0,6	0,2
	L	0,9	0,2	0,2	0,4	0,3	0,6	0,2	0,6	0,6		0,7	0,6	0,3	0,7	0,1	0,0					0,5	0,1
	N		0,5				0,3	0,2		0,8		0,7	0,4	0,4	0,6		0,0					0,5	0,3
	P	0,3	1,6	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,8			0,0	0,1	0,8	0,1	0,0					0,0	
	Q	1,2	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,7	1,1		0,8	0,6	0,4	0,8	0,1	0,0				0,1	0,5	0,2
	R	0,8	0,8	0,5	0,7	0,4	0,5	0,3	0,6	0,9		0,8		0,3	0,9	0,1	0,0					0,4	0,2
	S	1,0	0,2	0,3	0,4			0,3	0,9				0,6	0,3	0,9	0,3	0,0	0,2	0,1			0,7	0,2
	T	1,0	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5		0,6	1,1		0,6	0,9	0,3	0,6	0,1	0,0		0,1			0,4	0,1
	V	0,6	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,5	0,6	1,0		0,6	0,4	0,4		0,0	0,0	0,5				0,4	0,1
	W	0,6	0,4	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,5	0,9		0,7	0,9	0,5	0,5	0,0	0,1					0,5	0,1
	Y	0,7		0,2	0,2	0,3	0,2	0,2		1,0			0,9	0,4	0,5	0,1						0,6	0,1

Таблица 7

		HCDR1		HCDR2									HCDR3										
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
	Нативная последова-тельность	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	G	Y	T	N	A	F	D	P
Измененная аминокислота	A	0,9	0,3		0,0	0,9	1,1	0,4	1,0	1,3	0,9	0,9	0,6	0,3	0,7	0,1	0,0	0,1	0,0			2,5	0,2
	D	0,6	0,2	2,1		0,8	0,9	0,3	0,7	0,0	1,0	1,0	0,2	0,3	0,4	0,1	0,0						0,5
	E	1,1	0,2	1,6	1,2	0,6	0,8	0,2	1,0		0,9	1,1	1,0	0,3	0,6	0,2	0,0					1,0	0,2
	F	1,1	1,1	0,3	0,8	0,6	0,2	0,2	0,9	1,3	1,0	1,1	2,0		0,7	0,1	1,3					0,8	0,2
	G	0,6	0,3	2,0	1,0	0,8	0,6	0,3	0,8		1,2		0,8	0,3	0,4		0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,7	0,3
	H	1,1	0,9	0,2	1,1	1,0	0,6	0,2	1,1	1,3			0,8	0,9	0,8	0,1	0,1					1,1	0,2
	I	1,3	0,5	0,7	0,3	0,4	0,3	0,3	0,7			0,8	0,3	0,5	1,0	0,0	0,0					0,8	0,2
	K	1,0	1,4	2,7	0,0	0,6	0,9	0,4	0,8	1,2		0,9	1,3	0,6	0,8	0,1	0,0					0,9	0,3
	L	1,1	0,3	0,5	0,7	0,6	0,9	0,4	0,7	1,2		0,9	0,8	0,3	0,9	0,1	0,0					0,7	0,2
	N		0,8				0,7	0,3		1,6		0,8	0,5	0,4	0,7		0,0					0,8	0,4
	P	0,3	3,2	0,6	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	1,2			0,0	0,1	0,8	0,1	0,0					0,0	
	Q	1,2	0,3	1,2	0,8	0,5	0,6	0,6	0,9	1,6		0,7	0,7	0,4	0,9	0,1	0,0				0,0	0,7	0,3
	R	1,2	1,4	1,2	0,0	0,6	1,2	0,4	0,9	1,2		0,8		0,4	1,0	0,1	0,0					0,7	0,3
	S	1,3	0,3	0,7	1,0			0,4	1,0				1,0	0,6	0,8	0,1	0,0	0,2	0,0			0,8	0,3
	T	1,6	0,4	0,9	1,5	0,7	1,1		1,0	1,2		0,9	1,3	0,5	0,8	0,0	0,0		0,0			0,6	0,2
	V	1,5	0,6	0,6	0,4	0,4	0,3	0,6	0,8	1,3		0,8	0,6	0,3		0,0	0,0	0,5				0,5	0,2
	W	1,4	1,2	0,0	0,4	0,0	0,1	0,2	1,1	1,1		0,7	1,1	0,5	0,1	0,0	0,0					0,8	0,2
	Y	1,3		0,4	0,4	0,3	0,2	0,2		1,1			1,0	0,5	0,1	0,0						0,9	0,2

Таблица 8

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	Нативная последова-тельность	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
Измененная аминокислота	A	0,3	0,7	0,2		0,9	0,7	0,5	0,7	0,1
	D	0,1	0,7	0,1	0,4	1,0	0,6	0,5	0,4	0,1
	E	0,1	0,7	0,2	0,4	0,7	0,7	0,5	0,6	0,1
	F	0,8	0,4	0,7	0,6	0,7	0,4	0,4	0,5	0,6
	G	0,1	0,7	0,2	0,3	1,1	0,9		0,7	0,1
	H	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7	0,8	1,0	0,8	0,3
	I	0,1	0,4	0,0	0,1	0,6	0,8	0,5	0,7	0,2
	K	0,3	0,6	0,1	0,0	0,8	0,7	0,5	0,5	0,5
	L	0,2	0,6	0,1	0,7	0,6	0,8	0,6	0,5	1,0
	N	0,3					0,5	1,0	0,5	0,6
	P	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,6	0,3	0,4	0,1
	Q	0,1	0,8	0,1	0,8	0,6	0,6	0,7	0,8	0,0
	R	0,2	0,7	0,1	1,3	0,6	0,6	0,8	1,1	0,2
	S	0,6	0,7	0,2	0,5	0,9			0,8	0,1
	T	0,5	0,4	0,1	0,7	0,7	0,7		0,9	0,1
	V	0,6	0,4	0,0	0,5	0,4	0,7	0,6	0,7	0,2
	W		0,6	0,1	0,0	0,7	0,5	0,5		0,1
	Y	0,7	0,7		0,8	0,7	0,3	0,3	1,0	

Таблица 9

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	Нативная последовательность	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
Измененная аминокислота	A	0,4	0,8	0,2		1,3	1,4	0,8	1,2	0,2
	D	0,1	1,0	0,1	0,8	1,2	1,2	0,8	1,0	0,1
	E	0,1	1,0	0,2	0,8	1,2	0,9	1,0	1,2	0,0
	F	0,9	0,6	0,9	1,0	1,3	0,3	1,1	0,9	1,1
	G	0,1	1,2	0,2	0,5	1,5	1,8		1,0	0,1
	H	0,9	0,9	0,5	1,2	1,1	1,0	0,8	1,0	0,7
	I	0,2	0,6	0,1	0,1	0,9	0,8	0,5	0,9	0,3
	K	0,4	1,0	0,1	0,0	1,1	0,7	0,6	1,5	2,2
	L	0,3	1,2	0,1	0,9	1,3	1,8	1,4	1,3	1,9
	N	0,4					1,0	0,7	1,1	1,9
	P	0,1	0,5	0,1	0,0	0,5	1,4	0,4	0,8	0,3
	Q	0,1	1,0	0,1	1,3	1,5	1,2	1,0	1,4	0,0
	R	0,2	1,0	0,1	2,5	1,0	0,9	1,0	2,2	0,4
	S	0,5	1,0	0,3	1,0	1,6			1,6	0,1
	T	0,5	0,6	0,1	1,2	1,0	1,1		1,4	0,1
	V	0,5	0,8	0,0	0,8	0,6	1,0	0,5	1,2	0,4
	W		1,0	0,2	0,0	0,8	0,7	1,0		0,1
	Y	1,0	0,9		1,3	1,4	0,5	0,4	0,9	

(4-5) Конструирование библиотеки на основе всесторонней оценки вариантов

Для конструирования библиотеки участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из условий, показанных ниже, выбирали в качестве участков для конструирования библиотеки, исходя из информации, полученной, как описано в примере 4-4.

Условие 1:

Участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина, AMP, ADP или ATP, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от аминокислот нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с аденозином, AMP, ADP или ATP (не сводят связывание к нулю);

Условие 2:

Участки, имеющие определенный уровень разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антитела; и

Условие 3: участки, которые не являются важными для формирования канонических структур.

Из результатов оценки примера (4-4), участки, для которых существует по меньшей мере один или несколько вариантов, которые имеют величины KD в отношении аденозина и AMP, в обоих случаях указывающих более чем на 20% связывание относительно родительской последовательности (гуманизированное SMB0002) с аденозином и AMP, считали поддающимися модификации участками, которые удовлетворяют описанным выше условиям. Среди аминокислот, замещенных в этих участках, аминокислоты, величины KD которых в отношении как аденозина, так и AMP, указывают более чем на 2 0%, связывание относительно родительской последовательности (гуманизированное SMB0002) с аденозином и AMP, считали аминокислотами, подходящими для конструирования библиотеки (нестрогие остатки, появление которых в библиотеке можно обеспечить). Библиотеку для получения антител с переключателем в виде ATP/AMP/ADP/аденозин конструируют путем создания библиотеки, в которой по меньшей мере любые одна или несколько аминокислот из аминокислот, содержащихся в репертуаре аминокислот, который включает аминокислоты, подходящие для конструирования библиотеки, отобранные с помощью описанного выше анализа вариантов (нестрогие, появление которых в библиотеке можно обеспечить) и аминокислоты немодифицированного антитела (т.е. аминокислоты, включенные в нативную последовательность гуманизированного SMB0002), появляются в определенных поддающихся модификации участках в CDR гуманизированного SMB0002. Участки, содержащие репертуар аминокислот в тяжелой цепи, и репертуары аминокислот в этих участках показаны в табл. 10. Участки, содержащие репертуар аминокислот в легкой цепи, и репертуары аминокислот в этих участках показаны в табл. 11. В таблицах участки, показанные согласно нумерации Kabat, указанные как "Kabat", соответствуют поддающимся модификации участкам; аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" соответствуют немодифицированным аминокислотам в этих участках; и аминокислоты, указанные как "аминокислоты, подходящие для конструирования библиотеки" соответствуют аминокислотам, подходящим для конструирования библиотеки, в этих участках. Конструировали библиотеку, в которой, по меньшей мере, любая

аминокислота из аминокислот, содержащихся в выбранном репертуаре аминокислот, появляется в каждом из поддающихся модификации участков.

Таблица 10

		HCDR1		HCDR2									HCDR3						
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	100	100a	101	102
	Нативная последовательность	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	Y	T	D	P
Измененная аминокислота	A	A				A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			A	
	D	D		D		D	D		D		D	D	D	D	D				D
	E	E		E	E	E	E		E		E	E	E	E	E			E	
	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F		F	F		F	
	G	G	G	G	G	G	G		G		G		G	G	G			G	
	H	H	H		H	H	H		H	H			H	H	H			H	
	I K	I K	I K	I K	I	I K	I K	I K	I K	 K		I K	 K	I K	I K			I K	
	L	L		L	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L			L	
	N		N				N	N		N		N	N	N	N			N	N
	P	P	P	P						P					P				
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q			Q	
	R	R	R	R		R	R	R	R	R		R		R	R			R	
	S	S		S	S			S	S				S	S	S		S	S	
	T	T	T	T	T	T	T		T	T		T	T	T	T			T	
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V			V	V	
	W	W	W						W	W		W	W	W				W	
	Y	Y		Y	Y	Y				Y			Y	Y				Y	

Таблица 11

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	Нативная последовательность	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
Измененная аминокислота	A	A	A	A		A	A	A	A	
	D		D	D	D	D	D	D	D	
	E		E		E	E	E	E	E	
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	G		G	G	G	G	G		G	
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I		I			I	I	I	I	
	K	K	K			K	K	K	K	K
	L		L		L	L	L	L	L	L
	N	N					N	N	N	N
	P		P			P	P	P	P	
	Q		Q		Q	Q	Q	Q	Q	
	R		R		R	R	R	R	R	
	S	S	S		S	S			S	
	T	T	T		T	T	T		T	
	V	V	V		V	V	V	V	V	V
	W		W			W	W	W		
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	

Гены, содержащие каждую из последовательностей, включенных в библиотеку, сконструированную таким способом, синтезируют, и с использованием коллекции (библиотеки) этих индивидуальных генов в качестве матрицы библиотеку генов амплифицируют посредством праймеров, которые могут амплифицировать каждую из VH и VL. Амплифицированная библиотека генов рационально сконструированных вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека и вариабельных областей легкой цепи антитела человека вносят в соответствующие фагмидные векторы, имеющие как происходящую из IgG человека последовательность CH1, так и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи.

Рационально сконструированную библиотеку, которая позволяет получить антитела, которые связываются с антигенами с использованием аденозина, AMP, ADP или ATP, в качестве переключателя, конструируют путем введения этих фагмидных векторов в Escherichia coli посредством электропорации, а затем представления Fab-доменов, состоящих из вариабельной области-константной области антитела человека. Полагают, что такая рационально сконструированная библиотека, состоящая из разнообразных H-цепей и L-цепей, обладающих активностью связывания с аденозином, AMP, ADP или ATP, будет при-

годной в качестве библиотеки, содержащей антитела человека, которая позволяет эффективно получать антитела с AMP/ADP/ATP/аденозином в качестве переключатели против произвольных антигенов, где аденозин, AMP, ADP или ATP располагаются между антителом и антигеном, как показано на фиг. 43. Более того, поскольку, как описано выше, SMB0002 связывается не только с аденозином и AMP, но также и с ADP и ATP, также спрогнозировано, что оно обладает активностью связывания с cAMP и ATP-гамма-S, которые структурно сходны с AMP, ADP, ATP и аденозином. Таким образом, библиотеку считают пригодной для получения антител с переключателями, активность связывания которых в отношении произвольного антигена-мишени варьируется в зависимости от присутствия или отсутствия любого из низкомолекулярных соединений из ATP, ADP, AMP, cAMP, аденозина и ATP-гамма-S.

Пример 5. Конструирование библиотеки для получения антител с AMP/ADP/ATP/аденозином в качестве переключателей посредством пэннинга с молекулами, действующими в качестве переключателя

Способ, который вовлекает конструирование участков библиотеки посредством всестороннего изменения и конструирования библиотеки с использованием в качестве матрицы антитела, демонстрирующий способность к связыванию аденозина, AMP, ADP или ATP, описан в примере 4. В качестве другого подхода, способ с использованием пэннинга на молекулах, которые действуют в качестве переключателя, также является пригодным в качестве способа получения библиотеки.

(5-1) Рентгеноструктурный анализ аденозинсвязывающего антитела SMB0002

Кристаллографическую структуру комплекса аденозина и аденозин-связывающего антитела SMB0002 определяли, как описано в примере 4-2. Способ распознавания, посредством которого антитело распознает аденозин (и AMP), и аминокислотные остатки вариабельной области антитела, которые предположительно не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина (и AMP), определяли, исходя из результата кристаллографического анализа структуры.

SMB0002 представляет собой происходящее из кролика антитело; таким образом, для конструирования библиотеки антител человека последовательность гуманизировали способом, известным специалистам в данной области (как описано выше).

Для конструирования библиотеки в качестве участков, подходящих для конструирования библиотеки, выбирали участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из следующих условий.

Условие 1: участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина, AMP, ADP или ATP, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от аминокислот нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с аденозином, AMP, ADP или ATP (не сводят связывание к нулю);

Условие 2: участки, имеющие определенный уровень разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антитела; и

Условие 3: участки, которые не являются важными для формирования канонических структур.

Сначала конструируют библиотеку, в которой встречаемость нуклеотидов для аминокислот в участках в CDR1, CDR2 или CDR3 среди участков, содержащихся в последовательности гуманизированного SMB0002 и удовлетворяющих описанным выше условиям, в тяжелой цепи, и которые не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина, AMP, ADP или ATP, ограничивается только конкретными нуклеотидами. Примеры включают библиотеки NNK и TRIM (Gonzalez-Munoz A. et al. MAbs 2012; Lee CV et al. J Mol Biol. 2004; Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000; Tiller T et al. MAbs 2013). Гены коллекции сконструированных последовательностей генов синтезируют (библиотека вариабельных областей тяжелой цепи), комбинируют с последовательностью вариабельной области легкой цепи гуманизированного SMB0002 (родительская последовательность, SEQ ID NO: 86) и вносят в соответствующие фагмидные векторы, имеющие последовательность CH1, происходящую из IgG человека и последовательность константной области легкой цепи, происходящую из IgG человека. Эти фагмидные векторы вводят в Escherichia coll посредством электропорации для конструирования библиотеки фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека, способных связываться с антигенами, с использованием любого из аденозина, AMP, ADP и ATP в качестве переключателя.

Затем конструируют библиотеку, в которой встречаемость нуклеотидов для аминокислот в участках CDR1, CDR2 или CDR3 среди участков, содержащихся в последовательности гуманизированного SMB0002 и удовлетворяющих описанных выше условиям в легкой цепи, и которые не вовлечены в значительной степени в связывание аденозина, AMP, ADP или ATP, ограничивается только конкретными нуклеотидами. Примеры включают библиотеки NNK и TRIM. Гены коллекции сконструированных последовательностей генов синтезируют (библиотека вариабельных областей легкой цепи), комбинируют с последовательностью вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного SMB0002 (родительская последовательность, SEQ ID NO: 85) и вносят в соответствующие фагмидные векторы, имеющие последовательность CH1, происходящую из IgG человека и последовательность константной области легкой цепи, происходящую из IgG человека. Эти фагмидные векторы вводят в Escherichia coli посредством электропорации для конструирования библиотеки фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека, способных связываться с антигенами, с использованием любого из аденозина, AMP, ADP и ATP в качестве переключателя.

Пэннинг проводят с использованием биотинилированного ATP, биотинилированного ADP, биоти-

нилированного AMP или биотинилированного аденозина для получения популяции антител, которые специфически связываются с ATP, ADP, AMP или аденозином из каждой из сконструированных библиотек фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи.

Биотинилированный аденозин получали способом, описанным в примере 2-2-11. ATP-PEG-биотин можно приобретать от JenaBioscience (каталожный номер № NU-926-BIO) и использовать. Подобно ATP, AMP и ADP имеют структуру, в которой фосфатная группа добавлена к 5'-гидроксильной группе аденозина. Таким образом, является предпочтительным, чтобы соответствующий линкер (такой как линкер PEG) был связан с фосфатной группой, а затем добавлен к концу линкера таким же образом, как и в биотинилированном ATP.

Фаги продуцируются E. coli, сохраняющими сконструированные фагмиды для фагового дисплея. Популяцию фагов, преципитированную добавлением 2,5 M NaCl/10% PEG к культуральному раствору E. coli, продуцирующих фаги, разбавляют TBS с получением суспензии фаговой библиотеки. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляют BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводят с использованием антигенов, иммобилизованных на магнитных гранулах. В качестве магнитных гранул можно использовать покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Фаги, способные связываться с аденозином, AMP, ADP или ATP, собирают посредством пэннинга. В частности, посредством добавления меченных биотином антигенов к полученной суспензии библиотеки фагов, фаговую библиотеку приводят в контакт с аденозином, AMP, ADP или ATP при комнатной температуре в течение 60 мин. Добавляют блокированные BSA магнитные гранулы и комплексу антиген/фаг позволяют связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывают 1 мл TBST и TBS. Затем гранулы, к которым добавлен TBS, содержащий трипсин, в конечной концентрации 1 мг/мл суспендируют в течение 15 мин при комнатной температуре и суспензию фагов собирают с гранул, отделенных сразу после этого с использованием магнитного стенда. Белок pIII фагов, не экспонирнующий Fab (белок pIII, происходящий из фага-помощника) расщепляют добавлением трипсина, что приводит к потере способности фагов, не экспонирующих Fab, инфицировать E. coli. Фаги, элюированные посредством раствора трипсина, добавляют к 10 мл штамма E. coli ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E. coli культивируют при 37°C при осторожном перемешивании в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E. coli. Инфицированные E. coli высевают на чашки 225 мм×225 мм. Затем фаги собирают с культурального раствора посеянных E. coli для сбора суспензии библиотеки фагов. Сходный пэннинг проводят несколько раз для получения популяции фагов, которые связываются с аденозином, AMP, ADP или ATP.

Поскольку фаги, которые связываются с антигеном (аденозин, AMP, ADP или ATP), полученные из каждой из библиотек фагового дисплей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, представляют собой популяцию, которая обладает способностью связывать антиген, библиотека фагового дисплея Fab, сконструированная путем комбинирования этих двух библиотек, согласно прогнозам, будет содержать большое количество клонов, которые сохраняют способность к связыванию низкомолекулярных соединений, выступающих в качестве переключателя. Таким образом, полагают, что можно получить библиотеку, которая позволяет выделение антител с переключателями с более высокой эффективностью.

Гены экстрагируют способами, известными специалистам в данной области, из E. coli, инфицированных каждой из фаговых библиотек тяжелой цепи и легкой цепи. С использованием в качестве матрицы коллекции (библиотеки) каждого из генов, полученных, как описано выше, библиотеки генов амплифицируют с использованием праймеров, способных амплифицировать каждую из VH и VL. Генную библиотеку амплифицированной вариабельной области тяжелой цепи антитела человека и генную библиотеку амплифицированной вариабельной области легкой цепи человека вносят в соответствующий фагмидный вектор, имеющий как происходящую из IgG человека последовательность CH1, так и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи. Фагмидные векторы вводят в E. coli электропорацией для конструирования библиотеки, которая обеспечивает получение антител, презентирующих Fab-домены, состоящие из вариабельной области-константной области антитела человека и связывающиеся с антигенами с использованием аденозина, AMP, ADP или ATP в качестве переключателя. Полагают, что сконструированная библиотека, состоящая из H-цепей и L-цепей, имеющих такую разнообразную активность связывания с аденозином, AMP, ADP или ATP, будет пригодной в качестве библиотеки, содержащей антитела человека, для обеспечения эффективного получения антител с переключателями в виде AMP/ADP/ATP/аденозин против произвольных антигенов, где аденозин, AMP, ADP или ATP располагаются между антителом и антигеном, как показано на фиг. 43. Более того, поскольку, как описано выше, SMB0002 связывается не только с аденозином и AMP, но также и с ADP и ATP, также спрогнозировано, что оно обладает активностью связывания с cAMP и ATP-гамма-S, которые структурно сходны с AMP, ADP, ATP и аденозином. Таким образом, библиотеку считают пригодной для получения антител с переключателями, активность связывания которых в отношении произвольного антигена-мишени варьируется в зависимости от присутствия или отсутствия любого из низкомолекуляр-

ных соединений из ATP, ADP, AMP, cAMP, аденозина и ATP-гамма-S.

Пример 6. Получение антител, которые связываются с рецептором IL-6 человека (hIL-6R) в присутствии низкомолекулярных соединений, из библиотеки антител человека с использованием способа фагового дисплея (6-1)

Получение антител, которые связываются с hIL-6R в присутствии низкомолекулярных соединений, из библиотеки наивных антител человека способом пэннинга на гранулах

Библиотеку фагового дисплея наивных антител человека, сконструированную, как описано в справочном примере 1, описанном ниже, подвергали скринингу в отношении антител, демонстрирующих активность связывания с рецептором IL-6 человека (hIL-6R) в присутствии низкомолекулярных соединений. В частности, собирали фаги, презентирующие антитела, демонстрирующие активность связывания с hIL-6R, иммобилизованным на гранулах в присутствии низкомолекулярных соединений. Фаги собирали из раствора с фагом, элюированного с гранул в отсутствие низкомолекулярных соединений. В этом способе сбора в качестве антигена использовали меченный биотином hIL-6R.

Фаги, продуцированные E.coli, сохранившие сконструированные фагмиды для фагового дисплея, очищали обычным способом. Затем получали суспензию фаговой библиотеки, подвергнутую диализу против TBS. Далее к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигенов, иммобилизованных на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Для эффективного выделения антител с низкомолекулярным переключателем, зависимых от низкомолекулярных соединений, которые могут играть роль переключателя в злокачественных тканях, проводили пэннинг, который концентрировал антитела, которые связываются с антигенами в присутствии смешанного раствора следующих различных низкомолекулярных соединений (аденозин, аденозин-5'-трифосфат (ATP), инозин, кинуренин, простагландин E2 (PGE2), янтарная кислота и молочная кислота) (далее обозначаемые как коктейль низкомолекулярных соединений (SC)), но не связываются с антигенами в отсутствие SC.

В частности, SC получали, чтобы он содержал натриевую соль аденозинтрифосфата (ATP-Na), аденозин, инозин, янтарную кислоту и молочную кислоту, каждый в конечной концентрации 1 мМ, простагландин E2 (PGE2) в конечной концентрации 1 мкМ и кинуренин в конечной концентрации 100 мкМ, его pH доводили до 7,4 посредством NaOH. Полученную суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с SC и 250 пмоль меченных биотином антигенов при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплексам антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали один раз SC/TBS (TBS, содержащий SC). Затем гранулы, в которые было добавлено 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл суспендировали в течение 15 мин при комнатной температуре и суспензию фага собирали с гранул, отделенных сразу после этого с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фага добавляли к 10 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli культивировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашки 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали с культурального раствора посеянных E.coli для сбора суспензии библиотеки фагов.

Первый пэннинг проводили для сбора фагов, которые связываются в присутствии низкомолекулярных соединений, в то время как второй и последующие пэннинги проводили для концентрирования фагов, которые связываются с антигенами только в присутствии SC. В частности, 40 пмоль меченного биотином антигена, SC и NaOH добавляли к полученной суспензии фаговой библиотеки, чтобы позволить фаговой библиотеке контактировать с антигеном и низкомолекуляными соединениями при комнатной температуре в течение 60 мин. Добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали 1 мл SC/TBST и SC/TBS. Затем гранулы, к которым было добавлено 0,5 мл TBS, суспендировали при комнатной температуре и суспензию фагов собирали с гранул, отделенных непосредственно после этого, с использованием магнитного стенда. Этот процесс повторяли, а затем две суспензии фага, элюированных по отдельности, объединяли. К собранной суспензии фагов добавляли 5 мкл 100 мг/мл трипсина для расщепления белка pIII фагов, которые не экспонируют Fab (белок pIII, происходящий из фага-помощника), что приводило к утрате способности фагов, не экспонирующих Fab, инфицировать E.coli. Фаги, собранные из обработанной трипсином суспензии фагов, добавляли к 10 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli культивировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашки 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали с культурального раствора посеянных E.coli для сбора суспензии фаговой библиотеки. Проводили три раунда пэннинга в присутствии SC с получением антител, обладающих активностью связывания антигена.

(6-2) Оценка активности связывании в присутствии низкомолекулярных соединений способом ELISA фагов

Для единичной колонии E.coli, полученной согласно (6-1), содержащий фаг культуральный супернатант собирали общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). Очищенные фаги, которые были очищены способом, описанным в справочном примере (1-3), подвергали ELISA с использованием описанной ниже методики. 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIL-6R. После удаления меченного биотином hIL-6R, который не связывался с планшетом путем промывания каждой из лунок планшета TBST, лунки блокировали 250 мкл 2% обезжиренного молока/TBS в течение одного часа или более. После удаления 2% обезжиренного/TBS, очищенные фаги добавляли в каждую лунку планшета и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение одного часа, чтобы позволить презентирующим антитело фагам связаться с меченным биотином hIL-6R, присутствующим в каждой лунки в присутствии/отсутствие SC. Каждую лунку промывали TBST или SC/TBST, и в нее добавляли конъюгированное с HRP антителом против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или SC/TBS, и планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST или SC/TBST, хромогенную реакцию простого раствора TMB (ZYMED), добавленного в каждую лунку, завершали добавлением серной кислоты. Затем измеряли развитие окраски по поглощению при 450 нм.

Клоны 6RNMSC1-2_F02 и 6RNMSC1-3_G02, обладающие активностью связывания с антигеном hIL-6R в присутствии смеси низкомолекулярных соединений, получали путем проведения ELISA фагов с использованием 960 выделенных клонов.

(6-3) Экспрессия и очистка антител, которые связываются с hIL-6R

С использованием конкретных праймеров (SEQ ID NO: 78 и 80), гены амплифицировали с клонов 6RNMSC1-2_F02 и 6RNMSC1-3_G02, для которых было определено, что они обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии SC, исходя из ELISA фагов, описанного в (6-2). Нуклеотидные последовательности генов анализировали (6RNMSC1-2_F02: последовательность тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 32 и последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 33; 6RNMSC1-3 G02: последовательность тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 34 и последовательность легкой цепи показана в SEQ ID NO: 35). Гены, кодирующие вариабельные области 6RNMSC1-2_F02, 6RNMSC1-3_G02, и отрицательный контроль виде антитела GC413 против глипикана 3 человека (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 36; легкая цепь: SEQ ID NO: 37) встраивали в плазмиду для экспрессии у животных, содержавшую IgG1/каппа человека. Экспрессированные антитела очищали способом, описанным в справочном примере 1, описанном ниже.

(6-4) Идентификация низкомолекулярных соединений, которые требуются для связывания с hIL-6R выделенных антител

Три типа полученных антител 6RNMSC1-2_F02, 6RNMSC1-3_G02 и GC413 подвергали ELISA в девяти условиях, показанных в табл. 12. Между тем, низкомолекулярные соединения в подходящем случае получают в концентрациях, показанных в табл. 12, с использованием буферов, приведенных в табл. 13. Использованный антиген представлял собой меченный биотином hIL-6R.

Таблица 12

Условия	Низкомолекулярное соединение	Концентрация
1	ATP-Na	1 мМ
2	Аденозин	1 мМ
3	Инозин	1 мМ
4	PGE2	1 мкМ
5	Янтарная кислота	1 мМ
6	Молочная кислота	1 мМ
7	Кинуренин	100 мкМ
8	ATP 1 мМ, Аденозин 1 мМ, Инозин 1 мМ, PGE2 1 мкМ, янтарная кислота 1 мМ, молочная кислота 1 мМ, кинуренин 100 мкМ	
9	-	-

Таблица 13

Промывочный буфер	10 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, pH 7,4
Блокирующий буфер	10 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 2% обезжиренное молоко, pH 7,4
Буфер для образца	10 мМ ACES, 150 мМ NaCl, низкомолекулярное соединение, pH 7,4

Сначала, 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл PBS, содержавшего меченный биотином hIL-6R при комнатной температуре в течение 1 ч или более. После удаления меченного биотином hIL-6R, который не связался с планшетом, путем промывания каждой из лунок планшета TBST, лунки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (2% обезжиренное молоко/TBS) в течение 1 ч или более, и блокирующий буфер удаляли из каждой лунки. 100 мкл каждого из очищенных IgG, приготовленных в концентрации 2,5 мкг/мл с использованием буфера для образца, содержавшего низкомолекулярные соединения в конечных концентрациях, показанных в табл. 12, добавляли в каждую лунку и планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить каждому IgG связаться с меченным биотином hIL-6R, присутствующим в каждой лунке. После промывания промывочным буфером, содержавшим низкомолекулярные соединения в конечных концентрациях, показанных в табл. 12, в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (BIOSOURCE), разбавленное буфером для образца, содержавшим низкомолекулярные соединения, и планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания промывочным буфером, содержащим соответствующие низкомолекулярные соединения, хромогенную реакцию простого раствора TMB (ZYMED) добавленного в каждую лунку, завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Композиция использованного буфера показана в табл. 13.

Результаты измерения показаны на фиг. 16 и 17. Когда использовали 6RNMSC1-2_F02 и 6RNMSC1-3_G02, полученный результат состоял в том, что поглощение в условиях 9 (низкомолекулярное соединение) было значительно более низким по сравнению с поглощением в условиях 8 (раствор коктейля, содержащий все низкомолекулярные соединения). Из этого результата было подтверждено, что 6RNMSC1-2_F02 и 6RNMSC1-3_G02 имели свойство, состоящее в том, что их связывание антигена варьировалось в зависимости от присутствия или отсутствия низкомолекулярных соединений. Более того, результат, полученный, когда использовали 6RNMSC1-2_F02, состоял в том, что поглощение в условиях 7 (100 мкМ кинуренин) было сравнимым с поглощением в условиях 8, однако поглощение было достаточно низким в других условиях; таким образом, было продемонстрировано, что 6RNMSC1-2_F02 представляет собой антитело, которое связывается с антигеном hIL-6R в присутствии кинуренина (фиг. 16). Кроме того, результат, полученный, когда использовали 6RNMSC1-3_G02, состоял в том, что поглощение в условиях 1 (1 мМ ATP-Na) было сравнимым с поглощением в условиях 8, однако поглощение было достаточно низким в других условиях; таким образом, было продемонстрировано, что 6RNMSC1-3_G02 представляет собой антитело, которое связывается с антигеном hIL-6R в присутствии ATP (фиг. 17). Было показано, что несколько антител, антигенсвязывающая способность которых варьируется в присутствии различных низкомолекулярных соединений, может быть выделено за один раз с использованием способа, как описано выше.

Пример 7. Охарактеризация антитела 6RNMSC1-2_F02

(7-1) Оценка способом ELISA активности связывания hIL-6R в присутствии аминокислот и метаболитов аминокислот, отличных от кинуренина

Антитело 6RNMSC1-2_F02, полученное согласно примеру 6, которое связывается с hIL-6R в присутствии низкомолекулярных соединений, представляет собой антитело, которое связывается с hIL-6R в присутствии кинуренина. Серию метаболитов аминокислот, таких как метаболиты триптофана, оценивали в отношении того, являются ли они пригодными в качестве неограничивающих вариантов осуществления соединений, специфических для типа ткани, в частности метаболиты, специфические для злокачественных клеток, для применения в рамках настоящего изобретения.

Антитело 6RNMSC1-2_F02, обладающее активностью связывания антигена в присутствии кинуренина, описанное в примере 6, и отрицательный контроль GC413 подвергали ELISA в семи условиях, описанных в табл. 14. Между тем, каждую из аминокислот и их метаболитов получали соответствующим образом в концентрациях, показанных в табл. 14, с использованием буферов, показанных в табл. 13. Использованный антиген представлял собой меченный биотином hIL-6R.

Таблица 14

Условия	Низкомолекулярное соединение	Концентрация
1	Кинуренин	1 мМ
2	Триптофан	1 мМ
3	Фенилаланин	1 мМ
4	Антраниловая кислота	1 мМ
5	3-гидроксиуренин	1 мМ
6	Кинуреновая кислота	1 мМ
7	-	-

Сначала 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл PBS, содержавшего меченные биотином антигены при комнатной температуре в течение 1 ч или более. После удаления антигенов, которые не связались с планшетом, путем промывания каждой из лунок планшета TBST лунки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (2% обезжиренное молоко/TBS) в течение одного часа или более и блокирующий буфер удаляли из каждой лунки. 100 мкл каждого из очищенных IgG, приготовленных в концентрации 2,5 мкг/мл с использованием буфера для образца, содержавшего низкомолекулярные соединения в конечных концентрациях, показанных в табл. 14, добавляли в каждую лунку и планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить каждому IgG связаться с меченным биотином антигеном, присутствующим в каждой лунке. После промывания промывочным буфером, содержавшим низкомолекулярные соединения в конечных концентрациях, показанных в табл. 14, в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (BIOSOURCE), разбавленное буфером для образца, содержавшим аминокислоты и метаболиты аминокислот, и планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания промывочным буфером, содержавшим соответствующие аминокислоты и метаболиты аминокислот, хромогенную реакцию простого раствора TMB (ZYMED) добавленного в каждую лунку, завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Композиция использованного буфера показана в табл. 13.

Результаты измерения показаны на фиг. 18. Когда использовали 6RNMSC1-2_F02, поглощение в условиях 7 (без низкомолекулярного соединения) было значительно более низким по сравнению с поглощением в условиях 1 (раствор кинуренина). Аналогично, поглощение в условиях 5 (раствор 3-гидроксикинуренина) продемонстрировало высокое сходство поглощения с поглощением в условиях 1; таким образом, было показано, что 6RNMSC1-2_F02 представляет собой антитело, которое связывается с антигеном hIL-6R не только в присутствии кинуренина, но также в присутствии метаболита кинуренина. Более того, поскольку поглощение было достаточно низким в других условиях, было показано, что 6RNMSC1-2_F02 является антителом, которое не связывается с антигеном hIL-6R, даже если присутствует триптофан, предшественник кинуренина. Поскольку экспрессия IDO, который является ферментом, который продуцирует кинуренин посредством метаболизма триптофана, является повышенной в микроокружении злокачественной опухоли, антитела, которые связываются с антигенами в присутствии кинуренина или его метаболитов, но не в присутствии триптофана, считаются важными в качестве антител, которые связываются с антигенами только в микроокружении злокачественной опухоли. Более того, исходя из вышеуказанного, полагают, что тот же способ можно использовать для получения антител, которые связываются с представляющим интерес антигеном не только в присутствии одного типа метаболита аминокислот, но также в присутствии множества типов структурно отличающихся метаболитов аминокислот.

Таким образом, полагают, что антитело, которое использует в качестве переключателя молекулу, которая продуцируется локально в злокачественной опухоли посредством метаболизма ферментами, специфическими для злокачественной опухоли (в этом примере IDO и его нижерасположенные метаболические ферменты) будет способно селективно связываться с антигенами-мишенями только локально в злокачественной опухоли. В этом примере в качестве переключателя используют метаболические продукты, образованные из эндогенной молекулы триптофана метаболическими ферментами, специфическими для злокачественной опухоли; однако считается, что можно использовать в качестве переключателя искусственную молекулу (неприродная молекула), которую вводят экзогенно, например, посредством перорального или внутривенного введения, а также метаболический продукт, образующийся из эндогенной молекулы метаболическими ферментами, специфическими для злокачественной опухоли. Например, как описано в примере 1, капецитабин (кселода), при введении метаболизируется в 5-FU метаболическими ферментами, специфическими для злокачественной опухоли, и т.п., что приводит к увеличению локальной концентрации 5-FU в злокачественной опухоли (Desmoulin F. et al., Drug Metab Dispos. 2002). Таким образом, считается, что антитело, которое используется 5-FU в качестве переключателя, может селективно связываться с антигеном-мишенью только локально в злокачественной опухоли. Альтернативно считается возможным использовать в качестве переключателя молекулы, продуцируемые вследствие специфических для злокачественной опухоли гипоксических условий или кислых условий, вместо

метаболических ферментов. Например, поскольку в гипоксических условиях TH-302 (Duan JX, et al., J Med Chem. 2008) метаболизируется в Br-IPM, антитело, которое использует Br-IPM в качестве переключателя, может селективно связываться с антигенами-мишенями только локально в злокачественной опухоли.

(7-2) Оценка способом поверхностного плазмонного резонанса эффекта кинуренина на связывание рецептора IL6 человека

Biacore T200 (GE Healthcare) использовали для анализа взаимодействия в реакции антиген-антитело между 6RNMSC1-2_F02 и рецептором IL-6 человека (hIL-6R). Соответствующее количество белка A (Invitrogen) иммобилизовывали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) способом присоединения аминов. Представляющее интерес антитело улавливали на сенсорном чипе и антигену hIL-6R позволяли взаимодействовать. Использованный подвижный буфер представлял собой 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4. Взаимодействие с антигеном hIL-6R измеряли при 25°C. hIL-6R разбавляли подвижным буфером, содержавшим 100 мкмоль/л кинуренина, или, в качестве контроля, подвижным буфером, содержавшим 10 ммоль/л ATP.

Разбавленные растворы hIL-6R и подвижный буфер, который представляет собой пустой образец, инжектировали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 1 мин и hIL-6R позволяли взаимодействовать с 6RNMSC1-2_F02, уловленным на сенсорном чипе. Затем прогоняли подвижный буфер со скоростью потока 10 мкл/мин в течение одной минуты, чтобы наблюдать диссоциацию hIL-6R от антитела. Далее инжектировали 10 ммоль/л глицин-HCl, pH 1,5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 30 секунд для регенерации сенсорного чипа. Константу диссоциации K_D (M) 6RNMSC1-2_F02 от hIL-6R вычисляли из кинетических параметров, константы скорости ассоциации ka (1/мс) и константы скорости диссоциации kd (1/с), вычисленных на основе сенсограмм, полученных посредством измерений. Каждый параметр вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Сенсограммы, полученные посредством этого измерения взаимодействия между 6RNMSC1-2_F02 и 1 мколь/л hIL-6R в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, 10 ммоль/л ATP, или в их отсутствие показаны на фиг. 19. Как показано на фиг. 19, в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, 6RNMSC1-2_F02 связывалось с hIL-6R; однако связывание hIL-6R не обнаруживалось в отсутствие кинуренина. Таким образом, было подтверждено, что 6RNMSC1-2_F02 обладает свойством связывания с hIL-6R с использованием кинуренина в качестве переключателя. Кроме того, константа диссоциации K_D 6RNMSC1-2_F02 в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина составила 1,5 мкмоль/л.

(7-3) Эффект кинуренина в качестве переключателя на диссоциацию антитела от hIL-6R

Оценку того, диссоциирует ли в присутствии кинуренина 6RNMSC1-2_F02, которое связалось с hIL-6R в присутствии кинуренина, зависимым от концентрации кинуренина образом оценивали с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Использованные подвижные буферы представляли собой 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4 и 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4, 100 мкмоль/л кинуренина. Измерения проводили при 25°C. В качестве анализируемого соединения 6RNMSC1-2_F02 в концентрации 5 мкг/мл, разбавленному 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4, содержавшим 100 мкмоль/л кинуренина, позволяли взаимодействовать в течение 180 с с hIL-6R, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5 посредством присоединения аминов. Затем исследовали способ диссоциации hIL-6R в каждых условиях подвижного буфера. Для сравнения степени диссоциации в условиях подвижного буфера количество 6RNMSC1-2_F02, связавшегося с hIL-6R в присутствии 100 мкмоль/л кинуренина, принимали за 100 для нормализации, и нормализованные величины сравнивали. Сенсограмма, демонстрирующая взаимодействие между 6RNMSC1-2_F02 и hIL-6R после нормализации, показана на фиг. 20. Результат на фиг. 20 показал, что после связывания с hIL-6R в присутствии кинуренина, 6RNMSC1-2_F02 имело свойство быстрой диссоциации от hIL-6R, когда кинуренин более не присутствовал. В частности, было подтверждено, что регуляция кинуренином связывания антитела с hIL-6R является обратимой.

(7-4) Оценка эффекта концентрации кинуренина на связывание hIL-6R

Далее оценивали эффект концентрации кинуренина на реакцию антиген-антитело между 6RNMSC1-2_F02 и hIL-6R с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Использованный подвижный буфер представлял собой 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4. Реакцию антиген-антитело между 6RNMSC1-2_F02 и IL-6R человека оценивали при 25°C. hIL-6R иммобилизовывали на сенсорный чип CM5 способом присоединения аминов. В качестве анализируемого соединения 1 мкг/мл 6RNMSC1-2_F02, разбавленному 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (мас./об.) Tween 20, pH 7,4, содержавшего кинуренин, доведенный до различных концентраций, позволяли взаимодействовать в течение 180 с и определяли изменение уровня связывания. Результат показан на фиг. 21. Их этого результата было обнаружено, что чем более высокой является концентрация кинуренина, выступающего в качестве переключателя, тем более высоким является уровень связывания 6RNMSC1-2_F02 с hIL-6R.

Поскольку в этой системе анализа hIL-6R иммобилизован на сенсорном чипе, полагают, что

6RNMSC1-2_F02 связывается двухвалентным образом. Также было определено, что количество 6RNMSC1-2_F02, которое связалось с hIL-6R, увеличивается, когда концентрация кинуренина возрастает в этой системе анализа, где 6RNMSC1-2_F02 распознает hIL-6R двухвалентным образом. Этот результат показал, что при двухвалентном связывании 6RNMSC1-2 F02 также обладает свойством связывания с IL-6R с использованием кинуренина в качестве переключателя.

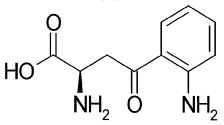
Результаты, описанные выше, показали, что 6RNMSC1-2_F02 представляет собой антитело, которое при использовании кинуренина в качестве переключателя связывается с hIL-6R в присутствии кинуренина и диссоциирует от hIL-6R в отсутствие кинуренина. Более того, было подтверждено, что 6RNMSC1-2 F02 не демонстрирует активности связывания hIL-6R в отсутствие кинуренина, что позволяет полную регуляцию по принципу включение/выключение, и удовлетворяет функции переключателя.

(7-5) Оценка связывающей способности 6RNMSC1-2_F02 в отношении производных кинуренина

Кинуренин-зависимое антитело 6RNMSC1-2_F02, полученное из библиотеки, оценивали в отношении его связывания с кинуренином и производными с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). В качестве производных оценивали следующие семь молекул: изомер кинуренина D-кинуренин и производные 3-гидрокси-DL-кинуренина, 4-(4-метилфенил)-4-оксомасляная кислота, RO0447436-000-001, RO0635389-000-001, RO0438566-001-001 и RO0635390-000-001.

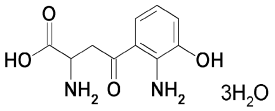
Химическая структура каждого соединения показана ниже.

Соединение 19



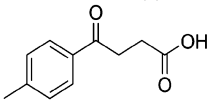
D-Кинуренин

Соединение 20



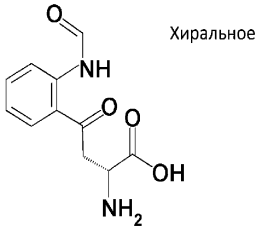
3-Гидрокси-DL-кинуренин

Соединение 21



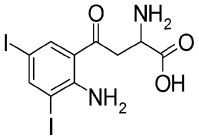
4-(4-метилфенил)-4-оксомасляная кислота

Соединение 22



O0447436-000-001

Соединение 23

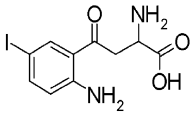


RO0635389-000-001

Соединение 24

RO0438566-001-001

Соединение 25



RO0635390-000-001

Соответствующее количество белка A (Invitrogen) иммобилизовывали на сенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) способом присоединения аминов. Представляющее интерес антитело улавливали на нем, и антигену кинуренину и его производным позволяли взаимодействовать. Использованный подвижный буфер представлял собой 50 ммоль/л Tris-HCl, 150 ммоль/л NaCl, 0,02% (мас./об.) Tween 20, 5% DMSO, pH 7,6. Все измерения проводили при 15°C. Антигены разбавляли подвижным буфером.

Что касается 6RNMSC1-2_F02, разбавленные растворы антигенов и подвижный буфер в качестве пустого раствора в каждом случае добавляли при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 с, чтобы позволить каждому антигену взаимодействовать с антителом, уловленным на сенсорном чипе. Затем прогоняли подвижный буфер при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 с, чтобы наблюдать диссоциацию антигенов от антитела. Исходя из сенсограмм, полученных посредством измерений, вычисляли параметры кинетики, константу скорости ассоциации ka (1/Mc) и константу скорости диссоциации kd (1/c). Из этих констант вычисляли константу диссоциации KD (M). Каждый параметр вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Исходя из результата оценки, были определены следующие параметры кинетики для взаимодействия между кинуренином и 6RNMSC1-2_F02: ka=709 (1/c), kd=0,17 (1/c) и KD=0,239 (ммоль/л). Сенсограммы, полученные в результате оценки, показаны на фиг. 22. Сенсограммы, соответствующие результатам связывания с производными, представлены на фиг. 23 для 3-гидрокси-DL-кинуренина, на фиг. 24 для RO0635389-000-001 и на фиг. 25 для RO0635390-000-001. Чтобы продемонстрировать сенсограммы использовали Scrubber2 (Biologic software) и Microsoft Office Excel 2007. Эти результаты показали, что 6RNMSC1-2_F02 может не только связываться с кинуренином, но также и некоторые производные кинуренина, такие как 3-гидрокси-DL-кинуренин, RO0635389-000-001 и RO0635390-000-001.

(7-6) Оценка способности 6RNMSC1-2_F02 отвечать на неприродные низкомолекулярные соединения

Для оценки эффекта различных низкомолекулярных соединений на реакцию антиген-антитело между hIL-6R и антителом с кинуренином в качестве переключателя 6RNMSC1-2_F02, полученным из библиотеки, использовали Octet (PRIMETECH). В качестве низкомолекулярных соединений использовали всего восемь молекул, показанных в примере (7-5), которые представляют собой кинуренин и его производные. Использованный буфер для анализа представлял собой TBS, pH 7,4, и измерения проводили при 30°C. Биотинилированный hIL-6R иммобилизовывали на сенсорном чипе со стрептавидином, антителу позволяли взаимодействовать и наблюдали изменения величины его связывания. Антитело разбавляли с использованием буфера для анализа или буфера для анализа, в который было добавлено одно из низкомолекулярных соединений. Конечную концентрацию каждого низкомолекулярного соединения доводили до 100 мкМ, в то время как конечную концентрацию антитела доводили до 10 мкг/мл.

Активность связывания 6RNMSC1-2_F02 с hIL-6R, полученная посредством этого измерения в присутствии каждого низкомолекулярного соединения при 100 мкМ или в их отсутствие, показана на фиг. 26 для кинуренина, на фиг. 27 для 3-гидрокси-DL-кинуренина, на фиг. 28 для RO0635389-000-001 и на фиг. 29 для RO0635390-000-001. Как показано на фиг. 26, в присутствии 100 мкМ кинуренина 6RNMSC1-2_F02 связывалось с hIL-6R, в то время как в отсутствие кинуренина связывание hIL-6R не наблюдалось. Таким образом, Octet также подтвердил, что 6RNMSC1-2_F02 имело свойство связывания с hIL-6R с использованием кинуренина в качестве переключателя. Более того, как показано на фиг. 27-29, связывание с hIL-6R наблюдали в присутствии низкомолекулярных соединений, отличных от кинуренина, таких как 3-гидрокси-DL-кинуренин, RO0635389-000-001 и RO0635390-000-001, которые представляют собой производные кинуренина, способные связываться с 6RNMSC1-2_F02, в то время как в отсутствие этих низкомолекулярных соединений связывание hIL-6R не наблюдалось. Вышеуказанное продемонстрировало, что антитела против hIL-6R, для которых кинуренин и его производные (неприродные соединения) выполняют функцию переключателя, могут быть выделены из библиотеки.

В примере 7-3 продемонстрировано использование эндогенных молекул в качестве переключателя. С помощью этого примера было показано, что также в качестве переключателя можно использовать искусственные молекулы (неприродные молекулы). В частности, было продемонстрировано, что могут быть получены антитела, которые используют в качестве переключателя неприродные метаболиты, продуцируемые метаболическими ферментами, специфическими для злокачественной опухоли, из искусственных молекул (неприродных молекул), которые можно вводить экзогенно пероральным или внутривенным путем и т.п.

Пример 8ю Конструирование библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя путем всестороннего изменения с использованием антитела против hIL-6R с кинуренином в качестве переключателя

Известно, что концентрация кинуренина является высокой в злокачественных тканях. Несколько антител, демонстрирующих способность связывать антиген только в присутствии ATP, было получено из рационально сконструированной библиотеки согласно справочному примеру 2 с использованием в качестве матрицы ATP-связывающего антитела. Это позволило предположить, что антитела, демонстрирующие способность связывать антиген только в присутствии кинуренина, также можно было получить по-

средством конструирования библиотеки с использованием в качестве матрицы антитела, которое демонстрирует способность к связыванию с кинуренином.

(8-1) Рентгеноструктурный анализ связывающего hIL-6R антитела 6RNMSC1-2_F02, которое использует кинуренин в качестве переключателя

Трехмерную структуру комплекса кинуренина и антитела 6RNMSC1-2_F02, связывающегося с hIL-6R с использованием кинуренина в качестве переключателя, которое было получено из библиотеки согласно примеру 7, определяли с использованием рентгеноструктурного анализа.

(8-1-1) Получение полноразмерного антитела 6RNMSC1-2_F02 для кристаллизации

Полноразмерное антитело 6RNMSC1-2_F02 для кристаллизации получали и очищали способом, известным специалистам в данной области.

(8-1-2) Получение Fab-фрагмента NMSC 1-2_F02 из полноразмерного антитела

После концентрирования полученного антитела 6RNMSC1-2_F02 с использованием ультрафильтрационной мембраны с пороговым значением молекулярной массы (MWCO) 10000, образец приготавливали путем разбавления до 2 мг/мл посредством 100 мМ Tris-буфера, pH 8,0 и к нему добавляли эндопротеазу Lys-C категории, пригодной для секвенирования, (Roche Applied Science) в соотношении масс 1/400 относительно полноразмерного антитела. Смесь инкубировали при 35°C в течение 45 мин. Затем реакцию завершали добавлением 20 мл 25 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, в котором была растворена таблетка коктейля ингибиторов протеаз mini, без EDTA (Roche Applied Science). Далее этот образец загружали в 1-мл катионообменную колонку HiTrap SP HP (GE Healthcare), ниже которой была последовательно подсоединена колонка с белком A HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) размером 1 мл и которая была уравновешена 25 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,0. Элюирование проводили посредством линейного увеличения концентрации NaCl в буфере и получали очищенную фракцию Fab-фрагментов антитела 6RNMSC1-2_F02. Затем ее загружали на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 16/60 препаративной категории (GE Healthcare), уравновешенную 25 мМ буфером HEPES, pH 7,0, 100 мМ NaCl. Fab-фрагменты 6RNMSC1-2_F02 элюировали с использованием того же буфера из этой колонки для кристаллизации. Все действия на колонке проводили при низкой температуре.

(8-1-3) Получение кристаллов комплекса кинуренина и Fab-фрагмента 6RNMSC1-2_F02

Образец Fab-фрагмента SMB0002_Fab 6RNMSC1-2_F02 для кристаллизации, очищенный описанным выше способом, концентрировали с использованием ультрафильтрационной мембраны с MWCO 5000 до A280=24,1. Затем добавляли 50 мМ кинуренин, растворенный в 100% DMSO, в конечной концентрации 2 мМ, и кристаллизацию проводили способом паровой диффузии с сидячей каплей. Кристаллизацию проводили с использованием Hydra II Plus One (MATRIX). С использованием резервуарного раствора из 0,2 М сульфата лития моногидрата, 30,0% мас./об. PEG 3350 и 0,1 М Tris, pH 8,5, получали кристаллизационные капли путем смешения в соотношении резервуарный раствор: образец для кристаллизации=0,2 мкл:0,2 мкл. Каплям позволяли стоять при 20°C, и были успешно получены столбчатые кристаллы. Затем один из полученных кристаллов погружали в 0,18 М сульфат лития моногидрат, 27,3% PEG3350, 0,09 М HEPES pH7,5, 18,2% этиленгликоль, 4,5 мМ кинуренин, 9% DMSO раствор на 30 мин при комнатной температуре и получали кристалл комплекса Fab-фрагмента 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина.

(8-1-4) Измерение данных рентгенодиффракции кристалла комплекса Fab-фрагмента 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина

Монокристалл комплекса Fab-фрагмента 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина, полученный способом, описанным выше, зачерпывали с раствором с использованием булавки с прикрепленной тонкой нейлоновой петлей и замораживали в жидком азоте. Данные рентгенодифракции измеряли на устройстве BL-5A установки с магнитотормозным излучением Photon Factory от High Energy Accelerator Research Organization. Замороженное состояние поддерживали на протяжении измерения, помещая образец в поток газообразного азота при -178°C. Было получено всего 360 рентгенограмм с использованием CCD-детектора Quantum 315r (ADSC), подсоединенного к линии пучка, посредством вращения кристалла на 0,5°. Определение параметров ячейки, индексирование дифракционных пятен и обработку дифракционных данных из полученных рентгенограмм проводили с использованием программы Xia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190), XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) и Scala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82). В итоге, это успешно обеспечило данные об интенсивности дифракции при разрешении вплоть до 2,33 ангстрем. Этот кристалл относится к пространственной группе P1 с параметрами решетки a=55,830 ангстрем, b=56,040 ангстрем, c=80,340 ангстрем, α=87,81°, β=82,88°, γ=65,54°.

(8-1-5) Рентгеноструктурный анализ комплекса кинуренина и Fab-фрагмента и 6RNMSC1-2_F02

Для определения структуры комплекса кинуренина и Fab-фрагмента 6RNMSC1-2 F02 проводили способ молекулярного замещения с использованием программы Phaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674). Из размера полученной кристаллической решетки и молекулярной массы Fab-фрагмента 6RNMSC1-2_F02 было оценено, что количество комплексов в асимметричном элементе равно двум. Модель гомологии для антитела конструировали с использованием Discovery Studio 3.5 (Accelrys). Эту модель для Fab разделяли на вариабельную область и константную область и с использованием координат

каждой структуры в качестве модели для поиска, определяли их ориентацию и положение в кристаллической решетке на основе функции вращения и функции трансляции. Кроме того, кристаллографический фактор достоверности R для данных интенсивности дифракции при от 25 до 3,0 ангстрем составлял 40,57% и свободный R составлял 38,91%, когда проводили уточнение жесткого тела на полученной структурной модели, в которой части вариабельной области и константной области независимо перемещались. Затем, проводили уточнение структурной модели путем повторения следующих процессов: уточнение структуры с использованием программы REFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-3 67), и пересмотр структурной модели, полученной с использованием программы Coot (Acta Cryst. (2010) D66, 486-501), ссылаясь на карты электронной плотности, имеющие в качестве коэффициентов 2Fo-Fc и Fo-Fc, которые вычисляли на основе экспериментально определенного структурного фактора Fo, структурного фактора Fc, которые были вычислены из этой модели, и фазы, вычисленной из этой модели. В конечном итоге, с использованием 34135 данных об интенсивности дифракции при разрешении от 25 до 2,33 ангстрем, кристаллографический фактор достоверности R и свободный R структурной модели, содержавшей 7019 неводородных атома, составили 20,4 и 26,56% соответственно.

(8-1-6) Идентификация участков взаимодействия 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина

В конечном итоге, кристаллографическая структура комплекса между кинуренином и Fab-фрагментом 6RNMSC1-2-F02, связывающееся с hIL-6R с использованием кинуренина в качестве переключателя, которое было получено из библиотеки согласно примеру 7, была определена при разрешении 2,33 ангстрем.

В асимметричном элементе кристалла было две молекулы Fab-фрагмента, и кинуренин был связан только с одной из них. Это показало, что кинуренин распознавался в основном CDR3 H-цепи антитела, и связывался с антителом в положении, немного отличающимся от части, обычно используемой в связывании антигена.

Как показано на фиг. 30, молекула кинуренина распознается соответствующими боковыми цепями P97, R100c и D101 H-цепи и H49 и F55 L-цепи, а также соответствующими основными цепями R94, D95, R100c, G100d и A100e H-цепи антитела. Более того, аминогруппы в аминокислотном остове кинуренина являются положительно заряженным при нейтральных значениях pH и наблюдается несколько водородных связей и электростатических взаимодействий с кислородом карбонильной группы основной цепи каждого из D95, R94 и A100e H-цепи и карбоксильной группой боковой цепи D101. Более того, отрицательно заряженная карбоксигруппа кинуренина формирует несколько водородных связей с амидной NH-группой основной цепи каждого из G100d и R100c H-цепи. Полагают, что сеть этих прочных водородных связей и электростатических взаимодействий будет играть важную роль в распознавании кинуренина антителом. Более того, боковая цепь R100c H-цепи формирует катионное π-взаимодействие с частью кинуренина, представляющей собой бензольное кольцо. Кроме того, H49 и F55 L-цепи и D101 H-цепи окружают часть кинуренина, представляющую собой бензольное кольцо, и формирование ван-дер-ваальсовых взаимодействий с этими остатками вносит вклад в распознавание кинуренина при связывании. Кроме того, было подтверждено, что боковая цепь H49 L-цепи формирует водородную связь, хотя и слабую, с NH2-группой в ароматическом кольце кинуренина.

Результат, описанный выше, продемонстрировал способ распознавания кинуренина антителом и идентифицировал аминокислотные остатки вариабельной области антитела, которые в значительной степени вовлечены в связывание кинуренина. Аминокислотные остатки, боковые цепи которых в значительной степени вовлечены в связывание кинуренина, включают: P97, R100c и D101 (нумерация Kabat) в H-цепи, и H49 и F55 (нумерация Kabat) в L-цепи. Более того, остатки, у которых их части основной цепи в значительной степени вовлечены в связывание кинуренина, включают R94, D95, R100c, G100d и A100e в H-цепи. Кроме того, исходя из структурных признаков, полагают, что остатки, такие как P97, P100b и G100d, возможно, вносят значительный вклад непрямо в связывание кинуренина посредством поддержания структуры CDR3 H-цепи в конформации, необходимой для связывания с кинуренином.

(8-2) Оценка вариантов 6RNMSC1-2_F02 в отношении способности связываться с кинуренином

(8-2-1) Оценка вариантов тяжелой цепи 6RNMSC1-2_F02 в отношении способности связывания с кинуренином

Как описано выше, посредством кристаллографического анализа структуры P97, P100b, R100c, G100d, D101 тяжелой цепи и т.п. были выявлены в качестве остатков, которые могут играть важную роль в связывании кинуренина. Таким образом, что касается некоторых из остатков, в действительности получали варианты для оценки их способности связываться с кинуренином.

Сконструированные варианты представляют собой P97A, P97G, P100bG, R100cA, G100dA, G100dV и D101A (табл. 15).

Таблица 15

Название клона	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
6RNMSC1-2_F02 P97A	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 P97G	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 P100bG	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 R100cA	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 G100dA	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 G100dV	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 33
6RNMSC1-2_F02 D101A	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 33

Различные варианты 6RNMSC1-2_F02, экспрессированные и очищенные способом, описанным в справочном примере 1 ниже, оценивали в отношении их связывания кинуренина способом, сходным со способом с использованием Biacore, описанным в примере (7-5). В результате было еще раз подтверждено, что 6RNMSC1-2_F02 связывается с кинуренином; однако все другие варианты имели сниженную или значительно сниженную способность связываться с кинуренином. Таким образом, было продемонстрировано, что остатки, определенные в качестве важных для связывания кинуренина с помощью кристаллографического анализа структуры, действительно участвуют в связывании, и этот результат подтверждает результаты кристаллографического анализа структуры.

(8-2-2) Оценка варианта H49Y 6RNMSC1-2_F02 в отношении способности к связыванию с кинуренином

Из кристаллографического анализа структуры было предположено, что аминокислотным остатком легкой цепи, который вступает в важное взаимодействие с кинуренином, является только H49 (нумерация Kabat). Более того, результат анализа последовательности показал, что каркасная область 6RNMSC1-2_F02 происходила из VLkappa-2 эмбрионального типа. В VLkappa-2 эмбрионального типа, аминокислота в положении 49 согласно нумерации Kabat представляет собой Tyr практически во всех случаях, и она является высококонсервативной. Таким образом, был получен вариант путем замены His49 на Tyr для оценки степени участия His во взаимодействии с кинуренином.

Вариант His49Tyr (тяжелая цепь SEQ ID NO: 32; легкая цепь SEQ ID NO: 45) 6RNMSC1-2_F02, экспрессированного и очищенного способом согласно справочному примеру 1, описанному ниже, оценивали в отношении связывания кинуренина способом, сходным со способом с использованием Biacore, описанным в примере (7-5). Результат показал, что H49Y сохранял связывание кинуренина. Также были определены параметры кинетики: ka=2543 (1/c), kd=0,24 (1/c) и KD=0,095 (ммоль/л). Сенсограммы, демонстрирующие результаты оценки, показаны на фиг. 31.

(8-2-3) Модификация 6RNMSC1-2_F02 в каркасную последовательность эмбрионального типа

Результат анализа последовательности показал, что каркасная область VH 6RNMSC1-2_F02 происходит из VH1-69 эмбрионального типа, в то время как каркасная область VL 6RNMSC1-2_F02 происходит из Vκ2-28 эмбрионального типа. Таким образом, с целью повышения стабильности антитела для восстановления каркасной последовательности 6RNMSC1-2_F02 в каркасную последовательность эмбрионального типа, следующие модификации вносили в каркасную последовательность 6RNMSC1-2_F02: VH_Met108Leu, VL_Thr07Ser, VL_Ser11Leu, VL_Leu15Pro, VL_Gln17Glu, VL_Leu36Tyr, VL_Gln37Leu, VL_Arg39Lys, VL_Pro43Ser, VL_Arg45Gln, VL_His49Tyr, VL_Ala67Ser и VL_Asn70Asp (числа соответствуют нумерации Kabat). Вариант был назван F02h011/F021003 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи: SEQ ID NO: 95; последовательность вариабельной области легкой цепи: SEQ ID NO: 96). Tm F02h011/F021003, экспрессированного и очищенного способом, описанным в справочном примере 1-1, измеряли с использованием DSC. Измерение посредством DSC проводили способом, известным специалистам в данной области. Tm варианта 6RNMSC1-2_F02, к которому были добавлены эти модификации, увеличилась от 82,9 до 85,2°C, продемонстрировав стабилизацию структуры. Более того, связывание F02h011/F021003 с кинуренином измеряли способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что время добавления разбавленных растворов антигена и подвижного буфера в качестве пустого образца было модифицировано до 30 с и было подтверждено, что F02h011/F021003 сохраняет связывание кинуренина. Параметры кинетики связывания кинуренина были определены следующим образом: ka=3664 (1/c), kd=0,40 (1/c) и KD=0,11 (ммоль/л). Сенсограммы, демонстрирующие результаты оценки, показаны на фиг. 32. Иногда является предпочтительным использование высокостабильных каркасных областей для библиотек антител; таким образом, F02h011/F021003 использовали в качестве каркасной последовательности в примерах (8-2-3) и (9-2), описанных ниже. Каркасные последовательности представлены в табл. 16.

Таблица 16

Каркасная область	SEQ ID NO	
Каркасная область 1 тяжелой цепи	87	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
Каркасная область 2 тяжелой цепи	88	WVRQAPGQGLEWMG
Каркасная область 3 тяжелой цепи	89	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
Каркасная область 4 тяжелой цепи	90	WGQGTLVTVSS
Каркасная область 1 легкой цепи	91	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
Каркасная область 2 легкой цепи	92	WYLQKPGQSPQLLIY
Каркасная область 3 легкой цепи	93	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
Каркасная область 4 легкой цепи	94	WYLQKPGQSPQLLIY

(8-2-4) Поиск модификации, которые увеличивают связывание F02h011/F021003 с кинуренином

Остатки, предположительно вовлеченные в связывание 6RNMSC1-2_F02 с кинуренином, прогнозировали на основе результатов, описанных в примерах (8-1) и (8-2-1). В дополнение к этим остаткам проводили поиск остатков, для которых можно ожидать увеличение связывание кинуренина посредством модификации.

В частности, исходя из кристаллографической структуры комплекса Fab-фрагмента антитела и кинуренина, были выбраны аминокислотные остатки, находящиеся в пределах 4,2 ангстрем от кинуренина, как показано на фиг. 34. В результате были впервые обнаружены Tyr32 и ArG100a тяжелой цепи (нумерация Kabat) и Leu46 легкой цепи (нумерация Kabat). Более того, поскольку CDR3 тяжелой цепи представляет собой петлю CDR, которая в наиболее высокой степени участвует в связывании кинуренина и модификация остатков в этой петле может непрямо влиять на связывание кинуренина, аминокислотные остатки модифицировали в стольких положениях, в скольких это было возможно. Однако следующие остатки исключали из кандидатов для модификации участков остатков: Asp95 тяжелой цепи, который образует прочную водородную связь с Arg96 легкой цепи и определяет структуру петли; ArG100a тяжелой цепи, который образует водородную связь с Glu50 легкой цепи и определяет структуру петли; и Pro100b тяжелой цепи, боковая цепь которого ориентировала в противоположном направлении относительно кинуренина и для которого взаимодействие с кинуренином нельзя ожидать, даже после внесения модификации. Между тем, Ser56 легкой цепи, хотя и отдален от кинуренина, как показано на фиг. 35, был выбран в качестве участка модификации остатков, поскольку его боковая цепь ориентирована в направлении кинуренина и модификация аминокислотным остатком длиннее Ser, возможно привести к взаимодействию с кинуренином. Более того, результат, описанный в примере (9-2) ниже, показал, что активность связывания кинуренина увеличивалась при замене Gly50 тяжелой цепи и Asp28 легкой цепи на Ala. Поскольку эти участки остатков не являются положениями, которые могут прямо взаимодействовать с кинуренином (фиг. 36), они предположительно вносят непрямой вклад путем стабилизации всего Fab при связывании с кинуренином. Более того, что касается этих участков остатков, модификация на остатки, отличные от Ala, возможно может приводить к дальнейшему повышению связывания кинуренина; таким образом, эти положения остатков также были выбраны в качестве участков для всестороннего изменения. Исследование того, можно ли идентифицировать модификации, которые предположительно приведут к эффекту увеличения способности к связыванию кинуренина, проводили посредством исчерпывающей оценки вариантов, в которых эти остатки были модифицированы в различные аминокислоты.

Такие участки модификаций в F02h011/F021003, сконструированном согласно примеру (8-2-3) (положения согласно нумерации Kabat, которые указаны как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице) и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 17.

Таблица 17

		HCDR1	HCDR2	HCDR3										LCDR1	LFR2		LCDR2	
	Kabat	32	50	96	97	98	99	100	100c	100d	100e	101	102	28	46	49	55	56
	Нативная последовательность	Y	G	A	P	V	V	A	R	G	A	D	I	D	L	Y	F	S
Измененная аминокислота	A	A	A		A	A	A		A	A		A	A	A		A	A	A
	D	D	D	D	D			D	D	D	D		D			D		D
	E	E	E	E	E			E	E	E		E	E	E	E	E		E
	F	F	F	F	F	F		F	F	F			F	F	F	F		F
	G	G		G	G			G	G				G	G		G		G
	H	H	H	H	H			H	H	H			H	H	H	H		H
	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I			I		I		I
	K	K	K	K	K			K	K	K			K	K		K		K
	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L		L	L		L	L	L
	M	M	M	M	M			M	M	M			M	M		M	M	M
	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N	N	N		N		N
	P	P	P	P				P	P	P			P	P		P		P
	Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q
	R	R	R	R	R			R		R			R	R		R	R	R
	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S		S		
	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T		T	T		T		
	V	V	V	V	V			V	V	V	V		V	V		V		V
	W	W	W	W	W			W	W	W			W	W		W	W	W
	Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			Y	Y	Y		Y	Y

Связывание каждого варианта, экспрессированного и очищенного способом, описанным в справочном примере 1 ниже, с кинуренином измеряли способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что время добавления разбавленных растворов антигена и подвижного буфера в качестве пустого образца было модифицировано до 30 с. Между тем, тип сенсорного чипа, на котором был иммобилизован белок A, заменяли на сенсорный чип серии S CM3 (GE Healthcare) для измерения некоторых из вариантов. Когда диссоциация кинуренина была слишком быстрой, чтобы определить константу скорости диссоциации константу диссоциации KD (M) вычисляли посредством анализа равновесных величин на основе степени ответа связывания в процессе взаимодействия с каждым антигеном (фаза ассоциации). В этом случае также использовали Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) для вычисления параметров. На основе результата анализа аффинность каждого варианта в отношении кинуренина вычисляли в качестве величин KD. Результат сравнения величин KD каждого из вариантов и F02h011/F021003 в отношении кинуренина показан в табл. 18.

Таблица 18

		HCDR1	HCDR2	HCDR3										LCDR1	LFR2		LCDR2	
	Kabat	32	50	96	97	98	99	100	100c	100d	100e	101	102	28	46	49	55	56
	Нативная последовательность	Y	G	A	P	V	V	A	R	G	A	D	I	D	L	Y	F	S
Измененная аминокислота	A	0,0	3,1		0,5	0,1	0,5		0,1	0,1		0,0	0,4	2,5		0,0	0,1	0,9
	D	0,0	0,0	0,0	0,0			0,6	0,0	0,0	0,0		0,7			0,0		0,5
	E	0,0	0,0	0,4	0,1			0,8	0,0	0,0		0,0	0,5	1,7	0,0	0,0		0,5
	F	0,3	1,8	0,8	0,0	0,1		0,9	0,0	0,0			0,6	2,0	0,0	0,7		1,3
	G	0,0		0,0	0,0			1,3	0,0				0,1	1,5		0,0		0,9
	H	0,4	0,6	1,6	0,0			0,6	2,5	0,1			0,7	2,6	0,1	1,2		1,1
	I	0,0	2,7	0,4	0,0	0,2		1,0	0,0	0,0	0,0			2,1		0,0		1,3
	K	0,0	1,9	1,3	0,1			0,6	0,7	0,0			0,2	1,8		0,0		1,0
	L	0,0	1,0	0,1	0,0	0,2		1,2	0,0	0,0	0,0		0,3	0,0		0,0	0,3	0,8
	M	0,0	2,3	0,1	0,0			0,6	0,0	0,2			0,4	2,1		0,0	0,7	1,0
	N	0,0	1,6	0,7	0,4			0,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,4	1,5		0,2		0,7
	P	0,0	0,0	0,0				0,0	0,0	0,0			0,0	3,2		0,0		0,7
	Q	0,0	0,3	2,1	0,0			0,6	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4	1,8		0,0		0,7
	R	0,0	1,0	0,3	0,0			0,5		0,0			0,2	1,2		0,0	0,2	1,2
	S	0,0	2,7	0,5	0,4		0,5	0,5	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,9		0,1		
	T	0,0	1,5	0,5	0,0	0,3		0,4	0,0	0,0	0,0		0,3	1,4		0,0		
	V	0,0	7,0	1,9	0,0			0,6	0,0	0,0	0,0		0,6	2,1		0,0		2,8
	W	0,0	1,8	6,5	0,0			1,1	0,0	0,0			0,7	2,2		0,3	0,0	1,4
	Y		3,3	0,3	0,0	0,2		0,9	0,1	0,0			0,6	3,2	0,0		1,0	1,5

Среди модификаций, которые предположительно приводят к повышению связывания кинуренина, последовательность, в которую была добавлена модификация Lch_Ser56Tyr, была названа F02h011/F021098 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи: SEQ ID NO: 95; последовательность вариабельной области легкой цепи: SEQ ID NO: 97). Последовательность использовали в качестве матричной последовательности для библиотеки. Связывание F02h011/F021098 с кинуренином измеряли способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что время добавления разбавленных растворов антигена и подвижного буфера в качестве пустого раствора было модифи-

цировано до 30 с и тип сенсорного чипа с иммобилизованным белком А заменяли на сенсорный чип серии S CM3 (GE Healthcare). Были определены следующие параметры кинетики для связывания F02h011/F021098 с кинуренином: ka=3686 (1/c), kd=0,26 (1/c) и KD=0,072 (ммоль/л). Сенсограммы, демонстрирующие результаты оценки, показаны на фиг. 33.

(8-3) Оценка всесторонних вариантов для конструирования библиотеки на основе результаты рентгеноструктурного анализа

Кристаллографическую структуру комплекса 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина анализировали, как описано в примере (8-1). Способ распознавания, посредством которого антитело распознает кинуренин, и аминокислотные остатки вариабельной области антитела, которые предположительно не вовлечены в значительной степени в связывание кинуренина, устанавливали, исходя из результата кристаллографического анализа структуры. Было предположено, что посредством всесторонней оценки вариантов, остатки которых, показанные ниже, заменены каждой из аминокислот, можно было определить участки, которые могут быть преобразованы в библиотеку, и аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку. В частности, было предположено, что, посредством оценки участков, которые не вовлечены в значительной степени в связывание кинуренина, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от участков нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с кинуренином (не сводят связывание к нулю), а также можно определить аминокислотные участки, которые могут быть преобразованы в библиотеку, и аминокислоты, которые могут быть преобразованы в библиотеку. Несколько вариантов было получено путем внесения модификаций в эти остатки в F02h011/F021098, которое было получено согласно примеру (8-2-4) и в котором была добавлена модификация, которая повышает связывание кинуренина.

Среди участков тяжелой цепи, модифицированные участки (участки, показанные согласно нумерации Kabat и указанные как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице), и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 19.

Таблица 19

		FR1						HCDR1		HCDR2								FR3	HCDR3							
	Kabat	24	26	27	28	29	30	31	33	51	52	52a	53	54	55	56	58	73	95	98	99	100a	100b	100c	100f	101
	Нативная последовательность	A	G	G	T	F	S	S	A	I	I	P	I	F	G	T	N	E	D	V	V	R	P	A	F	D
Измененная аминокислота	A		A	A	A	A	A											A								
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		D	D	D	D		D	
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E	E	E	E	E	E	
	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F		F	F	F	F		F
	G	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I	I	I	I	I	I	I	I	I			I		I	I	I	I	I	I		I	I	I		I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L		L	L
	M	M					M											M								
	N	N		N			N	N	N	N	N	N	N		N	N			N	N	N	N	N		N	
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S		S	
	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T		T	T	T		T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V			V	V		V	V
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y

Среди участков легкой цепи модифицированные участки (участки, показанные согласно нумерации Kabat и указанные как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице) и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 20.

Таблица 20

		LCDR1				FR2	LCDR2						LCDR3			
	Kabat	27d	27e	29	32	46	50	51	52	53	54	55	92	93	94	96
	Нативная последова-тельность	H	S	G	Y	L	E	I	S	N	R	F	T	Q	F	R
Измененная аминокислота	A					A										
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	E	E	E	E	E			E	E	E	E	E	E	E	E	E
	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F		F	F		F
	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	H		H	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	M					M	M	M								
	N	N	N			N		N	N		N	N	N	N	N	N
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	
	S	S		S		S	S	S		S	S		S	S	S	S
	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T			T	T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Связывание каждого варианта, экспрессированного и очищенного способом, описанным в справочном примере 1 ниже, с кинуренином измеряли способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что время добавления разбавленных растворов антигена и подвижного буфера в качестве пустого образца было модифицировано до 30 с. Между тем, тип сенсорного чипа, на котором был иммобилизован белок A, заменяли на сенсорный чип серии S CM3 (GE Healthcare) для измерения некоторых из вариантов. Когда диссоциация кинуренина была слишком быстрой, чтобы определить константу скорости диссоциации, константу диссоциации KD (M) вычисляли посредством анализа равновесных величин на основе степени ответа связывания в процессе взаимодействия с каждым антигеном (фаза ассоциации). В этом случае также использовали Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) для вычисления параметров. На основе результата анализа аффинность каждого варианта в отношении кинуренина вычисляли в качестве величин KD. Результат сравнения величин KD каждого из вариантов тяжелой цепи F02h011/F021098, которое представляет собой родительскую последовательность, в отношении кинуренина показан в табл. 21. Результат сравнения величин KD каждого из вариантов легкой цепи F02h011/F021098, которое представляет собой родительскую последовательность, в отношении кинуренина показан в табл. 22.

Таблица 21

		FR1						HCDR1		HCDR2								FR3	HCDR3							
	Kabat	24	26	27	28	29	30	31	33	51	52	52a	53	54	55	56	58	73	95	98	99	100a	100b	100e	100f	101
	Нативная последова-тельность	A	G	G	T	F	S	S	A	I	I	P	I	F	G	T	N	E	D	V	V	R	P	A	F	D
Измененная аминокислота	A		4,5	2,0	0,6	0,0	1,0											1,1								
	D	2,1	2,5	4,6	0,7	0,0	0,8	2,6	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,6	1,2	0,7	0,4	0,9		0,0	0,2	0,4	0,0		0,0	
	E	11,0	2,0	6,0	1,1	0,0	1,1	2,4	0,0	0,1	0,4	0,0	0,2	0,4	0,7	0,7	0,2		0,0	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	
	F	0,4	2,6	4,9	1,2		1,5	1,1	0,0	0,2	0,3	0,0	0,5		0,3	1,2	0,7	0,8	0,0		3,4	0,1	0,0	0,0		0,0
	G	1,4			0,7	0,0	0,4	1,3	0,4	0,4	0,1	0,3	0,8	0,8		0,3	0,8	1,1	1,2	0,0	0,1	0,0	0,1	1,4	0,0	0,0
	H	1,5	2,5	3,3	0,6	0,0	1,2	1,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,5	0,7	1,3	0,8	1,0	0,9	0,0	0,0	0,8	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
	I	0,8	4,3	2,6	1,4	0,3	0,9	0,4	2,5			0,1		0,9	0,3	1,1	0,1	1,1	0,0		1,0	0,5	0,0		0,0	0,0
	K	1,1	7,9	3,4	0,5	0,0	1,1	1,0	0,3	0,4	0,7	0,0	0,5	0,8	0,8	0,9	1,1	1,1	0,0	0,0	0,4	0,7	1,5	0,0	0,0	0,0
	L	0,9	5,3	4,4	1,1	0,5	2,0	1,3	0,2	0,3	0,5	0,0	0,8	0,7	0,5	1,6	0,1	2,0	0,0		0,6	0,4	0,0		2,2	0,0
	M	1,9					1,2											1,6								
	N	2,6		4,8			1,1	0,9	0,0	0,2	0,4	0,0	0,4		1,8	0,6			0,0	0,0	0,5	0,3	0,3		0,0	
	P	0,8	11,0	1,8	0,4	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5		0,5	1,1	0,6	0,7	0,3	1,0	0,0	0,0	0,0	1,2		0,0	0,0	0,0
	Q	1,1	4,0	3,4	0,9	0,0	1,0	1,8	0,2	0,5	0,7	0,0	0,4	0,6	1,2	0,8	1,0	0,9	0,0	0,0	0,4	0,6	0,3		0,0	
	R	0,3	9,1	4,2	0,5	0,0	1,1	0,8	0,4	0,7	0,3	0,0	0,5	0,8	0,5	0,9	1,6	1,3	0,0	0,2	0,7		0,5	0,0	0,0	0,0
	S	2,1	1,6	3,4	1,0	0,0			0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,8	0,9	0,8	0,7	1,0	0,0	0,0		0,4	0,4		0,0	
	T	3,6	2,1	3,3		0,0	1,5	0,5	0,4	0,3	0,6	0,2	0,8	0,9	0,6		1,1	1,3	0,0		0,5	0,5	0,2		0,0	0,0
	V	1,0	4,9	4,4	0,8	0,2	1,0	0,5	0,7	1,8	1,0	0,0	1,2	0,8	0,4	0,8	0,6	1,4	0,0			0,6	0,0		0,0	0,0
	W	0,5	7,6	9,7	23,6	0,3	1,5	1,2	8,3	0,2	0,5	0,2	0,3	1,0	1,0	5,2	1,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
	Y	2,2	4,6	20,6	0,7	0,5	1,2	0,8	0,0	0,6	0,3	0,0	0,5	1,1	0,5	0,9	1,5	0,4	0,0		1,9	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0

Таблица 22

		LCDR1				FR2	LCDR2						LCDR3			
	Kabat	27d	27e	29	32	46	50	51	52	53	54	55	92	93	94	96
	Нативная последова-тельность	H	S	G	Y	L	E	I	S	N	R	F	T	Q	F	R
Измененная аминокислота	A					0,0										
	D	1,9	0,9	1,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	1,1	0,8	0,0	1,2	0,9	0,0	0,0
	E	1,3	0,9	0,9	0,2			0,3	1,0	0,9	0,9	0,0	0,4	1,6	0,0	0,0
	F	0,6	0,9	1,0	2,0		0,5	0,4	1,1	1,0	0,9		0,9	0,5		0,0
	G	1,1	0,9		0,3	0,0	0,4	0,4	1,0	0,5	0,9	0,1	1,4	0,4	0,2	0,0
	H		1,0	1,0	0,8		0,0	0,2	0,9	0,9	1,2	0,1	1,0	0,1	0,4	0,0
	I	2,3	0,9	1,2	0,0	0,4	0,4		1,0	1,2	0,8	0,1	2,2	0,6	0,9	0,0
	K	1,1	1,0	1,1	0,5	0,0	0,2	0,3	1,2	1,2	0,9	0,1	1,1	0,6	0,4	0,0
	L	1,8	0,9	1,0	0,4		0,8	0,2	0,9	1,4	0,8	0,2	1,0	0,4	0,2	0,0
	M					0,4	1,9	0,4	0,9							
	N	2,3	1,0			0,3		0,2	0,8		0,7	0,1	1,8	1,1	0,2	0,0
	P	2,3	0,9	1,8	0,4	0,1	0,0	0,0	0,1	0,6	1,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
	Q	1,4	1,0	1,0	0,3	0,0	0,8	0,4	1,2	1,0	1,0	0,1	1,4		0,2	0,0
	R	0,9	1,1	0,9	0,9	0,0	0,0	0,5	1,2	1,1		0,1	0,9	0,7	0,3	
	S	1,0		0,9		0,0	0,2	0,4		0,8	0,9		0,9	0,8	0,2	0,0
	T	2,0	1,0	0,9		0,0	0,3	0,4	1,0	0,7	0,6			1,7	0,4	0,0
	V	2,5	1,0	1,2	0,3	0,6	0,2	0,6	1,1	1,0	0,7	0,1	1,7	1,0	0,8	0,0
	W	0,6	1,0	1,1	0,3	0,0	0,0	0,3	1,0	1,0	0,9	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
	Y	0,6	1,2	1,0			0,2	0,3	1,1	1,1	1,2	1,3	0,9	0,5	1,1	0,0

(8-4) Конструирование библиотеки на основе результата оценки всесторонних вариантов

Для конструирования библиотеки участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из следующих условий, выбирали в качестве участков, подходящих для конструирования библиотеки, на основе информации, полученной согласно примерам (8-2-4) и (8-3) и примеру (9-2), описанным ниже.

Условие 1: участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание кинуренина, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от аминокислот нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с кинуренином;

Условие 2: участки, имеющие определенный уровень разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антитела; и

Условие 3: участки, которые не являются важными для формирования канонических структур.

Из результатов оценки, представленных в примерах (8-2-4) и (8-3) и примере (9-2), описанных ниже, когда участки, для которых существует по меньшей мере один или несколько вариантов, у которых величины KD в отношении кинуренина превышают 2 0% относительно родительской последовательности при каждой оценке, те участки считали подходящими для модификации участками, которые удовлетворяют описанным выше условиям. Среди аминокислот, замещенных в этих участках, аминокислоты, у которых величины KD в отношении кинуренина превышают 20% относительно родительской последовательности при каждой оценке, считали подходящими для конструирования библиотеки аминокислотами (нестрогие остатки, появление которых в библиотеке можно обеспечить). Библиотеку для получения антител с кинуренином в качестве переключателя конструируют посредством конструирования библиотеки, в которой по меньшей мере любые одна или несколько аминокислот среди аминокислот, содержащихся в репертуаре аминокислот, которые включают аминокислоты, подходящие для конструирования библиотеки, выбранные в анализе вариантов (нестрогие остатки, появление которых в библиотеке можно обеспечить) и аминокислоты немодифицированного антитела (т.е. аминокислоты, включенные в нативную последовательность F02h011/F021098), находятся в определенных подходящих для модификации участках F02h011/F021098, которое было получено согласно примеру (8-2-4) и которому добавлена модификация, которая повышает связывание кинуренина. Участки, содержащие репертуар аминокислот в тяжелой цепи, и репертуары аминокислот в этих участках показаны в табл. 23. Участки, содержащие репертуар аминокислот в легкой цепи, и репертуар аминокислот в этих участках показаны в табл. 24. В таблицах участки, показанные согласно нумерации Kabat, указанные как "Kabat" соответствуют поддающимся модификации участкам; аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" соответствуют немодифицированным аминокислотам в этих участках; и аминокислоты, указанные как "аминокислоты, подходящие для конструирования библиотеки" соответствуют аминокислотам, подходящим для конструирования библиотеки в этих участках. Конструировали библиотеку, в которой по меньшей мере любая одна аминокислота из аминокислот, содержащихся в выбранном репертуаре аминокислот, находятся в каждом из поддающихся модификации участков.

Таблица 23

		FR1						HCDR1			HCDR2									FR3	HCDR3												
	Kabat	24	26	27	28	29	30	31	32	33	50	51	52	52a	53	54	55	56	58	73	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	102
	Нативная последовательность	A	G	G	T	F	S	S	Y	A	G	I	I	P	I	F	G	T	N	E	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	I
Измененная аминокислота	A		A	A	A		A	A			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			A		A		A	A					A
	D	D	D	D	D		D	D							D	D	D	D	D	D					D	D	D						D
	E	E	E	E	E		E	E					E		E	E	E	E	E			E				E	E						E
	F	F	F	F	F		F	F	F		F		F		F		F	F	F	F		F			F	F							F
	G	G			G		G	G		G		G		G	G	G		G	G	G	G					G					G		
	H	H	H	H	H		H	H	H		H		H		H	H	H	H	H	H		H			H	H			H				H
	I	I	I	I	I	I	I	I		I	I					I	I	I		I		I			I	I	I						
	K	K	K	K	K		K	K		K	K	K	K		K	K	K	K	K	K		K			K	K	K	K	K				
	L	L	L	L	L	L	L	L			L	L	L		L	L	L	L		L				L	L	L	L					L	L
	M	M					M				M									M						M							M
	N	N		N			N	N			N		N		N		N	N				N	N		N	N	N	N		N			N
	P	P	P	P	P		P						P		P	P	P	P	P	P							P						
	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q		Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q			Q	Q	Q	Q	Q				Q
	R	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R		R	R	R	R	R	R		R			R	R		R					R
	S	S	S	S	S					S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S		S	S	S	S			S		
	T	T	T	T			T	T		T	T	T	T	T	T	T	T		T	T		T		T	T	T	T					T
	V	V	V	V	V		V	V		V	V	V	V		V	V	V	V	V	V		V				V	V						V
	W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W			W				W							W
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y			Y	Y							Y

Таблица 24

		LCDR1					FR2		LCDR2						LCDR3		
	Kabat	27d	27e	28	29	32	46	49	50	51	52	53	54	55	92	93	94
	Нативная последовательность	H	S	D	G	Y	L	Y	E	I	S	N	R	F	T	Q	F
Измененная аминокислота	A	A	A	A	A	A			A	A	A	A	A		A	A	
	D	D	D		D					D	D	D	D		D	D	
	E	E	E	E	E					E	E	E	E		E	E	
	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F		F	F	
	G	G	G	G		G			G	G	G	G	G		G	G	
	H	H	H	H	H	H		H			H	H	H		H		H
	I	I	I	I	I		I		I		I	I	I		I	I	I
	K	K	K	K	K	K			K	K	K	K	K		K	K	K
	L	L	L		L	L			L	L	L	L	L	L	L	L	
	M			M			M		M	M				M			
	N	N	N	N			N				N		N		N	N	N
	P	P	P	P	P	P						P	P				
	Q	Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q
	R	R	R	R	R	R				R	R	R		R	R	R	R
	S	S		S	S				S	S		S	S		S	S	S
	T	T	T	T	T				T	T	T	T	T			T	T
	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V		V	V	V
	W	W	W	W	W	W		W		W	W	W	W		W		W
	Y	Y	Y	Y	Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Гены, содержащие каждую из последовательностей, включенных в библиотеку, сконструированную таким образом, синтезируют и с использованием коллекции (библиотеки) этих индивидуальных генов в качестве матрицы библиотеку генов амплифицируют с помощью праймеров, которые могут амплифицировать каждую из VH и VL. Амплифицированную библиотеку генов рационально сконструированных вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека и вариабельных областей легкой цепи антитела человека вносят в соответствующие фагмидные векторы, имеющие как происходящую из IgG человека последовательность CH1, так и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи. Рационально сконструированную библиотеку, которая обеспечивает получение антител, которые связываются с антигеном с использованием кинуренина в качестве переключателя, конструируют путем введения этих фагмидных векторов в Escherichia coli посредством электропорации, а затем презентации Fab-доменов, состоящих из вариабельной области-константной области антитела человека. Полагают, что такая рационально сконструированная библиотека, состоящая из разнообразных H-цепей и L-цепей, обладающих активностью связывания с кинуренином, является пригодной в качестве библиотеки, содержащей антитела человека, которые позволяют эффективное получение антител с кинуренином в качестве переключателя против произвольных антигенов. Более того, поскольку, как описано в примере

(7-6), 6RNMSC1-2_F02 связывается не только с кинуренином, но также и с 3-гидроксикинуренином, который является метаболитом кинуренина и производных кинуренина, включая RO0635389-000-001, также спрогнозировано, что оно обладает активностью связывания с другими производными, которые структурно сходны с кинуренином. Таким образом, библиотеку конструируют, чтобы она была пригодной для получения антител с переключателем, активность связывания которых с произвольным антигеном-мишенью варьируется в зависимости от присутствия или отсутствия любых одного или нескольких низкомолекулярных соединений из кинуренина, метаболитов кинуренина и производных кинуренина, которые являются экзогенными молекулами.

Пример 9. Конструирование библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя посредством пэннинга с молекулой, действующей в качестве переключателя

В примере 8 описан способ конструирования библиотеки с использованием антитела, обладающего активностью связывания с кинуренином в качестве матрицы, и конструирования участков для получения библиотеки посредством всесторонней модификации. В качестве другого подхода для получения библиотеки также является пригодным способ, в котором используется пэннинг с молекулой, которая служит в качестве переключателя.

(9-1) Рентгеноструктурный анализ антитела 6RNMSC1-2_F02, которое связывается с hIL-6R с кинуренином в качестве переключателя

Кристаллическую структуру комплекса 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина анализировали, как описано в примере (8-1). Способ, посредством которого кинуренин распознается антителом, а также аминокислотные остатки в вариабельной области антитела, предположительно не вовлеченные в значительной степени в связывание кинуренина, были идентифицированы, исходя из результатов кристаллографического анализа.

(9-2) Оценка для выбора участков, подходящих для конструирования библиотеки, и конструирование библиотеки

Авторы настоящего изобретения предположили, что участки, подходящие для конструирования библиотеки, можно выбирать посредством оценки вариантов, образующихся посредством замены посредством Ala или Val различных положений, выбранных, исходя из кристаллографического анализа F02h011/F021003 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи, SEQ ID NO: 95; последовательность вариабельной области легкой цепи, SEQ ID NO: 96), полученного, как описано в примере (8-2-2).

(9-2-1) Оценка для выбора участков, подходящих для конструирования библиотеки, в вариабельной области тяжелой цепи, и конструирование библиотеки

Сначала, что касается тяжелой цепи, среди участков, содержащихся в последовательности тяжелой цепи F02h011/F021003, получали варианты путем замены на Ala или Val различных положений, выбранных на основе результатов кристаллографического анализа. Модифицированные участки (положения согласно нумерации Kabat, которые указаны как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице), и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 25.

Таблица 25

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
Kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
Нативная последовательность	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
Измененная аминокислота	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

	HCDR3													
Kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
Нативная последовательность	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
Измененная аминокислота	A	V	A	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	A

Каждый вариант, экспрессированный и очищенный способом, описанным в справочном примере 1 ниже, оценивали в отношении его связывания с кинуренином способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что период загрузки антигена изменяли до 30 с. Когда диссоциация кинуренина была слишком быстрой, чтобы определить константу скорости диссоциации константу диссоциации KD (M) вычисляли посредством анализа равновесных величин на основе степени ответа связывания в процессе взаимодействия с каждым антигеном (фаза ассоциации). В этом случае также использовали Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) для вычисления параметров. На основе результата вычисляли величины KD для определения аффинности каждого варианта в отношении кинуренина. Каждый вариант и его родительское антитело F02h011/F021003 сравнивали с точки зрения величины KD в отношении кинуренина. Результаты представлены в табл. 26.

Таблица 26

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
Kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
Нативная последовательность	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
Измененная аминокислота	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Соотношение F02h011/F021003	0,9	1,7	0,0	0,7	0,7	6,9	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,8	0,8	0,7

	HCDR3													
Kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
Нативная последовательность	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
Измененная аминокислота	A	V	A	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	A
Соотношение F02h011/F021003	0,0	1,9	0,5	0,1	0,5	0,6	0,3	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4

При конструировании библиотеки участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из следующих условий, выбирали в качестве участков, подходящих для конструирования библиотеки, на основе информации, полученной с помощью описанной выше оценки вариантов и оценки, описанной в примере (8-2-4).

Условие 1: участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание кинуренина, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от аминокислот нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с кинуренином (не сводят связывание к нулю);

Условие 2: участки, имеющие определенный уровень разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антитела; и

Условие 3: участки, которые не являются важными для формирования канонических структур.

Конструировали библиотеку так, чтобы аминокислоты в положениях, выбранных согласно описанным выше условиям, появлялись только в определенных нуклеотидах в последовательности тяжелой цепи (SEQ ID NO: 95) F02h011/F021098, полученного, как описано в примере (8-2-4), посредством внесения модификации, которая усиливает связывание кинуренина. Такие библиотеки включают, например, библиотеки NNK и TRIM (Gonzalez-Munoz A et al., MAbs 2012; Lee CV et al., J Mol Biol. 2004; Knappik A. et al., J Mol Biol. 2000; Tiller T et al., MAbs 2013). Среди различных оцененных положений участки модификации, в которых величина KD в отношении кинуренина указывает более чем на 20% связывание F02h011/F021003, которое является родительской последовательностью, считали поддающимися модификации положениями, которые удовлетворяют описанным выше условиям. Однако, даже если они были включены в такие участки, положения остатки, считавшиеся структурно важными, были исключены из участков, подлежащих включению в библиотеку, или были преобразованы в библиотеку с выбранными типами встречающихся аминокислот. Участки для получения библиотеки с использованием кодонов NNK (указанных посредством незакрашенного круга в таблице), участки, фиксированные согласно нативной последовательности (указаны крестом в таблице), и аминокислоты выбранных встречающихся типов аминокислот показаны в табл. 27.

Таблица 27

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
Kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
Нативная последовательность	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
Библиотека	○	○	×	○	×	○	I,F,V,L	○	×	×	○	G,S	○	○

	HCDR3													
Kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
Нативная последовательность	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
Библиотека	×	○	A,P	×	○	○	○	A,P	R,H	×	×	×	×	×

Сконструированную последовательность гена синтезировали с использованием праймеров, содержащих в участках, предназначенных для продуцирования библиотеки (библиотека вариабельной области тяжелой цепи) кодоны NNK или кодоны, в которых встречаются выбранные аминокислоты; и встраивали в соответствующий фагмидный вектор, содержавший происходящую из IgG человека последовательность CH1 и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи в комбинации с последовательностью вариабельной области легкой цепи F02h011/F021098(родительская последовательность, SEQ ID NO: 97). Библиотеку фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека, способных связываться с антигеном через кинуренин в качестве переключателя, конструировали путем введения фагмидного вектора в E. coli посредством электропорации.

(9-2-2) Оценка для выбора участков, поддающихся конструированию библиотеки, в вариабельной области легкой цепи, и конструирование библиотеки

Далее, из участков, содержащихся в последовательности легкой цепи F02h011/F021003, получали различные модифицированные варианты путем замены на Ala или Val различных положений, выбранных на основе результатов кристаллографического анализа. Модифицированные участки (положения согласно нумерации Kabat, которые указаны как "Kabat" в таблице), аминокислоты до модификации в этих участках (аминокислоты, указанные как "нативная последовательность" в таблице), и аминокислоты после модификации (аминокислоты, указанные как "измененные аминокислоты" в таблице) показаны в табл. 28.

Таблица 28

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
Нативная последовательность	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
Измененная аминокислота	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	A	A	A	A

Каждый вариант, экспрессированный и очищенный способом, описанным в справочном примере 1 ниже, оценивали в отношении его связывания с кинуренином способом на основе Biacore, описанным в примере (7-5), за исключением того, что период загрузки антигена изменяли до 30 с. Когда диссоциация кинуренина была слишком быстрой, чтобы определить константу скорости диссоциации константу диссоциации KD (M) вычисляли посредством анализа равновесных величин на основе степени ответа связывания в процессе взаимодействия с каждым антигеном (фага ассоциации). В этом случае также использовали Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) для вычисления параметров. На основе результатов вычисляли величины KD для определения аффинности каждого варианта в отношении кинуренина. Каждый вариант и его родительское антитело F02h011/F021003 сравнивали с точки зрения величины KD в отношении кинуренина. Результаты представлены в табл. 29.

Таблица 29

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
Нативная последовательность	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
Измененная аминокислота	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	A	A	A	A
Соотношение F02h011/F021003	0,7	0,9	2,5	1,0	0,7	0,5	1,0	0,8	0,8	0,1	0,9	0,3	0,9	1,0	0,1	0,0

При конструировании библиотеки участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из следующих условий, выбирали в качестве участков, подходящих для конструирования библиотеки, на основе информации, полученной с помощью описанной выше оценки вариантов и оценки, описанной в примере (8-2-4).

Условие 1: участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание кинуренина, или участки, в которых присутствуют аминокислоты, отличные от аминокислот нативной последовательности, которые могут быть вовлечены в связывание, но не снижают в значительной степени связывание с кинуренином (не сводят связывание к нулю);

Условие 2: участки, имеющие определенный уровень разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антитела; и

Условие 3: участки, которые не являются важными для формирования канонических структур.

Конструировали библиотеку так, чтобы аминокислоты в положениях, выбранных согласно описанным выше условиям, появлялись только в определенных нуклеотидах в последовательности легкой цепи (SEQ ID NO: 97) F02h011/F021098, полученного, как описано в примере (8-2-4), посредством внесения модификации, которая усиливает связывание кинуренина. Такие библиотеки включают, например, библиотеки NNK и TRIM. Среди различных оцененных положений участки модификации, в которых величина KD в отношении кинуренина указывает более чем на 20% связывание F02h011/F021003, которое является родительской последовательностью, считали поддающимися модификации положениями, которые удовлетворяют описанным выше условиям. Однако, даже если они были включены в такие участки, положения остатки, считавшиеся структурно важными, были исключены из участков, подлежащих включению в библиотеку, или были преобразованы в библиотеку с выбранными типами встречающихся аминокислот. Участки для получения библиотеки с использованием кодонов NNK (указанных посредством незакрашенного круга в таблице), участки, фиксированные согласно нативной последовательности (указаны крестом в таблице), и аминокислоты выбранных встречающихся типов аминокислот показаны в табл. 30.

Таблица 30

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
Нативная последовательность	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
Библиотека	o	o	o	o	×	Y,F	o	o	o	×	Y	×	o	o	×	×

Сконструированную последовательность гена синтезировали с использованием праймеров, содержащих в участках, предназначенных для продуцирования библиотеки (библиотека вариабельной области тяжелой цепи), кодоны NNK или кодоны, в которых встречаются выбранные аминокислоты; и встраивали в соответствующий фагмидный вектор, содержащий происходящую из IgG человека последовательность CH1 и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи в комбинации с последовательностью вариабельной области тяжелой цепи F02h011/F021098(родительская последовательность, SEQ ID NO: 95). Библиотеку фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи антитела человека, способных связываться с антигеном через кинуренин в качестве переключателя, конструировали путем введения фагмидного вектора в E. coli посредством электропорации.

(9-3) Синтез биотинилированного кинуренина для конструирования связывающей кинуренин библиотеки

Как показано в примере (7-6), производные кинуренина также выполняют функцию переключателя для 6RNMSC1-2_F02. В их структуре производные имеют замену в любом из положений 3, 4 и 5 кинуренина. Кроме того, результат кристаллографического анализа комплекса 6RNMSC1-2_F02 и кинуренина позволяет прогнозирование того, что биотин, внесенный в положение 3, 4 или 5 кинуренина, не препятствует связыванию 6RNMSC1-2_F02 с антигеном hIL-6R. Таким образом, является предпочтительным, чтобы соответствующий линкер (такой как линкер PEG) был связан с положением 3, 4 или 5, и биотин был присоединен к концу линкера.

Пример биотинилированного кинуренина по настоящему изобретению описан ниже. Биотинилированный кинуренин по настоящему изобретению можно синтезировать различными способами. Некоторые из них проиллюстрированы с использованием представленных ниже схем. Схемы являются примером, и настоящее изобретение не ограничиваются химическими реакциями и условиями, показанными в настоящем описании. Репрезентативные соединения по настоящему изобретению можно синтезировать с использованием соответствующих промежуточных соединений, известных соединений и реагентов.

(9-3-1) Синтез биотинилированных соединений, в которых линкер связан с положением 4 кинуренина

Биотинилированные соединения кинуренина 028 и 029 можно получать способом, описанным ниже. Биотинилированные соединения кинуренина и синтетические промежуточные соединения анализировали в условиях, описанных ниже.

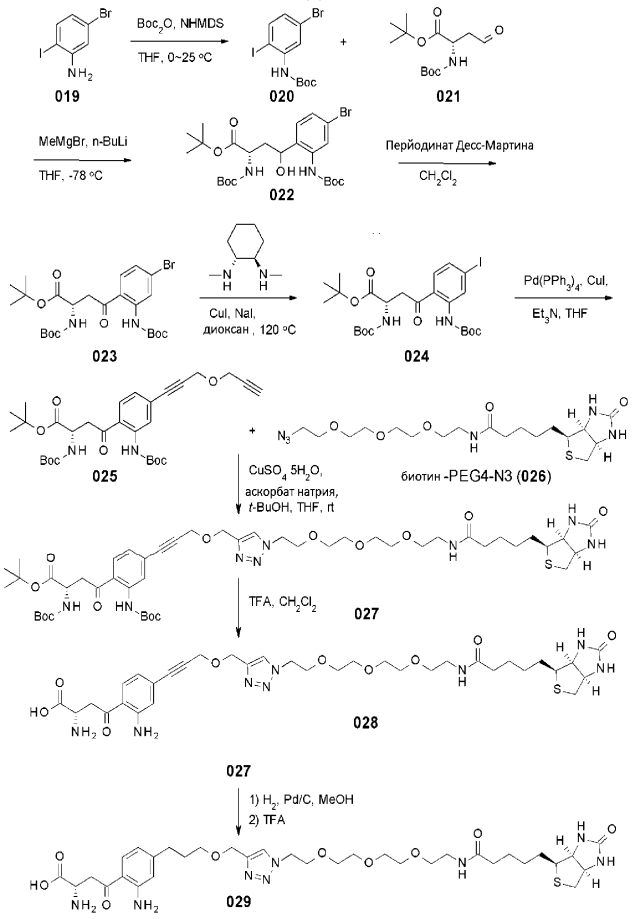
Условия анализа LCMS являются такими, как показано далее.

Таблица 31

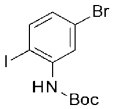
Условия анализа	Устройство	Колонка (диаметр частиц, длина внутренний диаметр)	Подвижная фаза	Градиент (A/B)	Скорость потока (мл/мин)	Температура колонки (°C)	Длина волны
A	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2,2 мкм, 50 мм, 3,0 мм)	A: вода/0,05% TFA B: Ацетонитрил/0,05% TFA	95/5 (0,01 мин), 0/100 (1,20 мин), 0/100 (2,20 мин), 95/5 (2,30 мин)	1	40	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
B	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2,2 мкм, 50 мм, 3,0 мм)	A: вода/0,05% TFA B: Ацетонитрил/0,05% TFA	95/5 (0,01 мин), 0/100 (2,20 мин), 0/100 (3,20 мин), 95/5 (3,30 мин)	1	40	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование

C	Shimadzu LCMS-2020	ACQUITY UPLC BEH C 18 (1,7 мкм, 50 мм, 2,1 мм)	A: вода/0,05% TFA B: Ацетонитрил/ 0,05% TFA	95/5 (0,01 мин), 0/100 (1,20 мин), 0/100 (1,90 мин), 95/5 (2,00 мин)	1	45	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
D	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2,2 мкм, 50 мм, 3,0 мм)	A: вода/0,05% TFA B: Ацетонитрил/ 0,05% TFA	95/5 (0,01 мин), 35/65 (4,50 мин), 35/65 (5,60 мин), 95/5 (5,70 мин)	1	40	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
E	Shimadzu LCMS-2020	ACQUITY UPLC BEH C 18 (1,7 мкм, 50 мм, 2,1 мм)	A: вода/0,05% TFA B: Ацетонитрил/ 0,05% TFA	95/5 (0,01 мин), 0/100 (1,00 мин), 0/100 (1,80 мин), 95/5 (1,90 мин)	1	45	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
F	Shimadzu LCMS-2020	Ascentis Express C18 (2,7 мкм, 50 мм, 3,0 мм)	A: вода/0,1% FA B: Ацетонитрил/ 0,05% FA	90/10 (0,01 мин), 0/100 (1,10 мин), 0/100 (1,60 мин), 90/10 (1,70 мин)	1,5	40	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
G	Shimadzu LCMS-2020	Phenomenex kinetex (2,6 мкм, 50 мм, 3,0 мм)	A: вода/0,1% FA B: Ацетонитрил/ 0,05% FA	90/10 (0,01 мин), 0/100 (2,00 мин), 0/100 (2,70 мин), 90/10 (2,80 мин)	1,5	40	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование
H	Aquity Ultra Performance	Ascentis Express C18 (2,7 мкм, 50 мм, 2,1 мм)	A: вода/0,1% FA B: Ацетонитрил/ 0,05% FA	60/40 (0,01 мин), 0/100 (1,40 мин), 0/100 (1,40 мин), 60/40 (3,0 мин)	1	25	190-800 нм, PDA, тотальное сканирование

Соединение 26



Соединение 27

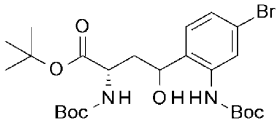


Бис(триметилсилил)амид натрия (38% раствор тетрагидрофурана, 1,9 моль/л, 21,6 мл, 41,1 ммоль) добавляли в течение 15 мин к раствору тетрагидрофурана (100 мл), содержавшему 5-бром-2-йоданилин (соединение 019, 4,90 г, 16,5 ммоль, COMBI-BLOCKS) и ди-трет-бутилдикарбонат (7,54 г, 41,1 ммоль) при 0°C в потоке газообразного азота. После перемешивания при 0°C в течение 30 мин, а затем при комнатной температуре в течение 18 ч, реакционный раствор разбавляли этилацетатом (300 мл). После промывания 1 М хлористоводородной кислотой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным солевым раствором, смесь сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/гексан). Это дало соединение 020 (6,14 г, 90%).

LCMS (ESI) m/z=342, 344 (M-Bu+H)+

Время удержания: 0,97 минуты(условия H анализа)

Соединение 28

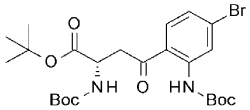


Метилмагнийбромид (1 М, 33,2 мл, 33,2 ммоль) добавляли к раствору N-трет-бутокси-(5-бром-2-йодфенил)карбамата (соединение 020, 12,0 г, 30,2 ммоль) в тетрагидрофуране (120 мл) при -78°C в потоке газообразного азота и смесь перемешивали при той же температуре в течение 1 ч. Затем после добавления н-бутиллития (2,5 М, 13,3 мл, 33,3 ммоль) смесь перемешивали при -78°C в течение 2 ч. К описанной выше смеси добавляли раствор (2S)-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-4-оксобутаноата (соединение 021, 4,20 г, 15,4 ммоль; Roberts et al., Bioorg.Med. Chem. Letters, 13 (2), 265-267 (2003)) в тетрагидрофуране (15 мл) при -78°C в течение 30 мин и смесь далее перемешивали при той же температуре в течение 2 ч. К реакционному раствору добавляли 1 М хлористоводородную кислоту. Реакционный раствор экстрагировали три раза этилацетатом. После промывания 1 М хлористоводородной кислотой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным солевым раствором, собранный органический слой концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 022 (7,50 г, 89%).

LCMS (ESI) m/z=569 (M+Na)+

Время удержания: 1,93 мин (условия A анализа)

Соединение 29

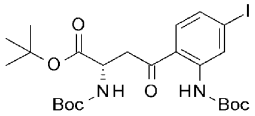


К раствору соединения 022 (7,50 г, 13,8 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли перйодинан Десс-Мартина (11,7 г, 27,6 ммоль) при 25°C, и смесь перемешивали в течение 2 ч. После разбавления этилацетатом реакционную смесь промывали водным раствором тиосульфата натрия, водным раствором гидрокарбоната натрия и насыщенным солевым раствором, и концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этил ацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 023 (5,80 г, 78%).

LCMS (ESI) m/z=565 (M+Na)+

Время удержания: 1,78 мин (условия A анализа)

Соединение 30

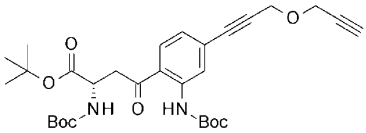


Раствор, содержавший соединение 023 (2,50 г, 4,58 ммоль), йодид меди(I) (438 мг, 2,3 0 ммоль), (1R, 2R)-(-)-N,N'-диметилциклогексан-1,2-диамин (654 мг, 4,60 ммоль) и йодид натрия (1,40 г, 9,34 ммоль), в диоксане (60 мл) перемешивали при 120°C в атмосфере азота в течение 16 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 024 (1, 60 г, 59%).

LCMS (ESI) m/z=613 (M+Na)+

Время удержания: 1,95 мин (условия B анализа)

Соединение 31

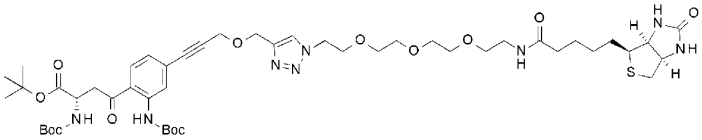


Раствор, содержавший соединение 024 (1,60 г, 2,71 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладий (627 мг, 0,54 ммоль), йодид меди (103 мг, 0,54 ммоль), бис (2-пропиниловый) эфир (893 мг, 9,49 ммоль) и триэтиламин (960 мг, 9,49 ммоль), в тетрагидрофуране (20 мл) перемешивали при 25°C в атмосфере азота в течение 16 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 025 (700 мг, 46%).

LCMS (ESI) m/z=579 (M+Na)+

Время удержания: 2,68 минуты(условия B анализа)

Соединение 32

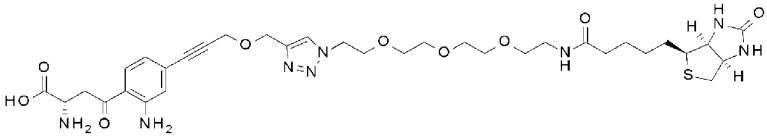


Смешанный раствор, содержавший соединение 025 (60,0 мг, 0,11 ммоль), биотин-PEG4-N3 (соединение 026, 60,0 мг, 0,13 ммоль), сульфат меди пентагидрат (10,0 мг, 0,040 ммоль) и водный раствор 1 M аскорбата натрия (пять капель), в трет-бутаноле (2,0 мл) и тетрагидрофуране (2,0 мл) перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (метанол/дихлорметан). Это дало соединение 027 (100 мг, 91%).

LCMS (ESI) m/z=1001 (M+H)+

Время удержания: 1,40 мин (условия C анализа)

Соединение 33

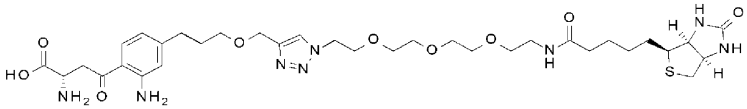


Трифторуксусную кислоту (2,0 мл) добавляли к раствору соединения 027 (100 мг, 0,10 ммоль) в дихлорметане (10 мл) и смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией. Это дало соединение 028 (27,8 мг, 37%).

LCMS (ESI) m/z=745 (M+H)+

Время удержания: 2,14 мин (условия D анализа)

Соединение 34



Газообразный водород пропускали в течение пяти часов через раствор, содержавший соединение 027 (100 мг, 0,10 ммоль) и палладий/уголь (20 мг), в метаноле (10 мл). После фильтрации реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. К раствору осадка в дихлорметане (10 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией. Это дало соединение 029 (13,5 мг, 18%).

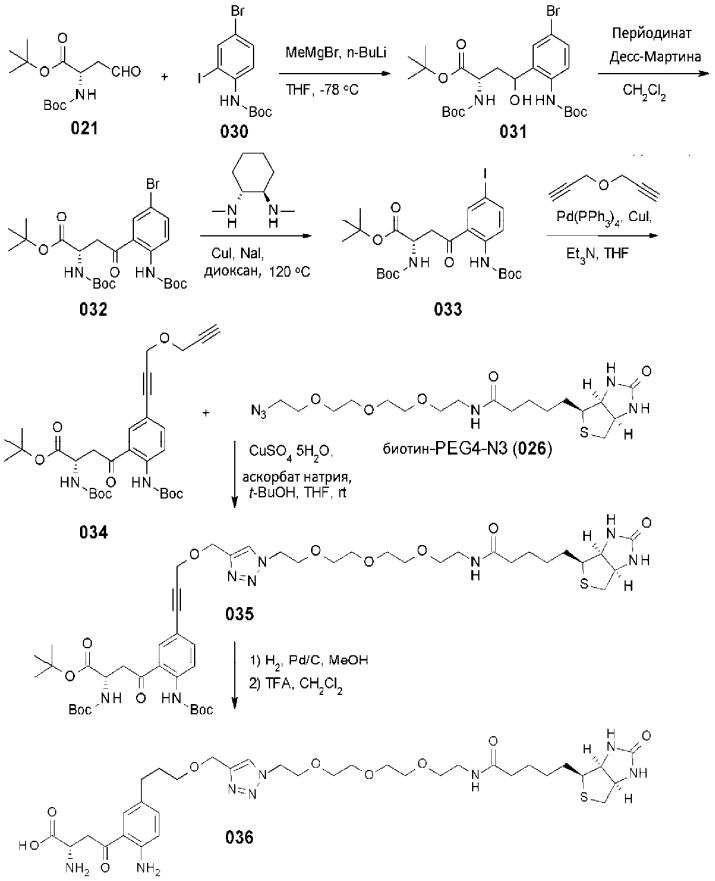
LCMS (ESI) m/z=749 (M+H) +

Время удержания: 1,20 мин (условия B анализа) (9-3-2)

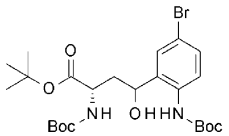
Синтез биотинилированных соединений, в которых линкер связан с положением 5 кинуренина

Биотинилированное соединение кинуренина 036 можно получать способом, описанным ниже.

Соединение 35



Соединение 36

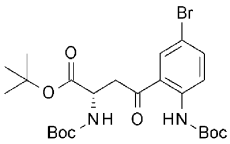


Метилмагнийбромид (1 М, 20 мл, 20 ммоль) добавляли к раствору N-трет-бутокси-(4-бром-2-йодфенил)карбамата (Wensbo et al., Tetrahedron, 51 (37), 10323-10342 (1995)) (соединение 030, 7,50 г, 18,8 ммоль) в тетрагидрофуране (80 мл) -78°C в потоке газообразного азота. Смесь перемешивали при той же температуре в течение 20 мин. Затем после добавления н-бутиллития (2,5 М, 10 мл, 25 ммоль) смесь перемешивали при -78°C в течение 30 мин. К этому раствору добавляли раствор (2S)-2-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-4-оксабутаноата (соединение 021, 2,57 г, 9,40 ммоль) в тетрагидрофуране (20 мл) в течение 30 минут при -78°C. Смесь далее перемешивали в течение 1 ч при той же температуре. После добавления 1 М хлористоводородной кислоты реакционный раствор экстрагировали три раза этилацетатом. Собранный органический слой промывали 1 М хлористоводородной кислотой, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и насыщенным солевым раствором и сушили над сульфатом натрия. Осадок, полученный концентрированием при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 031 (4,56 г, 89%).

LCMS (ESI) m/z=569 (M+Na)+

Время удержания: 1,78 мин (условия А анализа)

Соединение 37



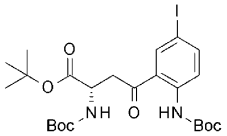
Перйодинан Десс-Мартина (8,89 г, 21,0 ммоль) добавляли к раствору соединения 031 (4,56 г, 8,36 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 25°C. Смесь перемешивали в течение 3 ч. После добавления водного раствора тиосульфата натрия реакционную смесь экстрагировали три раза дихлорметаном. Объединенный органический слой промывали водным раствором гидрокарбоната натрия и сушили над сульфатом натрия. Осадок, полученный концентрированием при пониженном давлении, очищали нормально-

фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 032 (3,60 г, 79%).

LCMS (ESI) m/z=567 (M+H)+

Время удержания: 1,90 мин (условия E анализа)

Соединение 38

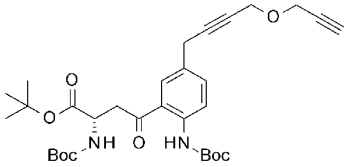


Раствор, содержавший соединение 032 (3,60 г, 6,62 ммоль), йодид меди (I) (650 мг, 3,41 ммоль), (1R, 2R) -(-)-N,N'-диметилциклогексан-1,2-диамин (940 мг, 6,61 ммоль) и йодид натрия (1,98 г, 13,2 ммоль) в диоксане (60 мл), перемешивали при 120°C в атмосфере азота в течение 16 ч. Осадок, полученный посредством концентрирования реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 033 (3,10 г, 79%).

LCMS (ESI) m/z=613 (M+Na)+

Время удержания: 1,33 мин (условия E анализа)

Соединение 39

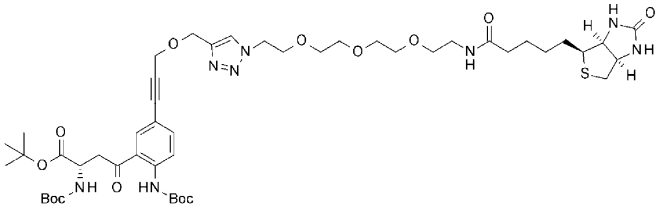


Раствор соединения 033 (3,10 г, 5,25 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладия (1,21 г, 1,05 ммоль), йодида меди (200 мг, 1,05 ммоль), бис (2-пропинилового) эфира (1,73 мг, 18,4 ммоль) и триэтиламина (1,86 г, 18,4 ммоль) в тетрагидрофуране (20 мл) перемешивали при 25°C в атмосфере азота в течение 16 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир). Это дало соединение 034 (1,00 г, 34%).

LCMS (ESI) m/z=579 (M+Na)+

Время удержания: 1,28 мин (условия E анализа)

Соединение 40

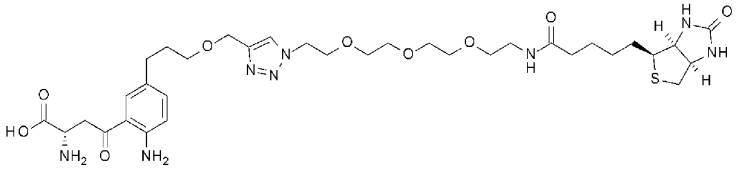


Смешанный раствор трет-бутанола (2 мл) и тетрагидрофуране (2 мл), содержавший соединение 034 (90,0 мг, 0,20 ммоль), БИОТИН-PEG4-N3 (соединение 026, 90,0 мг, 0,16 ммоль), сульфат меди пентагидрат (10 мг, 0,040 ммоль) и водный раствор 1 М аскорбата натрия (10 капель) перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией на силикагеле (метанол/дихлорметан). Это дало соединение 035 (155 мг, 76%).

LCMS (ESI) m/z=1001 (M+H)+

Время удержания: 1,13 мин (условия F анализа)

Соединение 41



Газообразный водород пропускали в течение четырех часов через раствор, содержавший соединение 035 (85,0 мг, 0,080 ммоль) и палладий/уголь (10 мг) в метаноле (10 мл). После фильтрации реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и к раствору полученного осадка в дихлорметане (5,0 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Осадок, полученный концентрированием реакционной смеси при пониженном давлении, очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией. Это дало соединение 036 (18, 9 мг, 31, 6%).

LCMS (ESI) m/z=749 (M+H)+

Время удержания: 0,70 мин (условия G анализа)

(9-4) Получение группы кинуренинсвязывающих антител с использованием библиотек фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи

С использованием биотинилированного кинуренина, синтезированного, как описано в примере (9-3), проводили пэннинг для получения группы антител, которые специфически связываются с кинуренином, из соответствующих библиотек фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, сконструированных, как описано в примерах (9-2-1) и (9-2-2). Для описанной выше цели сначала фаги, презентирующие антитела, которые обладают активностью связывания с магнитными гранулами в отсутствие биотинилированного кинуренина, удаляли путем приведения в контакт библиотеки фагового дисплея антител с магнитными гранулами в отсутствие биотинилированного кинуренина. Затем, в присутствии биотинилированного кинуренина проводили пэннинг аналогичным образом для скрининга антител, которые обладают специфической активностью связывания с биотинилированным кинуренином. E.coli, содержавшие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), культивировали при 30°C в течение ночи и фаги собирали из супернатанта. Для преципитации группы фагов к культуре E.coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Группу фагов разбавляли TBS с получением раствора мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с антигеном, иммобилизованном на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или Streptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl).

Пэннинг проводили с использованием способа отрицательной селекции для сбора фагов, которые специфически связываются с кинуренином. Пэннинг проводили индивидуально для каждого из трех типов биотинилированного кинуренина (соединения 028, 029 и 036), синтезированного, как описано в примере (9-3). В частности, 0,8 мл полученной суспензии фаговой библиотеки добавляли к блокированным BSA магнитным гранулам (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl), и позволяли связываться в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение дополнительных 30 мин при 4°C. Гранулы отделяли с использованием магнитного стенда для сбора фагов, которые не связывались с гранулами. Этот процесс повторяли. Отдельно приготовленным блокированным посредством BSA магнитным гранулам (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl) позволяли реагировать с 6 нмоль биотинилированного кинуренина при комнатной температуре в течение 30 мин для иммобилизации биотинилированного кинуренина на магнитных гранулах.

Биотинилированные магнитные гранулы с иммобилизованным кинуренином промывали три раза TBST, и к ним добавляли собранные фаги. Фаговую библиотеку приводили в контакт с биотинилированным кинуренином в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение дополнительных 30 мин при 4°C. Гранулы промывали два раза 1 мл ледяного TBST, а затем один раз ледяным TBS. Затем к гранулам добавляли 0,5 мл TBS, содержавшего трипсин, в конечной концентрации 1 мг/мл. Сразу после суспендирования гранул при комнатной температуре в течение 15 мин суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Фаги, элюированные раствором трипсина, добавляли к 60 мл E. coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на три чашки размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи для сбора раствора мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител.

С использованием способа отрицательной селекции аналогично первом пэннингу, второй пэннинг проводили индивидуально для каждого из трех типов биотинилированного кинуренина для сбора фагов, которые специфически связываются с кинуренином. В частности, сначала магнитные гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) блокировали 2% обезжиренным молоком-TBS, в которое было добавлено 5 мкл 5 мг/мл рекомбинантного стрептавидина (Roche). Магнитные гранулы промывали три раза TBST, в который было добавлено 0,8 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной 4% BSA, и позволяли связываться при комнатной температуре в течение 30 мин. Гранулы отделяли с использованием магнитного стенда для сбора фагов, которые не связывались с гранулами. Этот процесс повторяли. Отдельно полученным магнитным гранулам (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated), блокированным 2% обезжиренным молоком-TBS, в которое было добавлено 5 мкл рекомбинантного стрептавидина (Roche) в концентрации 5 мг/мл, позволяли реагировать с 10 нмоль биотинилированного кинуренина в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение дополнительных 30 мин при 4°C, для иммобилизации биотинилированного кинуренина на магнитных гранулах. Магнитные гранулы с иммобилизованным биотинилированным кинуренином промывали три раза TBST, и к ним добавляли собранные фаги. Фаговую библиотеку приводит в контакт с биотинилированным кинуренином в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение дополнительных 30 мин при 4°C. Гранулы промывали три раза 1 мл ледяного TBST и два раза ледяным TBS. Затем, к гранулам добавляли 0,5 мл TBS, содержавшего трип-

син, в конечной концентрации 1 мг/мл, и сразу после суспендирования гранул при комнатной температуре в течение 15 мин суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Из 0,5 мл фагов, элюированных раствором трипсина, 50 мкл добавляли к 60 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на три планшета 225 мм×225 мм.

(9-4-2) Оценка активности связывания в отношении биотинилированного кинуренина с использованием ELISA фагов

Из единичной колонии E.coli, полученной, как описано в примере (9-4-1), содержащий фаг культуральный супернатант собирали общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). Мультивалентные фаги дисплея антител собирали с использованием гиперфагов в качестве фагов-помощников, и подвергали ELISA. 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 80 мкл TBS, содержавшего три типа биотинилированного кинуренина (смесь, содержавшая равные количества соединений 028, 029 и 036) в течение одного часа или более. После удаления биотинилированного кинуренина, не связанного со стрептавидином, путем промывания каждой из лунок планшета TBST, лунки блокировали 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение одного часа или более. После удаления 2% обезжиренного-TBS, очищенные фаги добавляли в каждую лунку. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить презентирующим антитело фагам связаться с биотинилированным кинуренином, в каждой лунке. Каждую лунку промывали TBST, а затем в лунки добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промываний TBST хромогенную реакцию раствора в каждой лунке с добавленным простым раствором TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем измеряли развитие окраски по поглощению при 450 нм. В результате было подтверждено, что несколько антител связываются с биотинилированным кинуренином. Результаты ELISA фагов показаны в табл. 32.

Таблица 32

Библиотека	Библиотека тяжелой цепи			Библиотека легкой цепи		
Зонд для пэннинга	Соединение 028	Соединение 029	Соединение 036	Соединение 028	Соединение 029	Соединение 036
Количество раундов пэннинга	2	2	2	2	2	2
Количество клонов, подвергнутых ELISA	96	96	96	96	96	96
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	23	17	33	30	17	63
Количество последовательностей положительных клонов	23	17	33	30	17	63

(9-4-3) Анализ последовательности антител, которые связываются с биотинилированным кинуренином

С использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80) амплифицировали гены с клонов, которые были определены как обладающие специфической активностью связывания с кинуренином, исходя из результатов ELISA фагов, показанных в примере (9-4-2). Нуклеотидные последовательности генов анализировали и результат анализа показал, что последовательности клонов, для которых было определено, что они обладают активностью связывания кинуренина, были независимыми друг от друга.

(9-5) Конструирование библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя посредством пэннинга с кинуренином

Поскольку фаги, связывающие антиген (кинуренин), полученные из каждой из библиотек фагового дисплея вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, представляют собой популяцию, обладающую способностью связывать кинуренин, ожидалось, что презентирующая Fab фаговая библиотека, сконструированная путем комбинирования этих двух библиотек, будет содержать большое количество клонов, которые сохраняют связывание с кинуренином в качестве переключателя, подразумевая возможность конструирования библиотеки, которая позволяет более эффективное выделение антител с кинуренином в качестве переключателя.

С использованием способа, известного специалистам в данной области, гены экстрагировали из E.coli, инфицированных каждой из фаговых библиотек тяжелой цепи и легкой цепи, полученных, как описано в примере (9-4). Для тяжелой цепи библиотеку генов амплифицировали с использованием праймеров (SEQ ID NO: 98 и 99), способных амплифицировать вариабельную область тяжелой цепи, с использованием коллекции полученных генов (библиотека вариабельных областей тяжелой цепи) в качестве матрицы. Что касается легкой цепи, последовательность вариабельной области тяжелой цепи (матричная последовательность библиотеки: SEQ ID NO: 95) F02h011/F021098 вырезали из коллекции полу-

ченных генов (библиотека вариабельных областей легкой цепи) обработкой ферментом рестрикции для конструирования фагмидного вектора, содержащего ген библиотеки вариабельной области легкой цепи, происходящую из IgG человека последовательность константной области и происходящую из IgG человека последовательность CH1. Ген библиотеки вариабельной области тяжелой цепи встраивали в сконструированный фагмидный вектор, содержавший ген библиотеки вариабельной области легкой цепи, для конструирования фагмидного вектора, в который были встроены гены библиотеки вариабельных областей тяжелой цепи/легкой цепи человека. Сконструированную библиотеку, которая экспонирует Fab-домен, состоящий из вариабельной области-константной области антитела человека, которая позволяет выделение антител, которые связываются с антигеном через кинуренин в качестве переключателя, конструировали путем введения фагмидного вектора в E. coli посредством электропорации. Ожидается, что такая сконструированная библиотека, состоящая из различных H-цепей и L-цепей, обладающих активностью связывания кинуренина, будет пригодной в качестве библиотеки, содержащей антитела человека, которые позволяют эффективное выделение антител с кинуренином в качестве переключателя против произвольного антигена. Более того, как показано в примере (7-6), поскольку 6RNMSC1-2_F02 связывается не только с кинуренином, но также и с его метаболическими продуктами: 3-гидроксикинуренином и 3-гидрокси-DL-кинуренином, и с производными кинуренина, такими как RO0635389-000-001 и RO0635390-000-001, ожидается, что библиотека, описанная выше, будет пригодной для выделения антител с переключателем, активность связывания которых с произвольным антигеном-мишени варьируется в зависимости от присутствия любых одной или нескольких из низкомолекулярных соединений: кинуренина, метаболических продуктов кинуренина и производных кинуренина.

Пример (9-6) Оценка клонов в библиотеки в отношении их способности связывать кинуренин способом ELISA фагов

Поскольку библиотека, сконструированная, как описано в примере (9-5), была получена посредством пэннинга с кинуренином, было спрогнозировано, что библиотека будет содержать большое количество клонов, обладающих способностью связывать кинуренин.

Клоны фагов, выделенные из сконструированной библиотеки, оценивали в отношении их связывания с биотинилированным кинуренином, способом ELISA фагов.

Фаги культивировали общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) из единичной колонии E.coli, содержавших гены сконструированной библиотеки. Культуральные супернатанты, содержавшие мультивалентные фаги дисплея антител, собирали с использованием гиперфагов в качестве фагов-помощников. Собранные культуральные супернатанты фагов фильтровали посредством ультрафильтрации с использованием NucleoFast96 (MACHERY-NAGEL). 200 мкл каждого из культуральных супернатантов наносили в каждую из лунок NucleoFast96 и центрифугировали при 6000 g в течение 45 мин. Прошедшие фракции удаляли. Промывание проводили добавлением в лунки 200 мкл H_2O и центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Затем добавляли 200 мкл TBS, оставляли стоять при комнатной температуре на 5 мин, а затем собирали суспензии фагов, содержавшиеся в супернатантах.

После добавления TBS очищенные фаги подвергали ELISA тем же способом, который описан в примере (9-4-1). В результате было подтверждено, что несколько антител связываются с биотинилированным кинуренином. Среди проанализированных клонов фагов, происходящих из первичной библиотеки, было обнаружено, что приблизительно 49% обладают способностью связывать кинуренин. Результаты ELISA фагов показаны в табл. 33.

Таблица 33

Количество клонов, подвергнутых ELISA	192
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	94
Процент положительных клонов	48,96%

Пример 10. Оценка белков, которые связываются с антигеном через низкомолекулярное соединение небиологического происхождения в качестве переключателя

Антитела (справочный пример 3, описанный ниже), которые способны связываться с рецептором IL-6 человека (hIL-6R) в присутствии ATP или аденозина, которые были получены из библиотеки, сконструированной на основе антитела ATNLSA1-4_D12, которое связывается с ATP и аденозином, оценивали в отношении их способности связывать рецептор IL-6 человека в присутствии низкомолекулярного соединения небиологического происхождения.

(10-1) Получение антител с ATP/аденозином в качестве переключателей, полученных из библиотеки

Каждую из последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи клонов 6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2Cl-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085 и 6RDL3C5-4_011, которые были получены, как описано в справочном примере 3 ниже, и для которых было определено, что они обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии ATP или аденозина, встраивали в плазмиду с IgG1/лямбда человека для экспрессии у животных, содержащих последовательность константной области тяжелой цепи

(SEQ ID NO: 46) или константной области лямбда антитела (SEQ ID NO: 100). Антитела экспрессировали с использованием способа, описанного ниже. Клетки линии Freestyle 293-F (Invitrogen), которые происходят из клеток почки эмбриона человека, суспендировали при плотности клеток $1,33\times10^6$ клеток/мл в среде для экспрессии Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen), и 3-мл суспензии высевали в каждую лунку 6-луночных планшетов. Полученную плазмиду вводили в клетки способом липофекции. После культивирования в течение четырех суток в инкубаторе с CO_2 (37°C, 8% CO_2, 90 об./мин.), антитела очищали из культуральных супернатантов способом, способ известным специалистам в данной области, с использованием rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Поглощение растворов очищенных антител измеряли при 280 нм с использованием спектрофотометра. Из величин, полученных при измерении, вычисляли концентрации очищенных антител с использованием коэффициента экстинкции, определенного способом PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(10-2) Оценка различных низкомолекулярных соединений в отношении их эффекта на связывание с рецептором IL-6 человека способом поверхностного плазмонного резонанса

Biacore T200 (GE Healthcare) использовали для оценки различных низкомолекулярных соединений в отношении их эффекта на реакцию антиген-антитело между hIL-6R и девятью клонами антитела, зависимого от ATP/аденозина (6RAD2Cl-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2Cl-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085 и 6RDL3C5-4_011), выделенного из библиотеки. Использованный подвижный буфер представлял собой 20 ммоль/л ACES, 150 ммоль/л NaCl, 0,05%(мас./об.) Tween20, pH 7,4. Анализ проводили при 25°C. hIL-6R иммобилизовывали на сенсорном чипе CM5 способом присоединения аминов и подвергали взаимодействию с антителами в качестве анализируемого соединения в течение 120 с для выявления изменений уровня связывания. Антитела разбавляли подвижным буфером или подвижным буфером с добавлением любого из ATP, ADP, AMP, cAMP и аденозина (ADO). Конечную концентрацию каждого низкомолекулярного соединения доводили до 1 мМ, и конечную концентрацию антитела доводили до 1 мкМ. Между тем, в условиях 1 мМ ATP анализ проводили с серией пошаговых концентраций антител. Константу диссоциации K_D (моль/л) каждого клона в отношении hIL-6R вычисляли из графика равновесных величин против концентрации антитела. Параметры вычисляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare). Константа диссоциации K_D каждого клона в присутствии 1 мМ ATP показана в табл. 34.

Таблица 34

Название клона	Константа диссоциации K_D (моль/л)
6RAD2C1-4_01	3,0E-0,7
6RAD2C1-4_05	3,4E-0,7
6RAD2C1-4_11	2,3E-0,7
6RAD2C1-4_26	2,1E-0,7
6RAD2C1-4_30	3,3E-0,7
6RAD2C1-4_42	2,5E-0,7
6RAD2C1-4_76	2,5E-0,7
6RDL3C1-4_85	3,9E-0,7
6RDL3C5-4_11	1,3E-0,7

Уровень связывания каждого клона с hIL-6R в отсутствие или в присутствии каждого низкомолекулярного соединения в концентрации 1 мМ, полученный посредством этого измерения, показан на фиг. 37. Как показано на фиг. 37, каждый клон связывался с hIL-6R в присутствии 1 мМ ATP, в то время как в отсутствие ATP связывание с hIL-6R не наблюдалось. Таким образом, было подтверждено, что клоны обладают свойством связывания с hIL-6R с использованием ATP в качестве переключателя. Что касается низкомолекулярных соединений помимо ATP, было обнаружено, что все клоны связываются в присутствии of ADP, и также было обнаружено, что некоторые клоны связываются в присутствии AMP и cAMP. В присутствии ADO (аденозин) связывание hIL-6R не наблюдалось.

(10-3) Оценка различных низкомолекулярных соединений в отношении их эффекта на связывание с рецептором IL-6 человека с использованием Octet

Octet (PRIMETECH) использовали для оценки различных низкомолекулярных соединений в отношении их эффекта на реакцию антиген-антитело между hIL-6R и девятью клонами ATP/аденозин-зависимых антител (6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085 и 6RDL3C5-4_011), полученными из библиотеки. Анализ проводили при 30°C с использованием TBS, pH 7,4 в качестве буфера для анализа. Биотинилированный hIL-6R иммобилизовывали на сенсорном чипе со стрептавидином и подвергали взаимодействию с антителами для выявления изменений уровня связывания. Антитела разбавляли буфером для анализа или буфером для анализа с добавлением любого из ATP, ADP, AMP, cAMP, ADO и ATP-gamma-S. Конечную концентрацию каждого низкомолекулярного соединения доводили до 1 мМ и конечную

концентрацию антитела доводили до 10 мкг/мл.

Результаты оценки в отношении связывания с hIL-6R каждого клона в отсутствие или в присутствия каждого низкомолекулярного соединения при 1 мМ, полученные посредством этого измерения, продемонстрировали, что все клоны связывались с hIL-6R в присутствии 1 мМ ATP. В отсутствие ATP связывание hIL-6R не наблюдалось. Таким образом, Octet также продемонстрировал, что клоны обладали свойством связывания с hIL-6R с использованием ATP в качестве переключателя. Более того, для всех клонов наблюдали связывание в присутствии ATP-gamma-S. Количество IL6R, связанного в отсутствие или в присутствии 1 мМ ATP или ATP-gamma-S, полученное посредством оценки, показано на фиг. 38. Данные, описанные выше, демонстрируют, что hIL-6R-связывающие антитела, для которых ATP и иго производные (молекулы ex-vivo) функционируют в качестве переключателя, можно было выделить из библиотеки.

Пример 11 Получение антител, которые связываются с рецептором IL-6 в присутствии кинуренина, посредством пэннинга библиотеки с кинуренином для выделения антител с кинуренином в качестве переключателя (библиотека кинуренина Ver.A)

(11-1) Получение антител, которые обладают активностью связывания с рецептором IL-6 человека в присутствии кинуренина, но не в отсутствие кинуренина, из библиотеки антител

Библиотеку фагового дисплея для получения антител с кинуренином в качестве переключателя (обозначаемая как библиотека кинуренина Ver.A), которая была сконструирована, как описано в примере 9, посредством пэннинга с кинуренином, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания рецептора IL-6 человека (hIL-6R) в присутствии кинуренина. В частности, собирали фаги, презентирующие антитела, которые обладают активностью связывания с hIL-6R, уловленные на гранулах в присутствии кинуренина, но элюированные с гранул в отсутствие кинуренина. В этом способе выделения в качестве антигена использовали меченный биотином hIL-6R.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E. coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

Первый пэннинг проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, вместе с 250 пмоль меченного биотином антигена, добавляли кинуренин в конечной концентрации 500 мкм, к 0,5 мл полученной суспензии фаговой библиотеки, и, таким образом, фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем при 4°C в течение 45 мин. Добавляли блокированные BSA магнитные гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при 4°C в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза 0,5 мл ледяного кинуренина/TBST и один раз ледяным кинуренином/TBS. Сразу после суспендирования гранул, к которым было добавлено 0,25 мл TBS, при комнатной температуре, суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Этот процесс повторяли, а затем две суспензии фагов, элюированные по отдельности, объединяли вместе. К собранной суспензии фагов добавляли пять микролитров трипсина в концентрации 100 мг/мл для отщепления Fab. Это повышало способность обработанных трипсином фагов инфицировать E. coli. Обработанные трипсином фаги добавляли к 10 мл E. coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E. coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентнои библиотеки дисплея антител.

Во втором пэннинге, вместе с кинуренином в конечной концентрации 500 мкМ, 250 пмоль меченного биотином антигена добавляли к 0,4 мл полученной суспензии фаговой библиотеки и таким образом фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 60 мин. Добавляли блокированные BSA магнитные гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза 0,5 мл кинуренина/TBST и один раз кинуренином/TBS. Сразу после суспендирования гранул, к которым было добавлено 0,25 мл TBS, при комнатной температуре, суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Этот процесс повторяли, а затем две суспензии фагов, элюированные по отдельности, объединяли вместе. К собранной суспензии фагов добавляли пять микролитров трипсина в концентрации 100 мг/мл для отщепления Fab. Это повышало способность обработанных трипсином фагов инфициро-

вать E.coli. Обработанные трипсином фаги добавляли к 20 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E. coli. Инфицированные E.coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентнои библиотеки дисплея антител.

В третьем пэннинге вместе с кинуренином в конечной концентрации 500 мкМ, 100 пмоль меченного биотином антигена добавляли к 0,2 мл полученной суспензии фаговой библиотеки, и таким образом фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 60 мин. Добавляли блокированные BSA магнитные гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1), и комплексу антиген/фаг позволяли связаться с магнитными гранулами при 4°C в течение 30 мин. Гранулы промывали три раза 0,4 мл кинуренина/TBST и два раза кинуренином/TBS. Сразу после суспендирования гранул, к которым было добавлено 0,25 мл TBS, при комнатной температуре, суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Этот процесс повторяли, а затем две суспензии фагов, элюированные по отдельности, объединяли вместе. К собранной суспензии фагов добавляли пять микролитров трипсина в концентрации 100 мг/мл для отщепления Fab. Это повышало способность обработанных трипсином фагов инфицировать E. coli. Обработанные трипсином фаги добавляли к 20 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение одного часа, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E. coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной библиотеки дисплея антител.

Четвертый пэннинг проводили в тех же условиях, что и третий пэннинг.

(11-2) Получение антител, которые связываются с hIL-6R в присутствии кинуренин из библиотеки антител, способом отрицательной селекции

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в присутствии кинуренина. Для скрининга библиотеку фагового дисплея антител сначала приводили в контакт с меченным биотином антигеном-стрептавидином в отсутствие кинуренина для удаления фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания антигена в отсутствие кинуренина. Затем в условиях, когда присутствовал кинуренин, проводили пэннинг аналогично скринингу антител, обладающих активностью связывания антигена только в условиях, когда присутствует кинуренин.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E.coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

В первом пэннинге, увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина, с использованием способа отрицательной селекции. В частности, 500 пмоль биотинилированного антигена добавляли к блокированным BSA гранулам Sera-Mag SpeedBeads, покрытым нейтравидином, и позволяли связываться при комнатной температуре в течение 15 мин. После промывания гранул промывали три раза TBS, их объединяли с 0,5 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA, и позволяли связываться при комнатной температуре в течение 1 ч. Гранулы отделяли с использованием магнитного стенда для сбора фагов, которые не связались с антигеном или гранулами. Вместе с 250 пмоль меченного биотином антигена к собранным фагам добавляли кинуренин в конечной концентрации 500 мкМ, и, таким образом, фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем при 4°C в течение 45 мин. Затем блокированные BSA магнитные гранулы добавляли к смешанному раствору меченного антигена, кинуренина и фаговой библиотеки и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при 4°C в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза 0,5 мл ледяного кинуренин/TBST и один раз ледяным кинуренином/TBS. Затем к смеси добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Смесь перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем фаги собирали с гранул, отделенных с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 10 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной

библиотеки дисплея антител.

Второй и последующие раунды пэннинга проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда тем же способом, который использовали во втором и последующих раундах пэннинга, описанных в примере (11-1).

(11-3) Получение антител, которые связываются с hIL-6R в присутствии кинуренина из библиотеки антител посредством пэннинга с молекулой, служащей в качестве переключателя

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин. Для скрининга сначала проводили пэннинг с биотинилированным кинуренином (соединения 028, 029 и 036) для сбора фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания кинуренина. Затем в присутствии кинуренина проводили пэннинг с меченным биотином антигеном для скрининга антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом) и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E. coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

В первом пэннинге увеличивали в количестве фаги, которые связываются с биотинилированным кинуренином (смесь соединений 028, 029 и 036). В частности, 4000 пмоль смеси биотинилированного кинуренина, содержавшего равные количества соединений 028, 029 и 036, добавляли к блокированным BSA гранулам (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl) и позволяли им связываться при комнатной температуре в течение 30 мин. После промывания гранул три раза TBS, их комбинировали с 0,8 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA, и позволяли контактировать с биотинилированным кинуренином в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение дополнительных 30 мин при 4°C. Гранулы промывали три раза 1 мл ледяного TBST и два раза ледяным TBS. Затем к смешанному раствору добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Сразу после суспендирования смеси при комнатной температуре в течение 15 мин суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 100 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E. coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E. coli. Инфицированные E.coli высевали на пять чашек размером 225 мм×225 мм. Then, E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной библиотеки дисплея антител.

Во втором и последующих раундах пэннинга увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда тем же способом, который использовали на втором и последующих раундах, описанных в примере (11-1).

(11-4) Оценка активности связывания в присутствии кинуренина с помощью ELISA фагов

Фаги культивировали общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) из единичной колонии E.coli, полученной, как описано в (11-1), (11-2) и (11-3). Культуральные супернатанты, содержавшие мультивалентные фаги дисплея антител, собирали с использованием гиперфагов в качестве фагов-помощников. Собранные культуральные супернатанты фагов фильтровали посредством ультрафильтрации с использованием NucleoFast96 (MACHERY-NAGEL). 200 мкл каждого из культуральных супернатантов наносили в каждую из лунок NucleoFast96 и центрифугировали при 6000 g в течение 45 мин Прошедшие фракции удаляли центрифугированием при 6000 g в течение 45 мин. Добавляли 200 мкл H_2O и лунки промывали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Затем добавляли 200 мкл TBS, оставляли стоять при комнатной температуре на 5 мин, а затем собирали суспензии фагов, содержавшиеся в супернатантах.

К очищенным фагам добавляли TBS или 500 мкМ кинуренин/TBS и их подвергали ELISA с использованием методики, описанной ниже. Микропланшеты для титрования StreptaWell 96 (Roche) покрывали 100 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIL-6R, в течение 1 ч или более. После удаления меченного биотином hIL-6R, который не связался с планшетом, путем промывания каждой из лунок планшета TBST, лунки блокировали 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение 1 ч или более. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS полученные очищенные фаги добавляли в каждую лунку планшета. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить фа-

гам, презентирующим антитело, связываться с меченным биотином hIL-6R в каждой лунке в присутствии/в отсутствие кинуренина. После промывания TBST или кинуренин/TBST в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или кинуренин/TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST или кинуренин/TBST хромогенную реакцию раствора в каждой лунке, в которую был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Результаты выявили несколько антител, которые связывались с рецептором IL-6 человека в присутствии кинуренина. Результаты ELISA фагов показаны в табл. 35. Как описано в примере 6 выше, антитела, которые связываются с рецептором IL-6 человека в присутствии кинуренина, также были выделены из библиотеки наивных антител человека; однако можно было выделить антитела с переключателем к рецептору IL-6 человека со значительно большей эффективностью. Результаты ELISA фагов, проведенного, как описано в примере 6-2, показаны в табл. 36.

Таблица 35

Источник	Пример (11-1)	Пример (11-2)	Пример (11-3)
Количество раундов пэннинга	4	4	4
Количество клонов, подвергнутых ELISA	96	96	96
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	96	94	94
Количество клонов с переключателем (кинуренин +/- соотношение поглощений >2)	93	91	86
Количество последовательностей клонов с переключателями	87	88	77

Таблица 36

Количество раундов пэннинга	3
Количество клонов, подвергнутых ELISA	960
Количество положительных клонов (поглощение >0,1)	939
Количество клонов с переключателем (кинуренин +/- соотношение поглощений >1,5)	10
Количество последовательностей клонов с переключателями	2

(11-5) Анализ последовательности антител с переключателем, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от наличия или отсутствия кинуренина

С использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80) амплифицировали гены с клонов, которые были определены как обладающие активностью связывания антигена, когда кинуренин присутствует, исходя из результатов ELISA фагов, показанных в примере (11-4). Нуклеотидные последовательности генов анализировали. Исходя результатов анализа, было выделено несколько клонов, для которых было определено, что они обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии кинуренина, во всех условиях, описанных в примерах (11-1), (11-2) и (11-3). Из выделенных клонов было выбрано шесть, и их аминокислотные последовательности и условия пэннинга для выделения (указанные как "источник" в таблице) показаны в табл. 37 ниже.

Таблица 37

Название клона	Источник	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
6RFHm12-4_040	Пример (11-3)	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102
6RFHm12-4_078	Пример (11-3)	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104
6RFHm14-4_087	Пример (11-2)	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106
6RFHm14-4_093	Пример (11-2)	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
6RFHm17-4_006	Пример (11-1)	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110
6RFHm17-4_010	Пример (11-1)	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 112

(11-6) Экспрессия и очистка антител, которые связываются с hIL-6R

Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи 6, клонов, описанных в примере (11-5), встраивали в плазмиду для экспрессии у животных, обладающих константной областью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 113) или последовательностью константной области легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 47) антитела. Антитела экспрессировали и очищали способом, описанным в справочном примере

1 ниже.

(11-7) Оценка полученных антител в отношении их активности связывания hIL-6R

Выбранные шесть типов антител и антитело 6RNMSC1-2_F02 подвергали ELISA в условиях, указанных в табл. 38.

Таблица 38

	Антиген	Кинуренин	Триптофан
Условия 1	hIL6R	500 мкМ	-
Условия 2	hIL6R	-	-
Условия 3	-	500 мкМ	-
Условия 4	hIL6R	-	500 мкМ

Сначала, 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIL-6R при комнатной температуре в течение 1 ч или более. После удаления меченного биотином hIL-6R, который не связался с планшетом, путем промывания каждой из лунок планшета TBST лунки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (2% обезжиренное молоко/TBS) в течение 1 ч или более. Блокирующий буфер удаляли из каждой лунки. 100 мкл каждого из очищенных IgG, приготовленных в концентрации 2,5 мкг/мл с использованием TBS в условиях, описанных в табл. 38, добавляли в каждую лунку и планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить каждому IgG связаться с меченным биотином hIL-6R в каждой лунке. TBST приготавливали до конечных концентраций, показанных в табл. 38, и каждую лунку промывали приготовленным TBST. В каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (BIOSOURCE), разбавленное TBS, содержавшим те же низкомолекулярные соединения. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST, приготовленным в конечных концентрациях, показанных в табл. 38, хромогенную реакцию раствора в каждой лунке, в которые был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Результаты измерения показаны на фиг. 39.

Поглощение в условиях 2 или 3 было довольно низким по сравнению с поглощением в условиях 1 в выбранных шести типах антител, аналогично антителу 6RNMSC1-2_F02. Это подтвердило, что выбранные шесть типов антител в форме IgG также обладают специфической активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии кинуренина. Между тем, не наблюдали значительных отличий для поглощения в условиях 2 по сравнению с поглощением в условиях 4. Таким образом, также было подтверждено, чтоб выбранные шесть типов антител не обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии триптофана. Результаты, описанные выше, показывают, что множество связывающих hIL-6R антител, для которых кинуренин служит в качестве переключателя, может быть получено из библиотеки для выделения антител с кинуренином в качестве переключателя с использованием пэннинга с кинуренином (библиотека кинуренина Ver.A). Более того, как показано в справочном примере 4 ниже, антитела, которые связываются с антигеном-мишенью в отсутствие ATP, но не связываются с антигеном-мишенью в присутствии ATP, были получены из рационально сконструированной библиотеки, сконструированной с использованием ATP-связывающего антитела в качестве матрицы, как описано в справочном примере 2. Это указывает на то, что антитела, которые связываются с антигеном-мишенью в отсутствие кинуренина, но не связываются с антигеном-мишенью в присутствии кинуренина, могут быть сходным образом получены из библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя.

Пример 12. Получение антител, которые связываются с IgA-Fc человека (hIgA-Fc) в присутствии кинуренина из библиотеки для получения антител с кинуриненом в качестве переключателя с использованием пэннинга с кинуренином (библиотека кинуренина Ver.A)

(12-1) Получение антител, которые обладают активностью связывания hIgA-Fc в присутствии кинуренина, но не в отсутствие кинуренина, из библиотеки антител

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания IgA-Fc человека (hIgA-Fc), в присутствии кинуренина. В частности, собирали фаги, презентирующие антитела, которые обладают активностью связывания с hIgA-Fc, уловленным на гранулах в присутствии кинуренина, но элюированные с гранул в отсутствие кинуренина. В этом способе в качестве антигена использовали меченный биотином hIgA-Fc (SEQ ID NO: 146), полученный способом, описанным в справочном примере 5.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E. coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые

нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

Пэннинг проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со способом, указанным в примере (11-1), за исключением того, что количество антигена изменяли до 500 пмоль в первом и втором раундах и 200 пмоль в третьем и четвертом раундах.

(12-2) Получение антител, которые связываются с hIgA-Fc в присутствии кинуренина, из библиотеки антител способом отрицательной селекции

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин. Для скрининга библиотеку фагового дисплея антител сначала приводили в контакт с меченным биотином антигеном-стрептавидином в отсутствие кинуренина для удаления фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания антигена с отсутствие кинуренина. Затем в условиях, когда кинуренин присутствует проводили пэннинг аналогичным образом для скрининга антител, обладающих активностью связывания антигена только в условиях, когда кинуренин присутствует.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E.coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl).

В первом пэннинге увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина, с использованием способа негативной селекции. В частности, 1000 пмоль биотинилированного антигена добавляли к блокированным BSA гранулам Sera-Mag SpeedBeads, покрытым нейтравидином, и позволяли им связываться при комнатной температуре в течение 15 мин. После промывания гранул три раза TBS их объединяли с 0,5 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA, и позволяли связываться при комнатной температуре в течение 1 ч. Гранулы отделяли с использованием магнитного стенда для сбора фагов которые не связались с антигеном или гранулами. Вместе с 500 пмоль меченного биотином антигена к собранным фагам добавляли кинуренин в конечной концентрации 500 мкМ и, таким образом, фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем при 4°C в течение 45 мин. Затем блокированные BSA магнитные гранулы добавляли к смешанному раствору меченного антигена, кинуренина и фаговой библиотеки и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при 4°C в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза 0,5 мл ледяного кинуренин/TBST и один раз ледяным кинуренин/TBS. Затем к смешанному раствору добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. После перемешивания смеси в течение 15 мин при комнатной температуре фаги собирали с гранул, отделенных с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 10 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной библиотеки дисплея антител.

Второй и последующие раунды пэниннга проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со вторым и последующими раундами пэннинга, описанными в примере (11-1), за исключением того, что количество антигена заменяли на 500 пмоль во втором раунде и 200 пмоль в третьем и четвертом раундах.

(12-3) Получение антител, которые связываются с hIgA-Fc в присутствии кинуренина, из библиотеки антител пэннингом с молекулой, служащей в качестве переключателя

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин. Для скрининга сначала проводили пэннинг с биотинилированным кинуренином (соединения 028, 029 и 036) для сбора фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания кинуренина. Затем проводили пэннинг с меченным биотином антигеном в присутствии кинуренина для скрининга антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали

M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом) и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E. coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

Первый пэннинг проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с биотинилированным кинуренином (смесь соединений 028, 029 и 036). В частности, 4000 пмоль смеси биотинилированного кинуренина, содержавшей равные количества соединений 028, 029 и 036, добавляли к блокированным BSA гранулам (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl) и позволяли им связываться при комнатной температуре в течение 30 мин. После промывания гранул три раза посредством TBS, их комбинировали с 0,8 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA и позволяли контактировать с биотинилированным кинуренином в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение 30 мин при 4°C. Гранулы промывали три раза 1 мл ледяного TBST и два раза ледяным TBS. Затем к смешанному раствору добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Сразу после суспендирования смеси при комнатной температуре в течение 15 мин суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 100 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на пять чашек размером 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентнои библиотеки дисплея антител.

Второй и последующие раунды пэнинга проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со вторым и последующими раундами пэннинга, описанными в примере (11-1), за исключением того, что количество антигена заменяли на 500 пмоль во втором раунде и 200 пмоль в третьем и четвертом раундах.

(12-4) Оценка активности связывания в присутствии кинуренин с использованием ELISA фагов

Фаги культивировали общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) из единичной колонии E.coli, полученной, как описано в (12-1), (12-2) и (12-3). Культуральные супернатанты, содержавшие мультивалентные фаги дисплея антител, собирали с использованием гиперфагов в качестве фагов-помощников. Фаги, очищенные способом, описанным в примере (11-4), подвергали ELISA по методике, описанной ниже. 96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали 100 мкл TBS, содержавшим меченный биотином hIgA-Fc в течение одного часа или более. Каждую лунку планшета промывали TBST для удаления меченного биотином hIgA-Fc, который не связался с планшетом, и лунки блокировали 250 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение 1 ч или более. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить фагам, презентирующим антитела, связываться с меченным биотином hIgA-Fc в каждой лунке в присутствии/в отсутствие кинуренина. Каждую лунку промывали TBST или кинуренин/TBST, и в нее добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или кинуренин/TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST или кинуренин/TBST хромогенную реакцию раствора в каждой лунке, в которую был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем измеряли развитие окраски по поглощению при 450 нм. В результате было подтверждено, что несколько антител связываются с IgA-Fc человека в присутствии кинуренина. Результаты ELISA фагов показаны в табл. 39.

Таблица 39

Источник	Пример (12-1)	Пример (12-2)	Пример (12-3)
Количество раундов пэннинга	4	4	4
Количество клонов, подвергнутых ELISA	96	96	96
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	89	90	91
Количество клонов с переключателем (кинуренин +/- соотношение поглощений >2)	87	90	86
Количество последовательностей клонов с переключателями	67	69	75

(12-5) Анализ последовательности антител с переключателем, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от наличия или отсутствия кинуренина

С использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80), амплифицировали гены с клонов, которые были определены как обладающие активностью связывания антигена, когда кинуренин присутствует, исходя из результатов ELISA фагов, показанных в примере (12-4). Нуклеотидные последовательности генов анализировали, и в результате было получено несколько клонов, для которых было определено, что они обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6R в присутствии кинуренина, во всех условиях, описанных в примерах (12-1), (12-2) и (12-3). Из полученных клонов было выбрано шесть, и их аминокислотные последовательности и условия пэннинга для получения (указанные как "источник" в таблице) показаны в табл. 40 ниже.

Таблица 40

Название клона	Источник	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
hIAFHm12-4_018	Пример (12-3)	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 115
hIAFHm12-4_061	Пример (12-3)	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 117
hIAFHm14-4_001	Пример (12-2)	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 119
hIAFHm14-4_041	Пример (12-2)	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 121
hIAFHm17-4_026	Пример (12-1)	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123
hIAFHm17-4_072	Пример (12-1)	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 125

(12-6) Экспрессия и очистка антител, которые связываются с hIgA-Fc

Каждую из последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи шести клонов, описанных в примере (12-5), встраивали в плазмиду для экспрессии у животных, обладающих последовательностью константной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 113) или константной области легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 47) антитела. Антитела экспрессировали и очищали способом, описанным в справочном примере 1 ниже.

(12-7) Оценка полученных антител в отношении их активности связывания hIgA-Fc

Полученные шесть типов антител подвергали ELISA в условиях, описанных в табл. 41.

Таблица 41

	Антиген	Кинуренин	Триптофан
Условия 1	hIgA-Fc	500 мкМ	-
Условия 2	hIgA-Fc	-	-
Условия 3	-	500 мкМ	-
Условия 4	hIgA-Fc	-	500 мкМ

Сначала 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIgA-Fc, при комнатной температуре в течение 1 ч или более. Каждую лунку планшета промывали TBST для удаления меченного биотином hIgA-Fc, который не связался с планшетом, и лунки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (2% обезжиренное молоко/TBS) в течение 1 ч или более. Блокирующий буфер удаляли из каждой лунки. 100 мкл каждого из очищенных IgG, приготовленных в концентрации 2,5 мкг/мл с использованием TBS в условиях, описанных в табл. 38, добавляли в планшет. Планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить каждому IgG связаться с меченным биотином hIgA-Fc в каждой лунке. Каждую лунку промывали TBST, приготовленнвым в конечной концентрации, показанной в табл. 41. В лунки добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (BIOSOURCE), разбавленное TBS, содержавшее те же низкомолекулярные соединения. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST, приготовленным в конечных концентрациях, показанных в табл. 41, хромогенную реакцию рас-

твора в каждой лунке, в которые был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Результаты измерения показаны на фиг. 40.

Что касается шести типов антител, поглощение в условиях 2 или 3 было довольно низким по сравнению с поглощением в условиях 1. Эти данные подтверждают, что выбранные шесть типов антител в форме IgG также обладают активностью специфического связывания с меченным биотином hIgA-Fc в присутствии кинуренина. Между тем, поглощение в условиях 2 не отличалось значительно от поглощения в условиях 4. Таким образом, также было подтверждено, что шесть выбранных типов антител не обладают активностью связывания с меченным биотином hIgA-Fc в присутствии триптофана. Результаты, описанные выше, показывают, что ряд связывающих hIgA-Fc антител, для которых кинуренин функционирует в качестве переключателя, может быть получен из библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя с использованием пэннинга с кинуренином (библиотека кинуренина Ver.A).

Пример 13. Получение антител, которые связываются с IL-6 человека (hIL-6) в присутствии кинуренина, из библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя с использованием пэннинга с кинуренином (библиотека кинуренина Ver.A)

(13-1) Получение антител, которые обладают активностью связывания с hIL-6 в присутствии кинуренина, но не связываются в отсутствие кинуренина из библиотеки антител

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания с IL-6 человека (hIL-6) в присутствии кинуренина. А именно, собирали фаги, презентирующие антитела, которые обладают активностью связывания с hIL-6, уловленном на гранулах в присутствии кинуренина, но элюированном с гранул в отсутствие кинуренина. В этом способе выделения меченный биотином hIL-6 использовали в качестве антигена.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом) и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E. coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

Пэннинг проводили для увеличения в количестве фагов, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. Пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со способом, описанным в примере (11-1).

(13-2) Получение антител, которые связываются с hIL-6 в присутствии кинуренина, с использованием способа отрицательной селекции, из библиотеки антител

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин. Для скрининга сначала библиотеку фагового дисплея антител приводили в контакт с меченным биотином антигеном-стрептавидином в отсутствие кинуренина для удаления фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания антигена даже в отсутствие кинуренина. Затем аналогичным образом проводили пэннинг в условиях, когда кинуренин присутствовал, для скрининга антител, обладающих активностью связывания антигена в условиях, когда кинуренин присутствовал.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом), и культивировали при 30°C в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E.coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

На первом раунде пэннинга фаги, которые могут связываться с антигеном только и в присутствии кинуренина, увеличивали в количестве с использованием способа негативной селекции. В частности, 500 пмоль биотинилированного антигена добавляли к блокированным BSA гранулам Sera-Mag SpeedBeads, покрытым нейтравидином и позволяли им связываться при комнатной температуре в течение 15 мин. После промывания гранул три раза TBS их объединяли с 0,5 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA, и позволяли связываться при комнатной температуре в течение 1 ч. Гранулы отделяли с

использованием магнитного стенда для сбора фагов, которые не связались с антигеном или гранулами. Вместе с 250 пмоль меченного биотином антигена к собранным фагам добавляли кинуренин в конечной концентрации 500 мкМ и фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном и кинуренином при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем при 4°С в течение 45 мин. Затем блокированные BSA магнитные гранулы добавляли к смешанному раствору меченного антигена, кинуренина и фаговой библиотеки и комплексу антиген/фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при 4°С в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза 0,5 мл ледяного кинуренин/TBST и один раз ледяным кинуренин/TBS. Затем к смешанному раствору добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Смешанный раствор перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем фаги собирали с гранул, отделенных с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 10 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°С в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на чашку размером 225 мм×225 мм. Затем E coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°С в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной библиотеки дисплея антител.

На втором и последующих раундах пэннинга увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со вторым и последующими раундами пэннинга, описанными в примере (11-1).

(13-3) Получение антител, которые связываются с hIL-6 в присутствии кинуренина, с использованием пэннинга с молекулой, служащей в качестве переключателя, из библиотеки антител

Кинурениновую библиотеку Ver.A, сконструированную, как описано в примере 9, подвергали скринингу в отношении антител, которые обладают активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин. Для скрининга сначала проводили пэннинг с биотинилированным кинуренином (соединения 028, 029 и 036) для сбора фагов, презентирующих антитела, которые обладают активностью связывания кинуренина. Затем проводили пэннинг с меченным биотином антигеном в присутствии кинуренина для скрининга антител, обладающих активностью связывания антигена в условиях, когда присутствует кинуренин.

E.coli, сохранившие сконструированный фагмидный вектор фагового дисплея, инфицировали M13KO7ΔpIII (PROGEN Biotechnik; называемый гиперфагом) и культивировали при 30°С в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта. Для преципитации популяции фагов к культуре E.coli, в которой продуцировались фаги, добавляли 2,5 М NaCl/10% PEG. Фаги разбавляли TBS с получением суспензии мультивалентной библиотеки фагового дисплея антител. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием антигена, иммобилизованного на магнитных гранулах. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads Neutravidin-coated) или покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads MyOne Streptavidin T1).

На первом раунде пэннинга увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с биотинилированным кинуренином (смесь соединений 028, 029 и 036). В частности, 4000 пмоль смеси биотинилированного кинуренина, содержавшей равные количества соединений 028, 029 и 036, добавляли к блокированным BSA гранулам (Dynabeads MyOne Streptavidin Tl) и позволяли им связываться при комнатной температуре в течение 30 мин. Гранулы промывали три раза TBS и комбинировали с 0,8 мл суспензии фаговой библиотеки, блокированной BSA, и позволяли контактировать с биотинилированным кинуренином в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение 30 мин при 4°С. Гранулы промывали три раза 1 мл ледяного TBST и два раза ледяным TBS. Затем к смешанному раствору добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Сразу после этого смесь суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин, суспензию фагов собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 100 мл E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli осторожно перемешивали и инкубировали при 37°С в течение 1 ч, чтобы позволить фагам инфицировать E.coli. Инфицированные E.coli высевали на пяти чашках 225 мм×225 мм. Затем E.coli в посеянной культуре инфицировали гиперфагом и культивировали при 30°С в течение ночи. Фаги собирали из супернатанта с получением суспензии мультивалентной библиотеки дисплея антител.

На втором и последующих раундах пэннинга увеличивали в количестве фаги, которые могут связываться с антигеном только в присутствии кинуренина. В частности, пэннинг проводили вплоть до четвертого раунда способом, сходным со вторым и последующими раундами пэннинга, описанными в примере (11-1).

(13-4) Оценка активности связывания присутствии кинуренина с использованием ELISA фагов

Фаги культивировали согласно общепринятому способу (Methods Mol. Biol. (2002) 78, 133-145) из единичной колонии E.coli, полученных, как описано в (13-1), (13-2) и (13-3). Культуральный супернатант, содержавший фаги мультивалентного дисплея антител, собирали с использованием гиперфагов в

качестве фагов-помощников. Фаги, очищенные способом, описанным в справочном примере (11-4), подвергали ELISA по методике, описанной ниже. 384-луночные покрытые стрептавидином микропланшеты (Greiner Bio-One) покрывали 10 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIL-6, в течение одного часа или более. Каждую лунку планшета промывали TBST для удаления меченного биотином hIL-6, не связавшегося с планшетом, и лунки блокировали 80 мкл 2% обезжиренного молока-TBS в течение 1 ч или более. После удаления 2% обезжиренного молока-TBS в каждую лунку планшета добавляли полученные очищенные фаги. Планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить презентирующим антитела фагам связаться с меченным биотином hIL-6 в каждой лунке в присутствии/в отсутствие кинуренина. Каждую лунку промывали TBST или кинуренин/TBST. В лунки добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или кинуренин/TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST или кинуренин/TBST хромогенную реакцию раствора в каждой лунке, в которую был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем измеряли развитие окраски по поглощению при 450 нм. В результате было подтверждено, что несколько антител связываются с hIL-6 человека в присутствии кинуренина. Результаты ELISA фагов показаны в табл. 42.

Таблица 42

Источник	Пример (13-1)	Пример (13-2)	Пример (13-3)
Количество раундов пэннинга	4	4	4
Количество клонов, подвергнутых ELISA	96	96	96
Количество положительных клонов (поглощение >0,2)	65	59	54
Количество клонов с переключателем (кинуренин +/- соотношение поглощений >2)	61	58	48
Количество последовательностей клонов с переключателями	42	37	44

(13-5) Анализ последовательности антител с переключателем, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от наличия или отсутствия кинуренина

С использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80), амплифицировали гены с клонов, которые были определены как обладающие активностью связывания антигена, когда кинуренин присутствует, исходя из результатов ELISA фагов, показанных в примере (13-4). Нуклеотидные последовательности генов анализировали. В результате анализа было получено несколько клонов, для которых было определено, что они обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6 в присутствии кинуренина, во всех условиях, описанных в примерах (13-1), (13-2) и (13-3). Из полученных клонов было выбрано шесть, и их аминокислотные последовательности и условия пэннинга для получения (указанные как "источник" в таблице) показаны в табл. 43 ниже.

Таблица 43

Название клона	Источник	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
I6FHm12-4_068	Пример (13-3)	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 127
I6FHm12-4_094	Пример (13-3)	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129
I6FHm14-4_007	Пример (13-2)	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131
I6FHm14-4_030	Пример (13-2)	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133
I6FHm17-4_016	Пример (13-1)	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 135
I6FHm17-4_036	Пример (13-1)	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 137

(13-6) Экспрессия и очистка антител, которые связываются с hIL-6

Каждую из последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи шести клонов, описанных в примере (13-5), встраивали в плазмиду для экспрессии у животных, обладающих последовательностью константной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 113) или константной области легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 47) антитела. Экспрессию и очистку антител проводили способом, описанным в справочном примере 1 ниже.

(13-7) Оценка полученных антител в отношении их активности связывания hIL-6

Полученные шесть типов антител подвергали ELISA в условиях, описанных в табл. 44.

Таблица 44

	Антиген	Кинуренин	Триптофан
Условия 1	hIL-6	500 мкМ	-
Условия 2	hIL-6	-	-
Условия 3	-	500 мкМ	-
Условия 4	hIL-6	-	500 мкМ

Сначала 96-луночные микропланшеты для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи 100 мкл TBS, содержавшего меченный биотином hIL-6 при комнатной температуре в течение 1 ч или более. Каждую лунку планшета промывали TBST для удаления меченного биотином hIL-6, который не связался с планшетом, и лунки блокировали 250 мкл блокирующего буфера (2% обезжиренное молоко/TBS) в течение 1 ч или более. Блокирующий буфер удаляли из каждой лунки. В лунки добавляли 100 мкл каждого из очищенных IgG, приготовленных в концентрации 2,5 мкг/мл с использованием TBS в условиях, описанных в табл. 44. Планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить каждому IgG связаться с меченным биотином hIL-6 в каждой лунке. Каждую лунку промывали TBST, приготовленнвым в конечной концентрации, показанной в табл. 44. В лунки добавляли конъюгированное с HRP антитело против IgG человека (BIOSOURCE), разбавленное TBS, содержавшее те же низкомолекулярные соединения. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST, приготовленным в конечных концентрациях, показанных в табл. 44, хромогенную реакцию раствора в каждой лунке, в которые был добавлен простой раствор TMB (ZYMED), завершали добавлением серной кислоты. Затем развитие окраски измеряли по поглощению при 450 нм. Результаты измерения показаны на фиг. 41.

Что касается выбранных шести типов антител, поглощение в условиях 2 или 3 было довольно низким по сравнению с поглощением в условиях 1. Эти данные подтверждают, что выбранные шесть типов антител в форме IgG также обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6 в присутствии кинуренина. Между тем, поглощение в условиях 2 не отличалось в значительной степени по сравнению с поглощением в условиях 4. Таким образом, также было подтверждено, что выбранные шесть типов антител не обладают активностью связывания с меченным биотином hIL-6 в присутствии триптофана. Результаты, описанные выше, показывают, что ряд hIL-6-связывающих антител, для которых кинуренин функционирует в качестве переключателя, может быть получен из библиотеки для получения антител с кинуренином в качестве переключателя с использованием пэннинга с кинуренином (библиотека кинуренина Ver.A).

Справочный пример 1. Получение антител, которые связываются с аденозином и/или ATP, из библиотеки антител человека способом фагового дисплея (1-1)

Получение библиотеки фагового дисплея наивных антител человека

Библиотеку фагового дисплея антител человека, состоящую из множества фагов, которые презентируют Fab-домены последовательностей антител человека, которые отличаются друг от друга, конструировали с использованием в качестве матрицы полиА РНК, полученной из PBMC человека, коммерчески доступной полиА РНК человека и т.п. в соответствии со способом, известным специалистам в данной области.

(1-2) Получение антител, которые связываются с аденозином и/или ATP, из библиотеки способом пэннинга гранул

Библиотеку фагового дисплея наивных антител человека, сконструированную, как описано в справочном примере (1-1), подвергали скринингу в отношении антител, которые проявляют антигенсвязывающую активность, в частности, путем сбора фагов, которые экспонируют антитела с активностью связывания с антигенами, уловленными гранулами. В качестве антигенов использовали ATP-PEG-биотин, 2'-аденозин-PEG-биотин и 5'-аденозин-PEG-биотин. Что касается ATP-PEG-биотина, каталожный номер № NU-926-BIO, его приобретали от Jena Bioscience GmbH и использовали.

Что касается 2'-аденозин-PEG-биотина и 5'-аденозин-PEG-биотина, использовали 2'-аденозин-PEG-биотин и 5'-аденозин-PEG-биотин, сконструированные согласно примеру (2-2-11).

Фаги, продуцированные в $E.coli_r$ содержащих фагмидный вектор, сконструированный для фагового дисплея, очищали общепринятым способом, а затем подвергали диализу против TBS с получением суспензии фаговой библиотеки. Затем в суспензию добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием магнитных гранул с иммобилизованным на них антигеном. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads NeutrАвидин-coated) и покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Далее к полученной суспензии фаговой библиотеки добавляли 250 пмоль биотинилированного ATP, 2'-аденозин-PEG-биотина и 5'-аденозин-PEG-биотина. Таким образом, суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с аденозином и ATP в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплекс фага с аденозином и/или ATP позволяли связаться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали один раз посредством TBS. Затем гранулы объединяли с 0,5 мл раствора

трипсина в концентрации 1 мг/мл. Гранулы суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин и сразу после этого суспензию фага собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фагов добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C в течение 1 ч при осторожном перемешивании для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli с получением жидкого исходного раствора с фаговой библиотекой.

Второй раунд пэннинга проводили, чтобы также увеличить содержание фагов, которые способны связываться с аденозином и/или ATP. Полученную суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с аденозином и ATP в течение 60 мин при комнатной температуре путем добавления 50 пмоль каждого из биотинилированного ATP, 2'-аденозин-PEG-биотина и 5'-аденозин-PEG-биотина. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные посредством BSA магнитные гранулы и комплексу фага с аденозином и/или ATP позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали три раза посредством TBST и два раза посредством TBS. Затем гранулы объединяли с 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Гранулы суспензировали при комнатной температуре в течение 15 мин и сразу после этого суспензию фага собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фагов добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C в течение 1 ч при осторожном перемешивании для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli с получением жидкого исходного раствора с фаговой библиотекой.

По той же методике пэннинг проводили три раза для получения антител, которые способны связываться с аденозином и/или ATP. На четвертом раунде пэннинга каждое из промывания TBST и промывания TBS проводили пять раз.

(1-3) Оценка активности связывания аденозина и ATP с помощью ELISA фагов

Из единичных колоний E.coli, полученных пэннингом, как описано в представленном выше примере, культуральные супернатанты, содержащие фаги, собирали в соответствии с общепринятым способом (Method Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). Собранные культуральные супернатанты обрабатывали ультрафильтрацией с использованием NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL). 100 мкл культуральных супернатантов добавляли в каждую лунку NucleoFast 96 и центрифугировали при 4500 g в течение 45 мин оставшейся жидкой части. После добавления 100 мкл H_2O NucleoFast 96 промывали центрифугированием при 4500 g в течение 30 мин. После добавления 100 мкл TBS NucleoFast 96 позволяли стоять в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем из супернатантов собирали суспензии фагов.

Очищенные фаги, к которым добавляли TBS, подвергали ELISA по следующей методике. 96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали при комнатной температуре в течение 1 ч посредством 100 мкл TBS, содержавшего меченные биотином антигены (смесь равных количеств 2'-аденозин-PEG-биотина, 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина). Антигены удаляли из каждой лунки планшета промыванием TBST (TBS, содержащий 0,1% Tween20), а затем лунки блокировали 250 мкл смеси 2% обезжиренное молоко/TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко/TBS удаляли, а затем в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы позволить фагу, экспонирующему антитело, связаться с антигенами в каждой лунке. После промывания TBST, в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST в каждую лунку добавляли простой раствор TMB (ZYMED). Хромогенную реакцию в растворе каждой лунки останавливали добавлением серной кислоты. Затем оценивали развитие окраски путем измерения поглощения при 450 нм.

Из 192 клонов подвергнутых ELISA фагов получили 106 клонов, которые обладали способностью связываться с любым одним, или двумя, или всеми тремя из 2'-аденозин-PEG-биотина, 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина.

Далее, для подтверждения того, в отношении какого из антигенов: 2'-аденозин-PEG-биотин, 5'-аденозин-PEG-биотин и ATP-PEG-биотин, эти клоны обладали активностью связывания, очищенные фаги, разбавленные TBS, подвергали ELISA по следующей методике. 96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали при комнатной температуре в течение 1 ч посредством 100 мкл TBS, содержащего меченный биотином антиген (2'-аденозин-PEG-биотин, 5'-аденозин-PEG-биотин или ATP-PEG-биотин). После удаления антигенов промыванием каждой лунки планшета TBST лунки блокировали 250 мкл смеси 2% обезжиренное молоко/TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко/TBS удаляли, а затем в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы обеспечить связывание экспонирующих антитело фагов с антигенами в каждой лунке. После промывания TBST в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST в каждую лунку добавляли простой раствор

TMB (ZYMED). Хромогенную реакцию в растворе каждой лунки останавливали добавлением серной кислоты. Затем, оценивали развитие окраски путем измерения поглощения при 450 нм. Результат ELISA фагов представлен в табл. 45, ниже.

Таблица 45

Показатель увеличения содержания		Антигенсвязывающая способность (соотношение S/N >1,5)
Количество раундов пэннинга		4
Количество клонов, подвергнутых ELISA		192
Количество положительных в ELISA клонов	Комбинация 2'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина	106
	2'-аденозин-PEG-биотин	0
	5'-аденозин-PEG-биотин	6
	ATP-PEG-биотин	76
	Связывается с двумя или более из 2'-аденозин-PEG-биотина, 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина	1

Среди клонов, подвергнутых ELISA фагов, был продемонстрирован клон, который связывается с двумя или более типами антигенов. Нуклеотидную последовательность гена анализировали с использованием фрагмента антитела в качестве матрицы. Этот клон обладал способностью связываться как с 5'-аденозин-PEG-биотином, так и с ATP-PEG-биотином, и он был назван ATNLSA1-4_D12. Последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела ATNLSA1-4_D12 представлена в SEQ ID NO: 48 и его последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 49.

(1-4) Оценка активности связывания аденозина и ATP с помощью конкурентного ELISA фагов

На основе структур 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина оставалась возможность того, что клон ATNLSA1-4_D12 (вариабельная область тяжелой цепи, SEQ ID NO: 48; легкая цепь: SEQ ID NO: 49), для которого по результатам ELISA фагов было показано, что оно обладает способностью связываться как с 5'-аденозин-PEG-биотином, так и с ATP-биотином, распознает биотиновую метку или часть PEG. Таким образом, чтобы продемонстрировать, что ATNLSA1-4_D12 не является антителом, которое распознает биотиновую метку или PEG, исследовали, ингибируется ли связывание антигена аденозином или ATP, с помощью ELISA фагов с использованием ATNLSA1-4_D12 и связывающего hIL-6R клона PF1 (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 50; легкая цепь: SEQ ID NO: 51), полученного в качестве отрицательного контроля. Каждый из ATNLSA1-4_D12 и PF1 разбавляли TBS и подвергали ELISA по следующей методике.

96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали при комнатной температуре в течение 1 ч 100 мкл TBS, содержащего меченные биотином антигены (смесь 5'-аденозин-PEG-биотина и ATP-PEG-биотина). После удаления антигенов промыванием каждой лунки планшета TBST, лунки блокировали 250 мкл смеси 2% обезжиренное молоко/TBS в течение одного ч или более. 2% обезжиренное молоко/TBS удаляли, а затем в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы обеспечить связывание экспонирующих антитело фагов с антигенами в каждой лунке. Затем в лунки добавляли TBS, который не содержит антигена или который содержит серийные разведения ATP от равного количества до вплоть до разведения в 10000 относительно количества антигена. Для конкуренции иммобилизованного антигена с ATP планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем после промывания TBST в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST в каждую лунку добавляли простой раствор TMB (ZYMED). Хромогенную реакцию в растворе каждой лунки останавливали добавлением серной кислоты. Затем, оценивали развитие окраски путем измерения поглощения при 450 нм.

Результат измерения представлен на фиг. 42. Было продемонстрировано, что чем более высокой является концентрация ATP, тем меньшей является степень развития окраски для ATNLSA1-4_D12 в присутствии избыточного количества ATP. Таким образом, было продемонстрировано, что связывание между ATNLSA1-4_D12 и его антигеном ингибируется зависимым от концентрации ATP образом. Между тем, в контрольном эксперименте с PF1 в качестве отрицательного контроля, его связывание антигена не обнаруживалось независимо от концентрации ATP. Указанные выше данные демонстрируют, что ATNLSA1-4_D12 представляет собой антитело, которое обладает способностью связываться с ATP, но не

распознает биотиновую метку или PEG.

(1-5) Экспрессия и очистка антител, которые связываются с ATP и аденозином

Ген, кодирующий вариабельную область ATNLSA1-4_D12, встраивали в плазмиду для экспрессии в клетках животных IgG1/лямбда человека. Антитело экспрессировали с использованием способа, описанного ниже. Клетки, происходящие из клеток почки эмбриона человека, Freestyle 293-F (Invitrogen) суспендировали при плотности клеток $1{,}33\times10^6$ клеток/мл в среде для экспрессии Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen) и распределяли аликвотами объемом 3 мл в каждую ячейку планшета с 6 ячейками. Сконструированную плазмиду вводили в клетки способом липофекции. После культивирования в течение четырех суток в инкубаторе с CO_2 (37°C, 8% CO_2, 90 об./мин) антитело очищали из культуральных супернатантов способом, известным специалистам в данной области, с использованием rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Поглощение очищенных растворов антител измеряли при 280 нм с использованием спектрофотометра. Из величин, полученных путем измерения, вычисляли концентрацию очищенного антитела с использованием коэффициента экстинкции, определенного способом PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(1-6) Оценка связывающего ATP и аденозин антитела в отношении связывания ATP и аденозина с использованием поверхностного плазмонного резонанса

Biacore T200 (GE Healthcare) использовали для анализа взаимодействия D12, в котором константная область IgG связана с вариабельной областью клона ATNLSA1-4_D12 с активностью связывания ATP и аденозина в реакции антиген-антитело. На сенсорный чип CM5 или CM4 (GE Healthcare) иммобилизовывали соответствующее количество белка A (Life technologies) способом присоединения аминов. Представляющее интерес антитело улавливали на чипе для обеспечения взаимодействия с ATP (Wako), аденозином (Wako) или ADP (аденозиндифосфат) (Wako) в качестве антигена. Использованный подвижный буфер представлял собой 50 мМ Tris-HCl (Takara, T903), 500 мМ NaCl, 000,1% (масс./об.) Tween20. Антигену позволяли взаимодействовать в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциировали в течение 30 с. Взаимодействие с антигеном оценивали при 15°C. Антиген разбавляли с использованием того же подвижного буфера.

Константу диссоциации K_D (M) вычисляли, исходя из константы скорости ассоциации ka (1/M c) и константы скорости диссоциации kd (1/c), обе из которых являются параметрами кинетики, вычисленным из сенсограммы, полученной при измерении. Альтернативно константу диссоциации K_D (M) вычисляли с использованием стационарного анализа. Каждый параметр вычисляли с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare).

Для вычисления K_D в отношении аденозина ответ в виде связывания оценивали при различных концентрациях аденозина в присутствии или в отсутствие 20 мкмоль/л ADP. Кроме того, ответ в виде связывания отдельно оценивали в присутствии 20 мкмоль/л ADP. Ответ (R) для специфического связывания аденозина получали путем вычитания величины ответа в виде связывания в присутствии ADP отдельно из ответа в виде связывания на различные концентрации аденозина в присутствии of ADP, а затем путем вычитания полученной величины, которая предположительно соответствует компонентам неспецифического связывания, из величины ответа в виде связывания на аденозин в отсутствие ADP. Из кривой, на которой концентрация аденозина нанесена на график по оси X и R, вычисленный по формуле 2, нанесен на график по оси Y, величину K_D в отношении аденозина определяли способом наименьших квадратов с использованием функции Solver в Office Excel 2007 (Microsoft).

Формула 2

$$R=Rmax \times \text{конц.}/(K_{D+}\text{конц.})$$

В формуле 2, конц. соответствует концентрации аденозина (моль/л), в то время как Rmax соответствует величине ответа, ожидаемой для максимального связывания аденозина с антителом.

Измеренные величины ответа получали с использованием Scrubber2 (BioLogics. Inc).

KD для D12, определенная с помощью измерения, описанного выше, составила 8,5 мкмоль/л для ATP, 0,25 мкмоль/л для ADP или 1100 мкмоль/л для аденозина. Этот результат демонстрирует, что D12 обладает активностью связывания с ATP, ADP и аденозином; и он также указывает на то, что D12 обладает активностью связывания с AMP (аденозинмонофосфат) и cAMP (циклический аденозинмонофосфат).

Справочный пример 2. Конструирование библиотеки с использованием антител против ATP/аденозина для получения антител с переключением ATP/аденозином

Известно, что в злокачественных тканях и воспаленных тканях является высокой не только концентрация аденозина, но также и концентрация ATP. Таким образом, является полезным использование антител, для которых как аденозин, так и ATP (обозначается как ATP/аденозин в этом примере) могут служить в качестве переключающего фактора (в частности, антитела, которые связываются с антигенами, когда аденозин или ATP присутствует в высокой концентрации), а также антител, для которых либо аденозин, либо ATP, отдельно служит в качестве переключающего фактора. ATNLSA1-4 D12, описанное в справочном примере 1-4, представляет собой антитело, которое связывается с ATP/аденозином. Как показано на фиг. 43, полагают, что ATP/аденозин размещается между антителом и его антигеном-

мишенью, и, таким образом, антитело содержит вариабельную область антитела, которая контактирует с антигеном-мишенью. Таким образом, авторы настоящего изобретения предположили, что можно сконструировать синтетические библиотеки антител, которые позволят выделить антитела с переключением ATP/аденозином, активность связывания которых с произвольными антигенами изменяется в зависимости от присутствия ATP/аденозина, путем объединения в качестве библиотеки сегментов вариабельных областей антитела, которые способны контактировать с антигеном-мишенью и сохранять связывание ATP/аденозина.

Анализировали кристаллическую структуру комплекса между ATP и антителом с ATP/аденозином в качестве переключателя ATNLSA1-4_D12, полученным из библиотеки антител человека, как описано в справочном примере 1-4. Результат анализа кристаллической структуры выявил способ распознавания аденозина (или ATP) антителом, а также идентифицировал аминокислотные остатки, которые считаются по существу не вовлеченными в связывание аденозина (или ATP) в вариабельной области антитела. Аминокислота остатки, которые были идентифицированы как значительно вовлеченные в связывание аденозина (ATP), представляют собой Ser52, Ser52a, Arg53, Gly96, Leu100a и Trp100c (нумерация Kabat) в тяжелой цепи.

При конструировании такой библиотеки участки, которые удовлетворяют по меньшей мере одному из условий, описанных ниже, выбирали в качестве подходящих для конструирования библиотеки.

Условия 1: участки, которые не вовлечены в значительной степени в связывание ATP или, если оно вовлечено в связывание, положение, имеющее аминокислоту, отличную от последовательности дикого типа, которая не ингибирует связывание ATP;

Условие 2: участки, обладающие уровнем разнообразия частоты встречаемости аминокислот в качестве репертуара антител человека; и

Условие 3: участки, которые не являются необходимыми для образования канонической структуры.

В областях, содержащихся как в тяжелой цепи, так и в легкой цепи, последовательности ATNLSA1-4_D12 и которые удовлетворяют условиям, описанным выше, аминокислоты в областях CDR1 и CDR2, которые имеют частоту встречаемости 2% или более в последовательности эмбрионального тип, а также аминокислоты в области CDR3, которые имеют частоту встречаемости 1% или более в последовательности эмбрионального типа, подвергали всестороннему замещению. Эти замены объединяли для конструирования множества вариантов ATNLSA1-4_D12.

Участки изменения в тяжелой цепи (в таблице, положения, указанные как "Kabat", в соответствии с нумерацией Kabat), а также аминокислоты до изменения (в таблице, аминокислоты, обозначаемые как "природная последовательность") в этих участках и аминокислоты после изменения (в таблице, аминокислоты, обозначаемые как "измененные аминокислоты"), представлены в табл. 46.

Таблица 46

		HCDR1			HCDR2			HCDR3				
	Kabat	31	32	35	55	57	58	96	97	99	100	100a
	Нативная последова-тельность	T	Y	N	N	I	N	G	R	G	D	L
Измененная аминокислота	A		A		A	A		A	A	A	A	A
	C											
	E				E							
	D	D			D		D	D	D	D		
	G	G			G		G					
	F		F				F					F
	I											I
	H		H	H			H					
	K					K				K	K	K
	M											M

	L				L							
	N	N	N					N	N	N	N	
	Q											
	P											
	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	
	R	R			R	R						R
	T			T	T	T	T					
	W											W
	V								V	V	V	V
	Y			Y			Y		Y	Y	Y	Y

Участки изменения в легкой цепи (в таблице, положения, указанные как "Kabat", в соответствии с нумерацией Kabat), а также аминокислоты до изменения (в таблице, аминокислоты, обозначаемые как "природная последовательность") в этих участках и аминокислоты после изменения (в таблице, аминокислоты, обозначаемые как "измененные аминокислоты"), представлены в табл. 47.

Таблица 47

		LCDR1									LCDR2						LCDR3								
	Kabat	26	27	27a	27b	27c	28	29	31	32	50	51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95a	96	97
	Нативная последовательность	T	S	S	D	V	G	G	N	Y	E	V	S	K	R	P	S	S	Y	A	G	S	N	V	V
Измененная аминокислота	A	A						A		A			A				A	A	A		A	A	A	A	A
	C																								
	E								E					E						E			E		
	D						D	D	D	D	D	D	D	D					D	D	D	D	D	D	
	G			G							G	G					G					G	G	G	G
	F							F									F		F					F	
	I					I															I	I	I		I
	H													H					H				H	H	
	K								K		K	K			K				K				K	K	
	M																								M
	L															L	L	L					L	L	L
	N			N	N						N	N	N	N			N		N		N	N		N	
	Q										Q			Q			Q						Q	Q	
	P																						P	P	
	S	S						S		S	S			S					S	S	S		S	S	S
	R							R			R								R	R	R	R	R		
	T		T	T				T		T		T	T				T	T	T	T	T	T	T	T	
	W																		W					W	
	V																V	V	V	V	V				
	Y							Y			Y			Y			Y			Y	Y		Y	Y	

Каждый вариант, экспрессированный и очищенный способом, описанным в справочном примере 1-1, анализировали в отношении его связывания ATP и аденозина тем же способом, который описан в справочном примере 1-6, с использованием Biacore. Исходя из результата анализа аффинность каждого варианта в отношении ATP вычисляли в качестве величины KD. Участки в тяжелой цепи, где изменение не снижает способность связывания ATP до менее чем 1/5 от способности связывания ATNLSA1-4_D12 (в частности, где величина KD составляет менее 42,5 мкмоль/л), и участки в легкой цепи, где способность связывать ATP является более высокой, чем у ATNLSA1-4_D12 (в частности, где величина KD меньше 8,5 мкмоль/л), оценивали как приемлемые для изменения. Аминокислоты, замещенные в этих участках, считали подходящими для включения в библиотеку (нестрогие остатки для введения в библиотеку).

Исходя из результатов оценки способности каждого варианта связывать ATP, было спрогнозировано, что способность связывать ATP будет снижаться при объединении каждого участка для конструирования библиотеки. Таким образом, в участки вблизи положений, которые, как ожидалось, вовлечены в связывание ATP, вносили замены, и различные варианты, полученные комбинированием этих замен, всесторонне анализировали для исследования того, возможно ли идентифицировать изменения, которые, как ожидается, будут обеспечивать усиление способности связывать ATP. Такие участки изменения (положения, указанные как "Kabat", в соответствии с нумерацией Kabat в таблице) и аминокислоты до изменения (аминокислоты, обозначаемые как "последовательность дикого типа" в таблице) и аминокислоты после изменения (аминокислоты, обозначаемые как "измененные аминокислоты" в таблице) в этих участках представлены в табл. 48.

Таблица 48

	HCDR1		HCDR2		HCDR3			LCDR3
	Kabat	33	50	56	95	98	100b	95
	Нативная последовательность	T	S	Y	F	K	N	N
Измененная аминокислота	A	A	A	A	A	A	A	A
	C							
	E	E	E	E		E	E	E
	D	D	D	D		D	D	D
	G	G	G	G		G	G	G
	F	F	F	F		F	F	F
	I	I	I	I	I	I	I	I
	H	H	H	H		H	H	H
	K	K	K	K	K		K	K
	M	M	M	M	M	M	M	M
	L	L	L	L	L	L	L	L
	N	N	N			N		
	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q
	P	P	P	P		P	P	P
	S	S		S		S	S	S
	R	R	R		R	R	R	R
	T		T	T		T	T	T
	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y

Каждый вариант, экспрессированный и очищенный способом, описанным в справочном примере 1-1, анализировали в отношении его связывания ATP и аденозина тем же способом с использованием Biacore, который описан в справочном примере 1-6. Результат анализа показал, что связывание ATP и аденозина, как ожидалось, усиливалось путем изменений в положениях 56 и 100b и т.п. в соответствии с нумерацией Kabat (например, аминокислотное изменение, такое как Tyr56His и Asn100bLeu). Было определено, что аминокислоты, замещенные в этих участках, могут быть преобразованы в библиотеку (может быть обеспечено внесение в библиотеку нестрогих остатков).

В областях CDR ATNLSA1-4_D12 репертуары аминокислот, включающие аминокислоты, отобранные с помощью описанного выше анализа варианта в качестве пригодных для преобразования в библиотеку (внесения нестрогих аминокислотных остатков для в библиотеку) и аминокислоты до изменения аминокислот (в частности, аминокислоты, включенные в природную последовательность ATNLSA1-4_D12), и участки, содержащие такие репертуары, моделировали для конструирования библиотеки для получения антител с переключением ATP/аденозином. Библиотеку конструировали так, чтобы в репертуаре аминокислот частота встречаемости аминокислот была одинаковой для каждой аминокислоты (например, когда существует десять типов аминокислот в репертуаре аминокислот, каждая аминокислота встречается с частотой 10%).

Участки, содержащие репертуары аминокислот в тяжелой цепи (положения, указанные как "Kabat", в соответствии с нумерацией Kabat в таблице) и репертуары аминокислот в этих участках представлены в табл.49. Участки, содержащие репертуары аминокислот в легкой цепи (положения, указанные как "Kabat", в соответствии с нумерацией Kabat в таблице) и репертуары аминокислот в этих участках представлены в табл. 50.

Таблица 49

		HCDR1			HCDR2					HCDR3						
	Kabat	31	32	35	55	56	57	58	59	95	97	98	99	100	100a	100b
	Нативная последовательность	T	Y	N	N	Y	I	N	Y	F	R	K	G	D	L	N
Измененная аминокислота	A				17%		25%				11%			5%		
	C															
	E												9%	5%		
	D							13%					9%	5%		
	G	33%			17%			13%			11%		9%	5%		
	F		33%					13%		50%			9%	5%		
	I						25%				11%			5%		
	H		33%	50%		50%		13%			11%		9%	5%	17%	
	K						25%				11%	33%	9%	5%		
	M										11%			5%	17%	
	L								50%		11%	33%		5%	17%	50%
	N			50%	17%			13%					9%	5%		50%
	Q												9%	5%		
	P													5%		
	S	33%			17%			13%						5%		
	R				17%		25%				11%	33%	9%	5%	17%	
	T	33%			17%			13%						5%		
	W												9%	5%	17%	
	V										11%			5%		
	Y		33%			50%		13%	50%	50%			9%	5%	17%	

Таблица 50

		LCDR1		LCDR2			LCDR3								
	Kabat	27a	29	50	51	54	90	91	92	93	94	95	95a	96	97
	Нативная последовательность	S	S	E	V	R	S	Y	A	G	S	N	N	V	V
Измененная аминокислота	A		17%						17%	14%	13%	6%			17%
	C														
	E			14%					17%			6%			
	D		17%	14%						14%	13%	6%	11%		
	G		17%	14%	25%					14%	13%	6%	11%		17%
	F		17%									6%			
	I									14%	13%	6%	11%		
	H											6%	11%		
	K			14%		50%		14%				6%			
	M											6%			17%
	L						25%					6%	11%	33%	17%
	N				25%			14%			13%	6%	11%		
	Q			14%								6%	11%		
	P											6%		33%	
	S	50%	17%	14%			25%		17%	14%	13%	6%	11%		17%
	R					50%		14%	17%		13%	6%			
	T	50%	17%		25%		25%	14%	17%	14%	13%	6%			
	W							14%				6%			
	V				25%		25%	14%						33%	17%
	Y			14%				14%	17%	14%		6%	11%		

Результат анализа последовательности указывает на то, что каркасная область ATNLSA1-4_D12 происходила из последовательности эмбрионального типа VH3-21. Далее для повышения стабильности антитела последовательность каркасной области ATNLSA1-4_D12 восстанавливали до последовательности эмбрионального типа VH3-21 путем внесения в каркасную последовательность ATNLSA1-4_D12 изменений Gln01Glu, Gln05Val, Asp10Gly, Asn30Ser, Leu48Val и Asn58Tyr (числа соответствуют номерам по Kabat). Варианты ATNLSA1-4_D12, экспрессированные и очищенные способом, описанным в справочном примере 1-1, измеряли в отношении их Tm способом DSC. Измерение с помощью DSC проводили способом, известным специалистам в данной области. Tm варианта, которая является результатом добавления этих изменений к ATNLSA1-4_D12, значительно улучшалась от 74,37 до 81,44°C и наблюдали стабилизацию структуры. Иногда является предпочтительным использование высокостабиль-

ных каркасных областей для библиотек антител и, таким образом, каркасную последовательность, в которую были внесены изменения, описанные выше, использовали в качестве каркасной последовательность библиотеки. Каркасная область, использованная для библиотеки, представлена в табл. 51.

Таблица 51

Каркасная область	SEQ ID NO:	Последовательность
Каркасная область 1 тяжелой цепи	52	EVQLVESGGDLVKPGGGLRLSCAASGFTFS
Каркасная область 2 тяжелой цепи	53	WVRQAPGKGLEWVS
Каркасная область 3 тяжелой цепи	54	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Каркасная область 4 тяжелой цепи	55	WGQGTLVTVSS
Каркасная область 1 тяжелой цепи	56	QSALTQPPSASGSPGQTVTISC
Каркасная область 2 тяжелой цепи	57	WYQQHPGKAPKLMIY
Каркасная область 3 тяжелой цепи	58	GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFC
Каркасная область 4 тяжелой цепи	59	FGGGTKLTVL

Гены синтезировали так, чтобы они содержали соответствующие последовательности в библиотеке, сконструированной, как описано выше (DNA2.0), и библиотеку генов амплифицировали с помощью праймеров, которые способны амплифицировать VH и VL, соответственно, с использованием коллекции (библиотеки) соответствующих генов в качестве матрицы. Последовательности праймеров, использованные для амплификации VL, представлены в SEQ ID NO: 81 и 82, в то время как последовательности праймеров, использованных для амплификации VH, представлены в SEQ ID NO: 83 и 83. Амплифицированную рационально сконстрированную библиотеку генов вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека встраивали в соответствующий фагмидный вектор, содержащий как происходящую из IgG последовательность CH1 человека, так и происходящую из IgG человека последовательность константной области легкой цепи. Фагмидный вектор вводили E.coli электропорацией для конструирования рационально сконструированной библиотеки, которая презентирует Fab-домены, содержащие вариабельную область-константную область антитела человека, и из которой можно выделять антитела, которые способны связываться с антигенмми через аденозин или ATP в качестве переключающего фактора. Ожидается, что такая рационально сконструированная библиотека с различными H-цепями и L-цепями, которые обладают активностью связывания аденозина или ATP, будет пригодной в качестве библиотеки, содержащей антитела человека, которые с расположенным между антителом и антигеном аденозином (или ATP), как показано на фиг. 43, позволят эффективно получить антитела с переключением аденозином/ATP против любого произвольного антигена. Более того, как описано выше, поскольку ATNLSA1-4_D12 связывается не только с аденозином и ATP, но также и с ADP, было предсказано, что оно обладает активностью связывания с AMP и cAMP, которые структурно сходны с ATP, ADP и аденозином. Это указывает на то, что такие библиотеки являются пригодными для выделения антител с переключением, активность связывания которых с произвольными антигенами-мишенями изменяется в зависимости от присутствия любого одного или нескольких из низкомолекулярных соединений: ATP, ADP, AMP, cAMP и аденозина.

Справочный пример 3. Получение антител, которые связываются с антигенами в присутствии аденозина и ATP, из библиотеки антител с использованием способов фагового дисплея (3-1)

Получение антител, которые связываются с антигенами в присутствии низкомолекулярных соединений, из библиотеки с использованием смеси аденозина и ATP

Антитела, которые проявляют антигенсвязывающую активность в присутствии аденозина и/или ATP, получали из сконструированной библиотеки фагового дисплея из иммунизированных аденозином кроликов и библиотеки фагового дисплея рационально сконструированных антител. Для получения антител фаги, экспонирующие антитела, которые проявляют способность связываться с антигенами, уловленными гранулами в присутствии аденозина и ATP, объединяли, а затем фаги собирали из элюата с гранул в отсутствие аденозина и ATP.

Фаги продуцировали в E.coli, содержащих фагмидный вектор, сконструированный для фагового дисплея. В культуральную среду E.coli, в которой проводили продуцирование фага добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG для осаждения фагов. Фракцию осажденных фагов разбавляли TBS для получения сус-

пензии библиотеки. Затем в суспензию библиотеки фагов добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием магнитных гранул с иммобилизованным на них антигеном. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads NeutrАвидин-coated) и покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin). В качестве антигена использовали биотинилированный рецептор IL-6 человека.

Каждый из 500 пмоль меченного биотином антигена и ATP-Na и аденозина в конечной концентрации 1 мМ добавляли к суспензии фаговой библиотеки. Суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с антигеном, аденозином и ATP при комнатной температуре в течение 60 мин. К суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплексу антиген-фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали один раз посредством ATP и TBS с растворенным аденозином. Затем гранулы объединяли с 0,5 мл 1 мг/мл трипсина. Гранулы суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем сразу суспензию фага собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фагов добавляли к 10 мл клеток E.coli cells штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение одного часа для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli с получением жидкого исходного раствора с фаговой библиотекой.

Первый раунд пэннинга проводили для сбора фагов, которые способны связывать антиген в присутствии аденозина и ATP, в то время как второй и последующий раунды пэннинга проводили для увеличения содержания фагов, которые способны связывать антиген только в присутствии аденозина и ATP. В частности, каждый из 40 пмоль меченного биотином антигена и аденозина и ATP в конечной концентрации 1 мМ добавляли к полученной суспензии фаговой библиотеки. Таким образом, фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном, аденозином и ATP в течение 60 мин при комнатной температуре. Добавляли блокированные посредством BSA магнитные гранулы и комплексу антиген-фаг позволяли связываться с магнитными гранулами в течение 15 мин при комнатной температуре. Гранулы промывали 1 мл TBST с растворенным аденозином и ATP (далее обозначается как (аденозин+ATP)/TBST), аденозином, и TBS с растворенным аденозином и ATP (далее обозначаемый как (аденозин+ATP)/TBS). Затем гранулы объединяли с 0,5 мл TBS. Гранулы суспендировали при комнатной температуре, а затем сразу суспензию фага собирали с гранул, отделенных с использованием магнитного стенда. После повторения этой обработки две по отдельности элюированных суспензии фагов объединяли вместе. Белок pIII (происходящий из фага-помощника белок pIII), который не экспонирует Fab, отщепляли от фагов добавлением 5 мкл 100 мг/мл трипсина собранной суспензии фагов для устранения способностей фагов, которые не экспонируют Fab, инфицировать E.coli. Фаги, собранные из трипсинизированной суспензии фагов, добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение 1 ч для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli с получением суспензии фаговой библиотеки. Пэннинг проводили три раза для выделения антител, которые обладают антигенсвязывающей активностью в присутствии аденозина и ATP.

(3-2) Получение антител, которые связываются с антигенами в присутствии аденозина и ATP, из библиотеки антител с использованием способа отрицательной селекции

Библиотеку фагового дисплея рационально сконструированных антител подвергали скринингу в отношении антител, которые проявляют антигенсвязывающую активность в присутствии аденозина и/или ATP. В качестве первой стадии скрининга библиотеку фагового дисплея антител приводили в контакт с меченным биотином антигеном-стрептавидином в отсутствие аденозина и ATP для устранения фагов, экспонирующих антитела, которые обладают антигенсвязывающей активностью даже в отсутствие аденозина и ATP. Затем проводили пэннинг аналогичным образом в присутствии аденозина и ATP для скрининга антител, которые проявляют антигенсвязывающую активность в присутствии аденозин и ATP.

Фаги продуцировали в E.coli, содержащих сконструированные фагмиды фагового дисплея. В культуральную среду E.coli, в которой происходило продуцирование фага, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG для осаждения фагов. Осажденную фракцию фагов разбавляли TBS для получения суспензии библиотеки. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA до конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием магнитных гранул с иммобилизованным на них антигеном. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads NeutrАвидин-coated) и покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Вместе с 250 пмоль меченного биотином антигена, к полученной суспензии фаговой библиотеки добавляли смесь аденозина и ATP в конечной концентрации 1 мМ. Таким образом, суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с антигеном, аденозином и ATP в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы, и им позволяли связаться с комплексом антиген-фаг при комнатной температуре в течение 15 мин. Грану-

лы промывали один раз (аденозин+ATP)/TBS. Затем гранулы объединяли с 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Гранулы суспензировали при комнатной температуре в течение 15 мин, и сразу после этого суспензию фага собирали с гранул, которые были отделены с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фагов добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение 1 ч для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем в культуральный раствор посеянных E.coli добавляли фаг-помощник M13K07 (Takara Bio Inc.) или M13 K07ΔpIII (called Hyperphage; PROGEN Biotechnik GmbH) для инфицирования и после культивирования в течение ночи при 30°C фаги собирали из супернатанта с получением суспензии фаговой библиотеки, экспонирующей одновалентные антитела, и суспензии фаговой билиотеки, экспонирующей мультивалентные антитела.

Первый раунд пэннинга проводили для сбора фагов, которые способны связываться в присутствии аденозина и ATP, в то время как второй и последующий раунды пэннинга проводили для увеличения содержания фагов, которые связываться с антигеном только в присутствии аденозина и ATP. В частности, 250 пмоль биотинилированного антигена добавляли к блокированным посредством BSA гранулам с нейтравидином Sera-Mag, и им позволяли связываться при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали три раза посредством TBS. Суспензию фаговой библиотеки, подвергнутую блокированию посредством BSA, добавляли к промытым гранулам и им позволяли связываться при комнатной температуре в течение 1 ч. Фаги, которые не связываются с антигенами или гранулами, собирали путем выделения гранул с использованием магнитного стенда. К собранным фагам добавляли каждый из сорока пмоль меченного биотином антигеном и аденозина и ATP в конечной концентрации 1 мМ. Таким образом, фаговую библиотеку приводили в контакт с антигеном, аденозином и ATP в течение 60 мин при комнатной температуре. К смеси меченного антигена, аденозина, ATP и фаговой библиотеки добавляли блокированные посредством BSA магнитные гранулы, и позволяли им связаться с комплексом антиген-фаг в течение 15 мин при комнатной температуре. Гранулы промывали 1 мл (аденозин+ATP)/TBST и (аденозин+ATP)/TBS. Затем к смеси добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Смешанную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем фаги собирали с гранул, которые были разделены с использованием магнитного стенда. Собранные фаги добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при 37°C при осторожном перемешивании в течение одного часа для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Пэннинг проводили три раза для выделения антител, которые обладают антигенсвязывающей активностью в присутствии of аденозин и ATP.

(3-3) Оценка активности связывания в присутствии или в отсутствие аденозина и/или ATP с помощью ELISA фагов

Содержащие фаг культуральные супернатанты собирали в соответствии с общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) из единичных колоний E.coli, полученных способом, описанным выше. Собранные культуральные супернатанты обрабатывали ультрафильтрацией с использованием NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL). 100 мкл культуральных супернатантов добавляли в каждую лунку NucleoFast 96 и центрифугировали (4500g в течение 45 мин) для удаления оставшейся жидкой части. После добавления 100 мкл H_2O NucleoFast 96 промывали центрифугированием (4500 g в течение 30 мин). Наконец, добавляли 100 мкл TBS и NucleoFast 96 позволяли стоять в течение 5 мин при комнатной температуре. Суспензию фагов собирали из супернатанта в каждой лунке NucleoFast 96.

Очищенные фаги, к которым добавляли TBS или (аденозин+ATP)/TBS, подвергали ELISA по следующей методике. 96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи посредством 100 мкл TBS, содержащего меченный биотином антиген. После удаления антигена путем промывания каждой лунки планшета посредством TBST, лунки блокировали 250 мкл смеси 2% обезжиренное молоко/TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко/TBS удаляли, а затем в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при 37°C в течение 1 ч для обеспечения связывания экспонирующих антитело фагов с антигеном в каждой лунке в присутствии или в отсутствие аденозина и/или ATP. После промывания TBST или (аденозин+ATP)/TBST) в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или (аденозин+ATP)/TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промываний TBST или (аденозин+ATP)/TBST, в каждую лунку добавляли простой раствор TMB (ZYMED). Хромогенную реакцию в растворе каждой лунки останавливали добавлением серной кислоты. Затем, оценивали развитие окраски путем измерения поглощения при 450 нм. Результат продемонстрировал множество типов антител, которые могут связываться с рецепторами IL-6 человека в присутствии ATP или аденозина. Результат ELISA фагов показан в табл. 52.

Таблица 52

Количество раундов пэннинга	3	4
Количество клонов, подвергунтых ELISA	96	96
Количество положительных клонов (соотношение S/N > 10)	23	64
Количество зависимых клонов (соотношение SM+/- > 2)	22	64
Количество последовательностей зависимых клонов	17	35

(3-4) Анализ последовательности антител с переключателем, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от наличия или отсутствия аденозина и ATP

С использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80) амплифицировали гены с клонов, для которых было определено, что они обладают активностью связывания антигена в условиях, когда аденозин или ATP присутствуют, исходя из результатов ELISA фагов, описанного в справочном примере (3-3). Нуклеотидные последовательности анализировали, и, исходя из результата были получены следующие клоны, и было определено, что они обладают активностью связыванию с меченным биотином hIL-6R в присутствии аденозина или ATP: 6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085, и 6RDL3C5-4_011 (табл. 53).

Таблица 53

Название клона	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
6RAD2C1-4_001	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61
6RAD2C1-4_005	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63
6RAD2C1-4_011	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65
6RAD2C1-4_026	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67
6RAD2C1-4_030	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69
6RAD2C1-4_042	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71
6RAD2C1-4_076	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
6RDL3C1-4_085	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
6RDL3C5-4_011	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77

Справочный пример 4. Получение антител, которые связываются с антигенами в отсутствие аденозина или ATP из библиотеки антител с использованием способов фагового дисплея (4-1)

Получение антител, связывание которых с антигеном ингибируется в присутствии низкомолекулярных соединений, из библиотеки с использованием смеси аденозина и ATP

Антитела, которые связываются с антигенами-мишенями в присутствии низкомолекулярных соединений, служащих в качестве переключающего фактора, получали, как описано в справочном примере 3 выше. В эксперименте, описанном в этом справочном примере, авторы настоящего изобретения предприняли попытку получить антитела, которые связываются с антигенами-мишенями в отсутствие низкомолекулярных соединений.

Антитела, которые проявляют антигенсвязывающую активность в отсутствие аденозина и/или ATP, но способность к связыванию которых снижется в присутствии аденозина и/или ATP, получали из библиотеки фагового дисплея рационально сконструированных антител, сконструированной согласно справочному примеру 2. В качестве первой стадии выделения антител фаговоую библиотеку антител приводили в контакт с биотинилированным аденозином и биотинилированным ATP для сбора из библиотеки фагового дисплея антител, которые связываются с аденозином и/или ATP. Затем библиотеку фагового дисплея антител приводили в контакт с биотинилированным антигеном-стрептавидином в отсутствие аденозина и ATP для сбора антител, которые связываются с антигенами в отсутствие аденозина и ATP. Пэннинг проводили чередующимся образом, описанным выше, для скрининга антител, которые обладают активностью связывания с антигеном и аденозином и/или ATP. В присутствии аденозина и ATP, ожидалось, что связывание антител с такими свойствами с антигеном будет ингибироваться связыванием с антителами аденозина и/или ATP.

Фаги продуцировали в E.coli, содержащих фагмидный вектор, сконструированный согласно справочному примеру 2, для фагового дисплея. В культуральную среду E.coli, в которой проводили продукцию фага, добавляли 2,5 M NaCl/10% PEG для преципитации фага. Фракцию преципитированных фагов разбавляли TBS для получения суспензии фаговой библиотеки. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли BSA в конечной концентрации 4%. Пэннинг проводили с использованием магнитных гранул с иммобилизованным на них антигеном. Использованные магнитные гранулы представляли собой покрытые нейтравидином гранулы (Sera-Mag SpeedBeads NeutrАвидин-coated) и покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 Streptavidin).

К полученной суспензии фаговой библиотеки добавляли 500 пмоль биотинилированного ATP, 2'-аденозин-PEG-биотин и 5'-аденозин-PEG-биотин. Таким образом, суспензию фаговой биллиотеки при-

водили в контакт с аденозином и АТР в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплексу фага с аденозином и/или АТР позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали один раз TBS, а затем к гранулам добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл. Гранулы суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин и сразу после этого с гранул, выделенных, с использованием магнитного стенда, собирали суспензию фагов. Собранную суспензию фагов добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при осторожном перемешивании при 37°C в течение 1 ч для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli для получения суспензии фаговой библиотеки.

Второй раунд пэннинга проводили для увеличения содержания фагов, способных связываться с биотинилированным антигеном в отсутствие аденозина и АТР. В частности, 250 пмоль биотинилированного антигена добавляли к полученной суспензии фаговой библиотеки. Таким образом, суспензию фаговой библиотеки приводили в контакт с антигеном в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии фаговой библиотеки добавляли блокированные BSA магнитные гранулы и комплексу антиген-фаг позволяли связываться с магнитными гранулами при комнатной температуре в течение 15 мин. Гранулы промывали два раза посредством TBST и один раз посредством TBS. Затем к гранулам добавляли 0,5 мл раствора трипсина в концентрации 1 мг/мл.

Гранулы суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин и сразу после этого раствор с фагом собирали с гранул, отделенных с использованием магнитного стенда. Собранную суспензию фага добавляли к 10 мл клеток E.coli штамма ER2738 на логарифмической фазе роста (OD600=0,4-0,7). E.coli инкубировали при осторожном перемешивании при 37°C в течение 1 ч для инфицирования фагом. Инфицированные E.coli высевали в чашку 225 мм×225 мм. Затем фаги собирали из культуральной среды посеянных E.coli с получением суспензии фаговой библиотеки.

На последующих нечетных раундах пэннинг проводили аналогичным образом в качестве пэннинга первого раунда. Однако количество промываний гранулы TBST и TBS увеличивали до трех раз и двух раз соответственно.

При последующих четных раундах пэннинг проводили аналогичным образом в качестве пэннинга второго раунда. Однако на четвертом и последующих раундах пэннинга, количество биотинилированного антигена снижали до 40 пмоль, и количество промываний гранул TBST и TBS увеличивали до трех раз и двух раз, соответственно.

(4-2) Оценка активности связывания в присутствии низкомолекулярных соединений с помощью ELISA фагов

Культуральные супернатанты, содержащие фаги, собирали в соответствии с общепринятым способом (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) из единичных колоний E. coli полученных способом, описанным выше. Собранные культуральные супернатанты ультрацентрифугировали с использованием NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL). В каждую лунку добавляли 100 мкл культуральных супернатантов, и NucleoFast 96 центрифугировали (4500 g в течение 45 мин) для удаления оставшейся жидкой части. В каждую лунку добавляли 100 мкл H_2O и вновь NucleoFast 96 промывали центрифугированием (4500 g в течение 30 мин). Добавляли 100 мкл TBS, а затем NucleoFast 96 позволяли стоять при комнатной температуре в течение 5 мин. Наконец, суспензию фага собирали из супернатанта в каждой лунке.

Очищенные фаги, к которым были добавлены TBS или АТР и аденозин/TBS, подвергали ELISA по следующей методике. 96-луночный микропланшет для титрования StreptaWell (Roche) покрывали в течение ночи посредством 100 мкл TBS, содержащего меченный биотином антиген. После удаления антигена, не связанного со стрептавидином, из каждой лунки планшета промыванием TBST, лунки блокировали 250 мкл смеси 2% обезжиренное молоко/TBS в течение 1 ч или более. 2% обезжиренное молоко/TBS удаляли, а затем в каждую лунку добавляли полученные очищенные фаги. Планшету позволяли стоять при 37°C в течение 1 ч, чтобы позволить связаться экспонирующим антитело фагу с антигенами в каждой лунке в присутствии или в отсутствие 10 мМ аденозина и АТР. После промывания TBST или 10 мМ (АТР и аденозин)/TBST в каждую лунку добавляли конъюгированное с HRP антитело против M13 (Amersham Pharmacia Biotech), разбавленное TBS или 10 мМ (АТР и аденозин)/TBS. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывания TBST или 10 мМ (АТР и аденозин)/TBST в каждую лунку добавляли простой раствор TMB (ZYMED). Хромогенную реакцию в растворе каждой лунки останавливали добавлением серной кислоты. Затем оценивали развитие окраски путем измерения поглощения при 450 нм.

ELISA фагов проводили с использованием 96 выделенных клонов с получением из библиотеки рационально сконструированных антител клона "I6RLSA1-6_011", который обладал антигенсвязывающей активностью с IL-6 человека в отсутствие АТР и аденозина, клона "HSADSA1-6_020", который обладал антигенсвязывающеи активностью с сывороточным альбумином человека (HSA) в отсутствие АТР и аденозина, а также клонов "6RRLSA1-6_037" и "6RRLSA1-6_045", которые обладали антигенсвязывающеи активностью в отношении рецептора IL-6 человека в отсутствие АТР и аденозина (фиг. 44, 45 и 46).

(4-3) Анализ последовательности антител, для которых аденозин и ATP служат в качестве переключающего фактора

Гены амплифицировали с использованием специфических праймеров (SEQ ID NO: 79 и 80) из клонов, которые были оценены как обладающие антигенсвязывающей активностью в отсутствие аденозина и ATP, исходя из результата ELISA фагов, описанного в (4-2). Нуклеотидные последовательности генов анализировали. Исходя из результата анализа, аминокислотные последовательности представлены в табл. 54 ниже.

Таблица 54

Название клона	Тяжелая цепь, SEQ ID NO	Легкая цепь, SEQ ID NO
I6RLSA1-6_011	138	139
HSADSA1-6_020	140	141
6RRLSA1-6_037	142	143
6RRLSA1-6_045	144	145

Справочный пример 5. Получение биотинилированного IgA-Fc человека

Среди встречающихся в природе последовательностей IgA человека, Fc-часть использовали в качестве IgA человека (IgA-Fc человека). Для связывания биотина с C-концом IgA-Fc человека, фрагмент гена, кодирующий специфическую последовательность (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 147) для присоединения биотина биотинлигазой, связывали через линкер. Фрагмент гена, кодирующий белок (SEQ ID NO: 146), в котором IgA-Fc человека связан с последовательностью AviTag, встраивали в вектор для экспрессии в клетках животных. Сконструированный плазмидный вектор вводили в клетки FreeStyle293 (Invitrogen) с использованием 293Fectin (Invitrogen). В этом эксперименте гены для экспрессии EBNA1 (SEQ ID NO: 148) и биотинлигазы (BirA, SEQ ID NO: 149) вводили совместно и добавляли биотин для мечения биотином IgA-Fc человека. Клетки, в которые были введены гены по методике, описанной выше, культивировали при 37°C при 8% CO_2 в течение шести суток для секреции представляющего интерес белка в культуральном супернатанте.

Среду для культивирования клеток, содержавшую представляющий интерес биотинилированный IgA-Fc человека, фильтровали через 0,22-мкм фильтрующую насадку с получением культурального супернатанта. Культуральный супернатант разбавляли 20 мМ Tris-HCl, pH 7,4 и наносили на HiTrap Q HP (GE Healthcare), уравновешенную 20 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Представляющий интерес биотинилированный IgA-Fc человека элюировали градиентом концентрации NaCl. Затем элюат HiTrap Q HP разбавляли 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и наносили на колонку SoftLink Avidin column (Promega), уравновешенную 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Представляющий интерес биотинилированный IgA-Fc человека элюировали с использованием 5 мМ биотина, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Затем агрегаты, такие как непредусмотренные примеси, гель-фильтрационной хроматографией с использованием Superdex200 (GE Healthcare), с получением очищенного биотинилированного IgA-Fc человека, в котором буфер заменен на 20 мМ гистидин-HCl, 150 мМ NaCl, pH 6,0.

Промышленная применимость

Антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, и фармацевтические композиции, содержащие их, не имеют системного эффекта в нормальных тканях и в крови, но действуют необратимым образом в злокачественной опухоли или в областях воспаления, которые являются областями патологии в тканях-мишени, проявляют их медицинский эффект, избегая неблагоприятных эффектов, и обеспечивают терапевтическое лечение заболеваний, обусловленных тканями-мишенями. В случае получения антитела, связывание которого с антигеном регулируется в зависимости от неприродного соединения, такое антитело является в высокой степени полезным, поскольку его можно контролировать посредством введения экзогенных соединений, которые активируют активность или фармацевтический эффект антитела или экзогенных соединений, которые можно вводить неинвазивным путем.

Более того, различные антигенсвязывающие молекулы, пригодные для лечения тканеспецифических заболеваний, можно эффективно и быстро получать с использованием библиотеки, которая содержит множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению, последовательности которых отличаются друг от друга, и антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярных соединений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Библиотека, которая состоит из:

(i) множества антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновых кислот, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антиген-

связывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друга от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, где низкомолекулярное соединение представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидов, которые имеют структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов метаболизма сахаров и никотинамида и его метаболитов, и где библиотеку получают способом, включающим стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или более из (i)-(iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или в антигенсвязывающих доменах, которые обладают активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения:

(i) один или более аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание немодифицированного антигенсвязывающего домена с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или более аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или более аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры в немодифицированном антигенсвязывающем домене; и

(b) конструирование библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a).

2. Библиотека, которая состоит из:

(i) множества антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновых кислот, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друга от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, где низкомолекулярное соединение представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидов, которые имеют структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов метаболизма сахаров и никотинамида и его метаболитов, и где библиотеку получают способом, включающим стадии:

(a) идентификация аминокислотных участков, которые удовлетворяют одному или нескольким из (i)-(iii) ниже, в антигенсвязывающих доменах, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, или в антигенсвязывающем домене, который обладают активностью связывания с низкомолекулярным соединением:

(i) один или более аминокислотных участков, которые не вовлечены в связывание с низкомолекулярным соединением;

(ii) один или более аминокислотных участков, которые демонстрируют разнообразие частоты встречаемости аминокислот в репертуаре антител вида животных, к которому принадлежит родительский антигенсвязывающий домен; и

(iii) один или более аминокислотных участков, которые не являются важными для формирования канонической структуры в немодифицированном антигенсвязывающем домене; и

(b) конструирование библиотеки, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие немодифицированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые индивидуально кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют модификации в одном или нескольких из аминокислотных участков, идентифицированных на стадии (a);

(c) идентификация одной или нескольких модификаций аминокислот, которые по существу не изменяют активность связывания каждого из упомянутых выше вариантов с низкомолекулярным соединением; и

(d) продуцирование библиотеки, содержащей нуклеиновые кислоты, которые кодируют немодифи-

цированные антигенсвязывающие домены/молекулы, и нуклеиновые кислоты, которые кодируют множество вариантов упомянутых выше антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности и имеют одну или несколько модификаций аминокислот, идетифицированных на стадии (c).

3. Библиотека, которая состоит из:

(i) множества антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друг от друга последовательности; или

(ii) нуклеиновых кислот, которые кодируют множество антигенсвязывающих доменов или антигенсвязывающих молекул, содержащих антигенсвязывающий домен, которые имеют отличающиеся друга от друга последовательности;

где упомянутые выше антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие домены или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которых варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, где низкомолекулярное соединение представляет собой по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидов, которые имеют структуру пуринового кольца, аминокислот и их метаболитов, липидов и их метаболитов, первичных метаболитов метаболизма сахаров и никотинамида и его метаболитов, и где библиотеку получают способом, включающим стадии:

1) приведение в контакт библиотеки, содержащей множество антигенсвязывающих молекул, имеющих активность связывания с низкомолекулярным соединением, с низкомолекулярным соединением; и

2) концентрирование из библиотеки нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, имеющих активность связывания с низкомолекулярным соединением.

4. Библиотека по п.3, где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие молекулы, которые содержат вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи антитела, и где библиотека продуцирована способом, включающим одну из стадий:

1) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, из библиотеки по п.3, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях тяжелой цепи;

2) конструирование библиотеки посредством концентрирования нуклеиновых кислот, которые кодируют множество вариантов антигенсвязывающих молекул, обладающих активностью связывания в отношении низкомолекулярного соединения, из библиотеки по п.3, которая содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько вариантов, полученных путем модификации аминокислот, расположенных в вариабельных областях легкой цепи; и

3) конструирование библиотеки путем комбинирования нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающую молекулу, концентрированных из каждой из библиотек вариабельных областей стадий 1) и 2).

5. Библиотека по любому из пп.1-4, где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой слитые полипептиды, полученные путем слияния антигенсвязывающего домена по меньшей мере с частью белка вирусной оболочки.

6. Библиотека по любому из пп.1-4, где упомянутые выше антигенсвязывающие молекулы представляют собой антигенсвязывающие молекулы, содержащие тяжелые цепи и легкие цепи антител, и библиотека дополнительно включает стадию конструирования синтетической библиотеки тяжелых цепей и/или легких цепей.

7. Библиотека по п.6, где тяжелые цепи и/или легкие цепи антител содержат каркасную последовательность эмбрионального типа.

8. Библиотека по любому из пп.1-4, где упомянутое выше низкомолекулярное соединение представляет собой специфичное к ткани-мишени соединение или неприродное соединение.

9. Библиотека по п.8, где упомянутая выше ткань-мишень представляет собой злокачественную ткань или воспаленную ткань.

10. Библиотека по любому из пп.1-4, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

11. Библиотека по п.1 или 2, где аминокислотные участки, не вовлеченные в связывание с низкомолекулярным соединением, представляют собой участки, отличные от любой одной или нескольких аминокислот, выбранных из указанных ниже:

H-цепь: 97, 100c, 101, 94, 95, 100d, 100e, 33, 50, 52, 56, 57, 58, 99, 100, 100a, 54, 55 (нумерация Kabat) и

L-цепь: 49, 55, 95c, 96, 95a, 95b (нумерация Kabat).

12. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по любому из пп.1-4 с антигеном в отсутствие низкомолекулярного соединения;

(b) отбор антигенсвязывающего домена, который не связывается с антигеном на стадии (a) выше;

(c) приведение в контакт антигенсвязывающего домена, отобранного на стадии (b) выше, с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(d) отбор антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном на стадии (c) выше;

(e) связывание полинуклеотида, который кодирует антигенсвязывающий домен, отобранный на стадии (d) выше, с полинуклеотидом, который кодирует полипептид, содержащий Fc-область;

(f) культивирование клетки, в которую введен вектор, с которым функционально связан полинуклеотид, полученный на стадии (e) выше; и

(g) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клетки, культивированной на стадии (f) выше.

13. Способ по п.12, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

14. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который включает стадии:

(a) приведение в контакт библиотеки по любому из пп.1-4 с антигеном в присутствии низкомолекулярного соединения;

(b) сбор антигенсвязывающего домена посредством диссоциации его с использованием низкомолекулярного соединения в более низкой концентрации, чем на стадии (a) выше;

(c) связывание полинуклеотида, который кодирует антигенсвязывающий домен, собранный на стадии (b) выше, с полинуклеотидом, который кодирует полипептид, содержащий Fc-область;

(d) культивирование клетки, в которую введен вектор, с которым полинуклеотид, полученный на стадии (c) выше, функционально связан; и

(e) сбор антигенсвязывающей молекулы из культурального раствора клетки, культивированной на стадии (d) выше.

15. Способ п.14, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

16. Способ по п.12, который включает антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который дополнительно включает стадии:

1) приведение в контакт библиотеки с низкомолекулярным соединением и

2) отбор антигенсвязывающих доменов, собранных на стадии 1) выше.

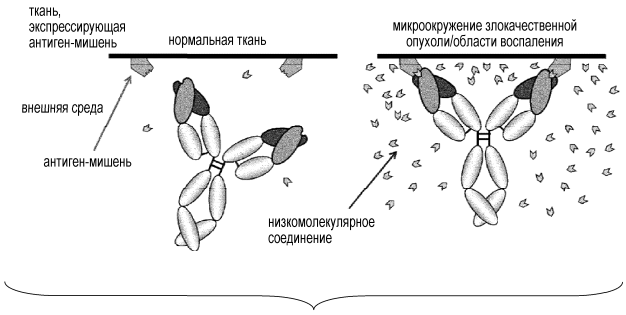
17. Способ по п.16, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.

18. Способ по п.14, который включает антигенсвязывающий домен, антигенсвязывающая активность которого варьируется в зависимости от концентрации низкомолекулярного соединения, который дополнительно включает стадии:

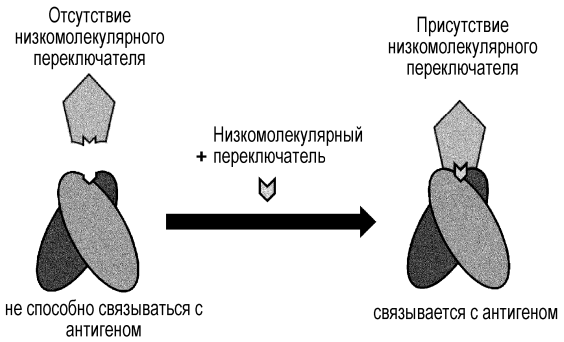
1) приведение в контакт библиотеки с низкомолекулярным соединением и

2) отбор антигенсвязывающих доменов, собранных на стадии 1) выше.

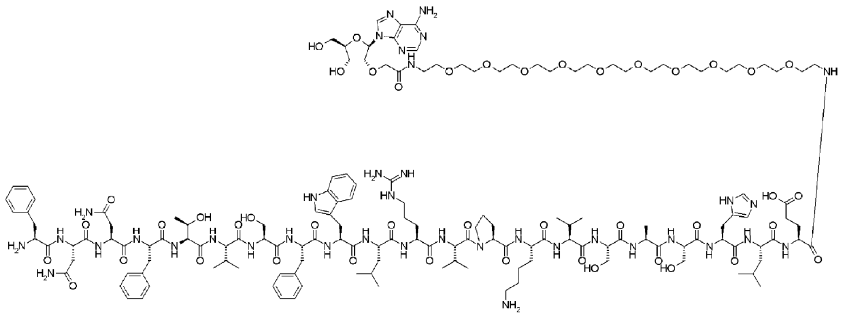
19. Способ по п.18, где низкомолекулярное соединение представляет собой кинуренин, аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат или аденозинтрифосфат.



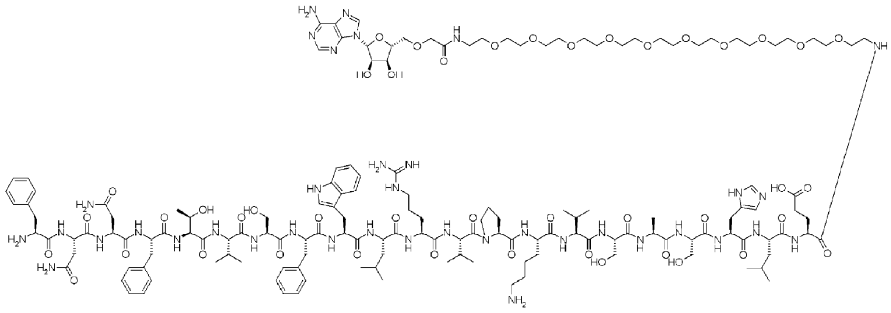
Фиг. 1



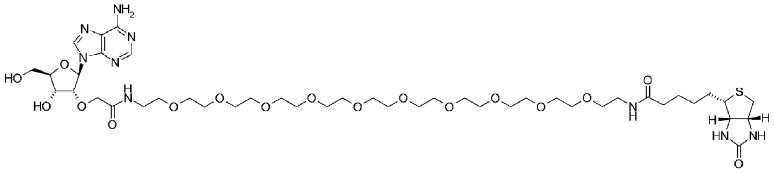
Фиг. 2



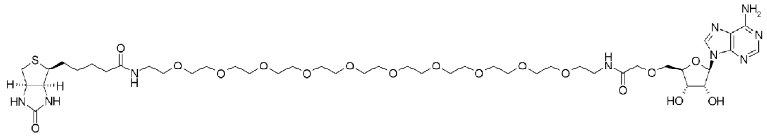
Фиг. 3



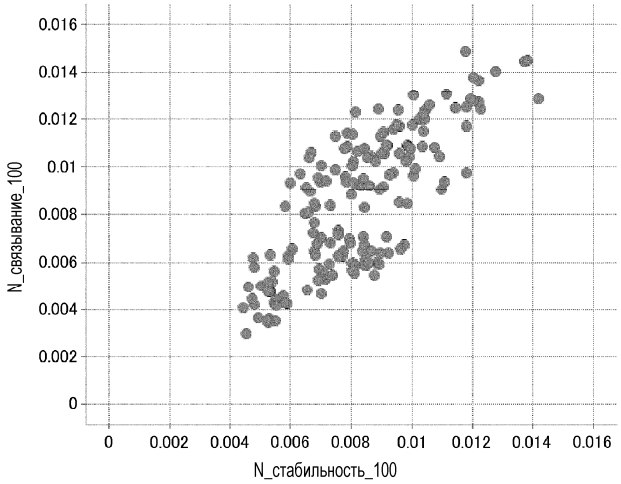
Фиг. 4



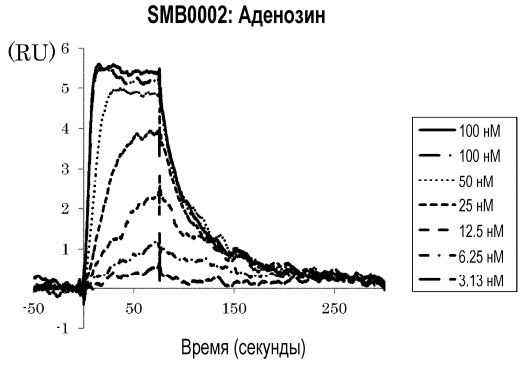
Фиг. 5



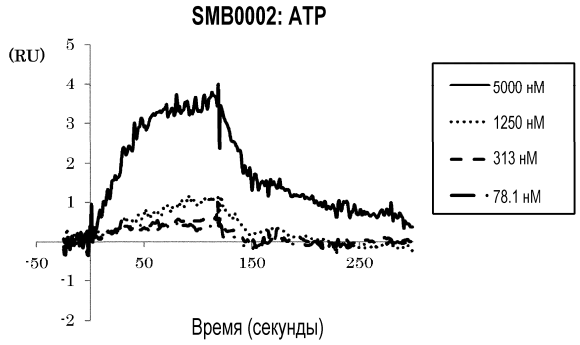
Фиг. 6



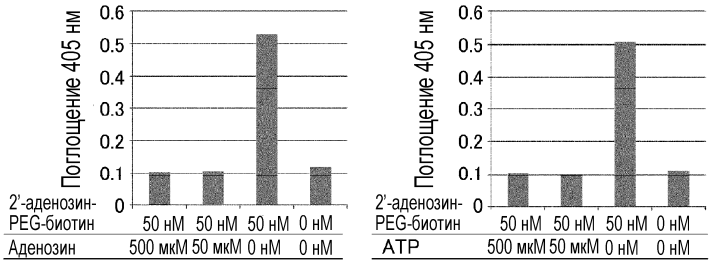
Фиг. 7



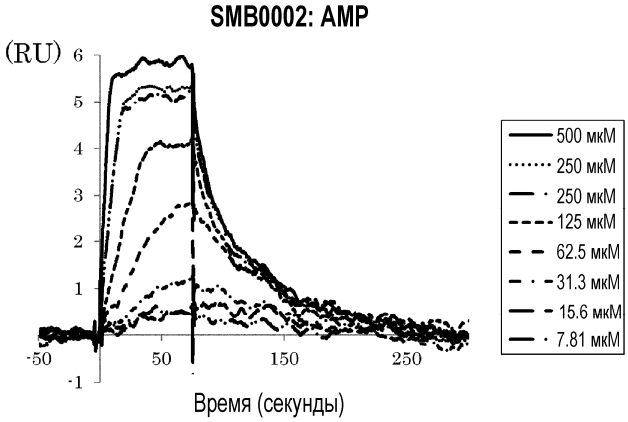
Фиг. 8A



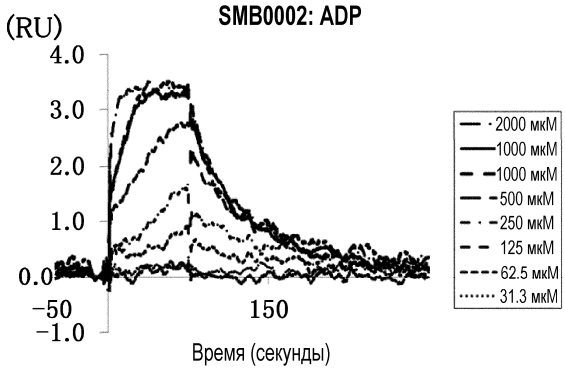
Фиг. 8B



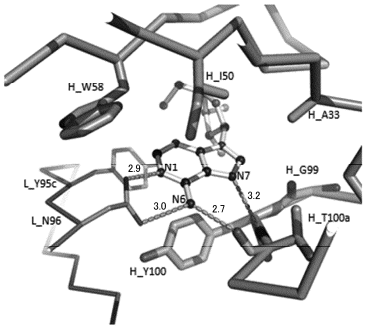
Фиг. 9



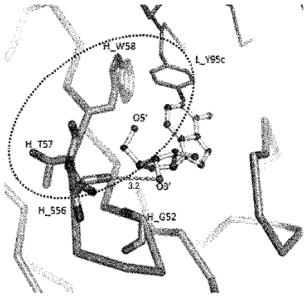
Фиг. 10A



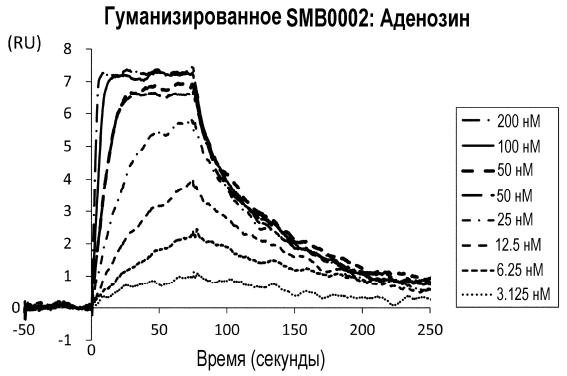
Фиг. 10B



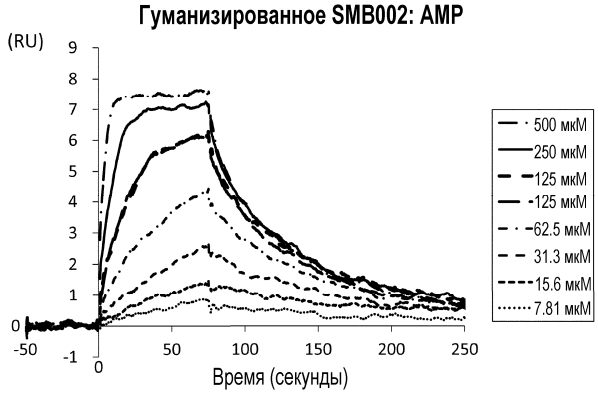
Фиг. 11A



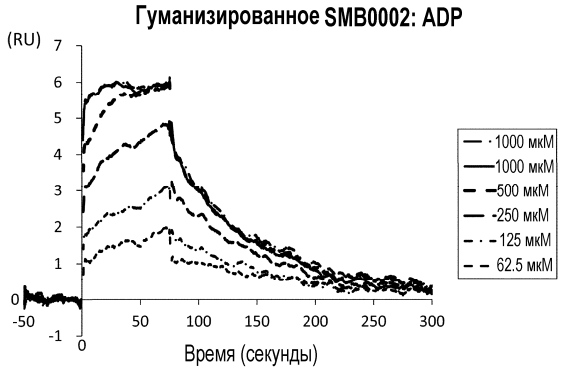
Фиг. 11B



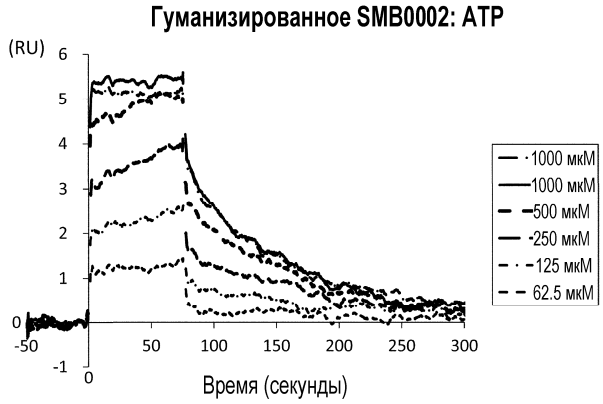
Фиг. 12



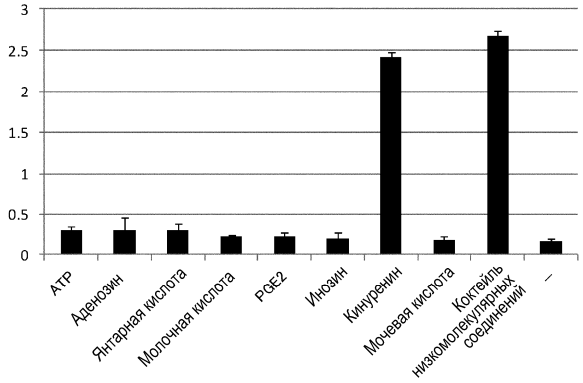
Фиг. 13



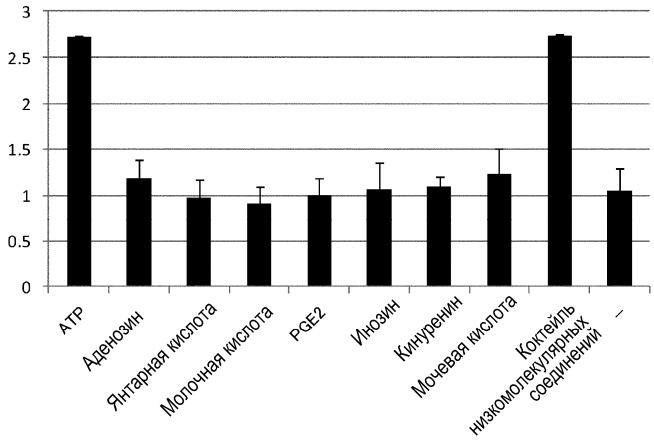
Фиг. 14



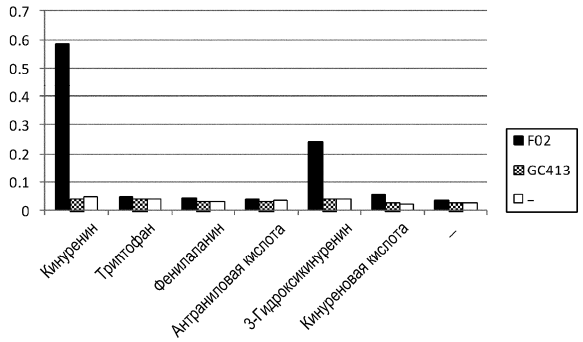
Фиг. 15



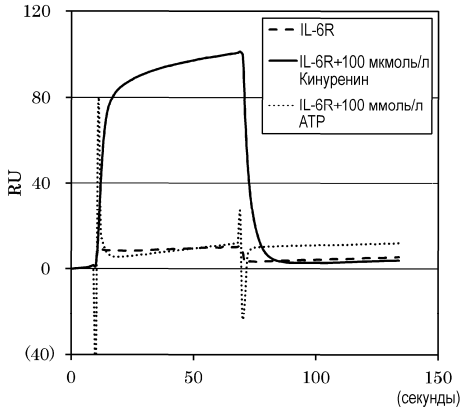
Фиг. 16



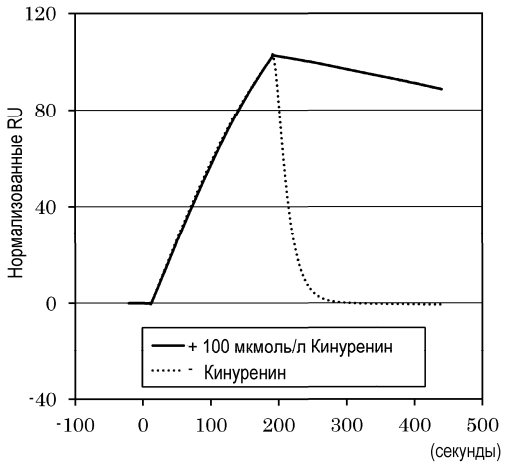
Фиг. 17



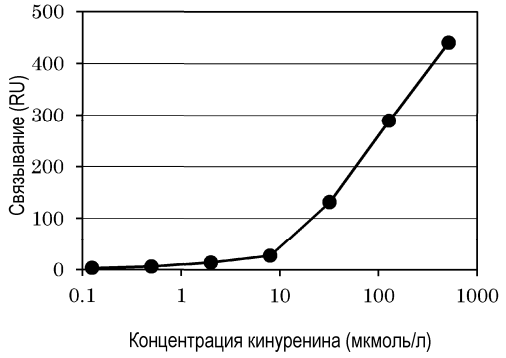
Фиг. 18



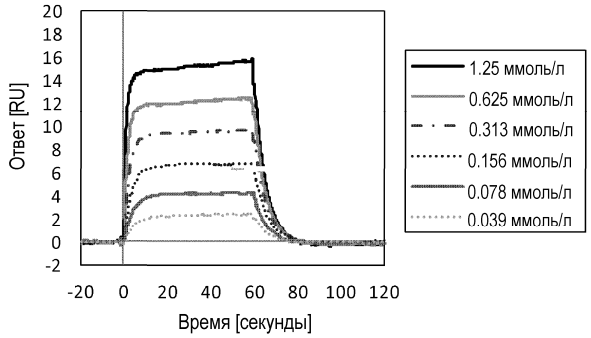
Фиг. 19



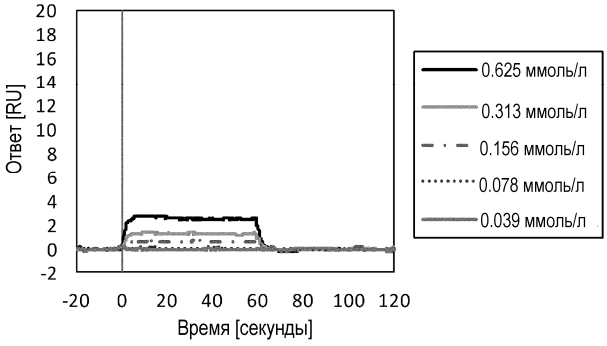
Фиг. 20



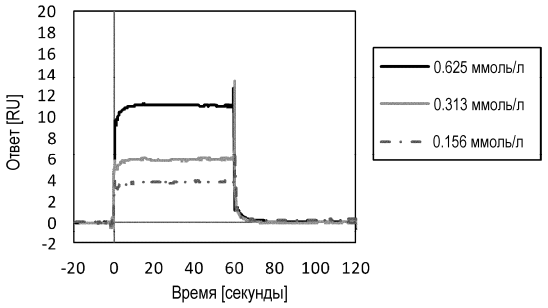
Фиг. 21



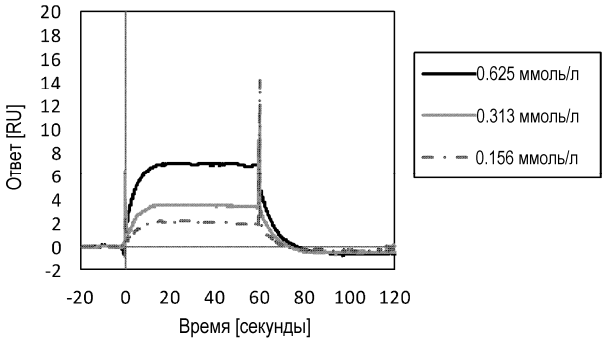
Фиг. 22



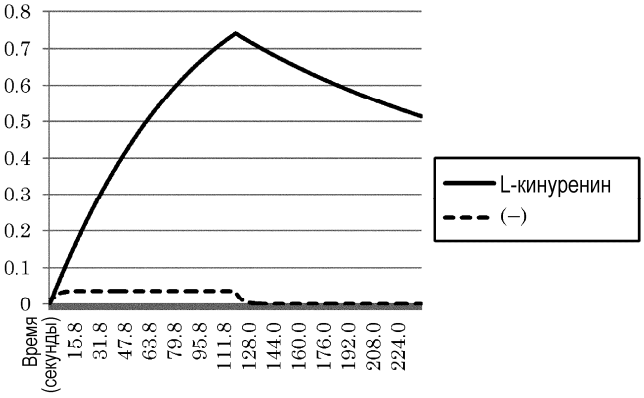
Фиг. 23



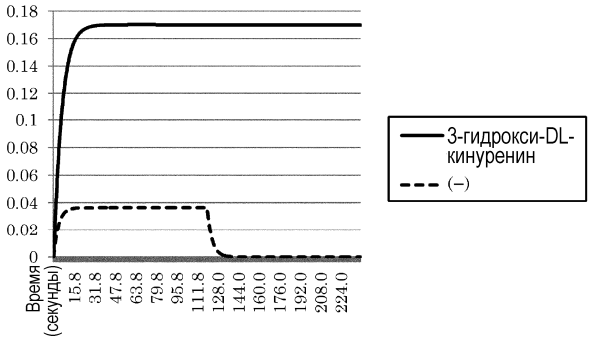
Фиг. 24



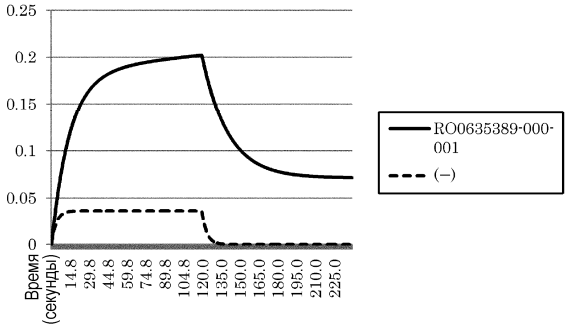
Фиг. 25



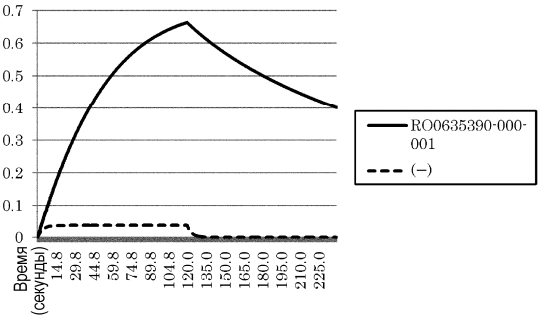
Фиг. 26



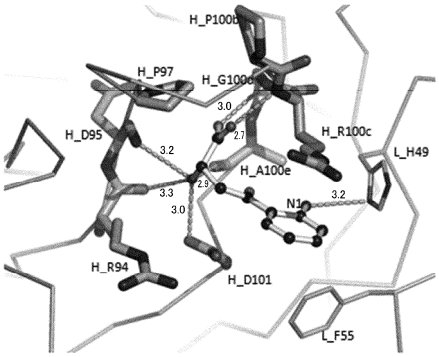
Фиг. 27



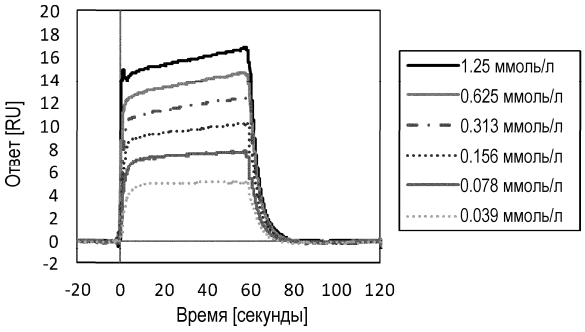
Фиг. 28



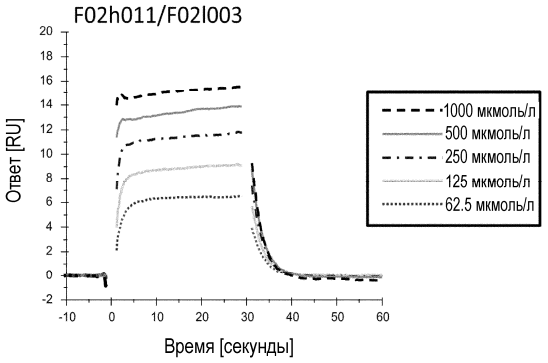
Фиг. 29



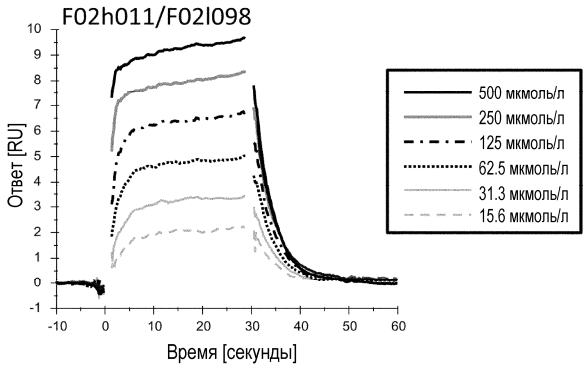
Фиг. 30



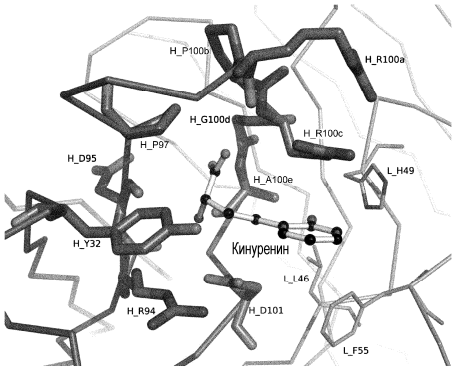
Фиг. 31



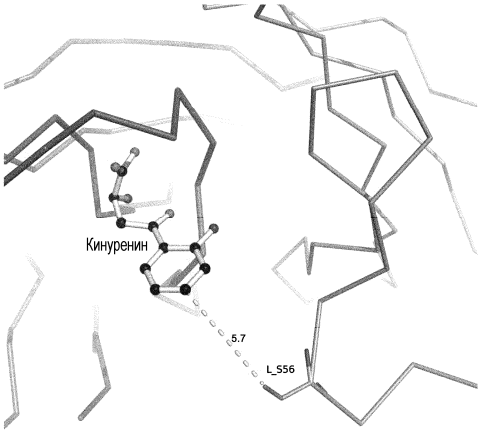
Фиг. 32



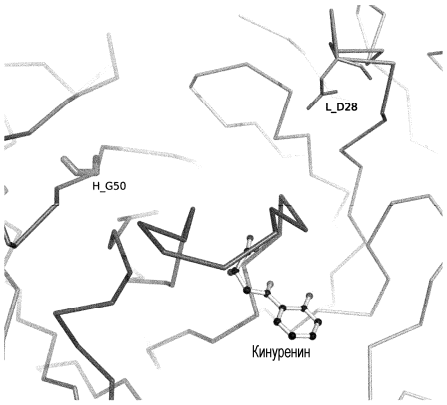
Фиг. 33



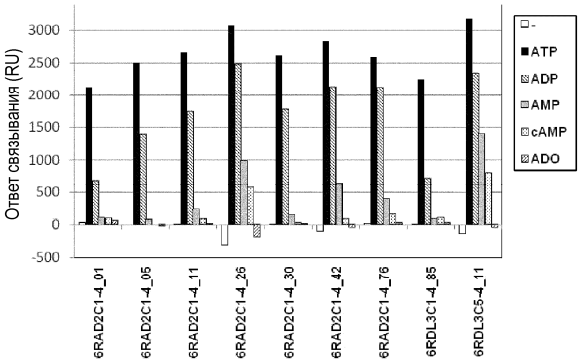
Фиг. 34



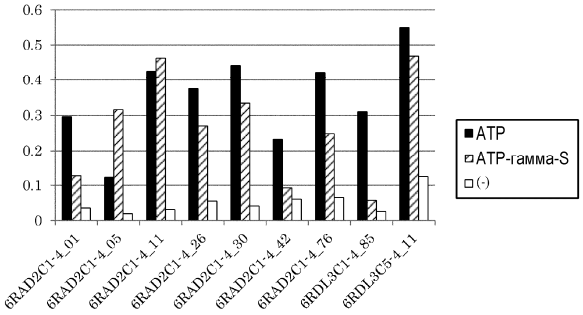
Фиг. 35



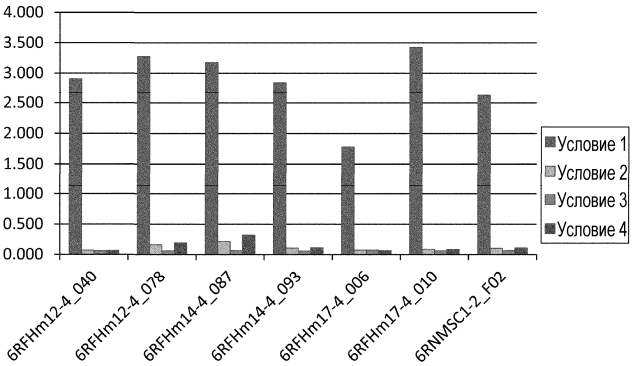
Фиг. 36



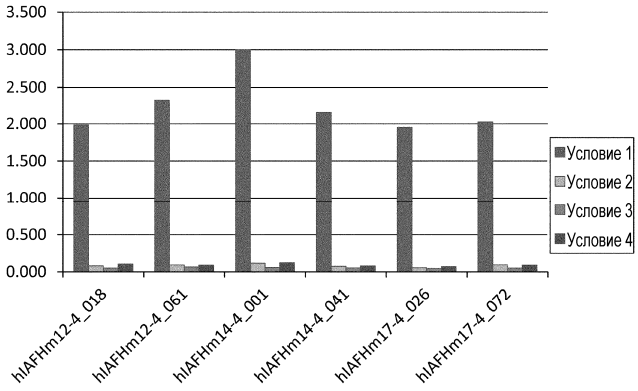
Фиг. 37



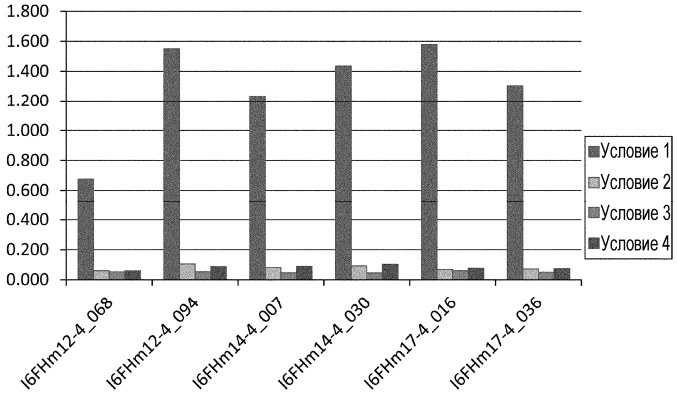
Фиг. 38



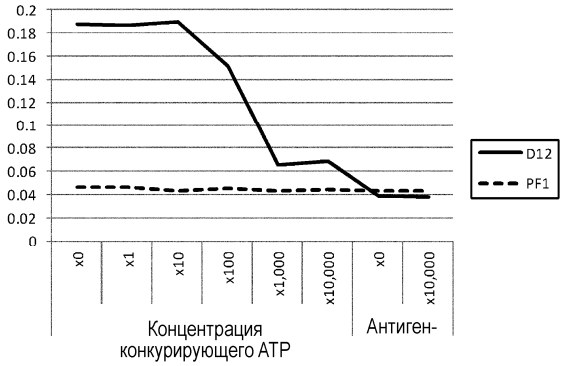
Фиг. 39



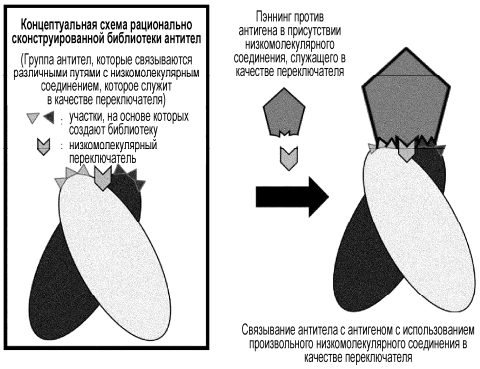
Фиг. 40



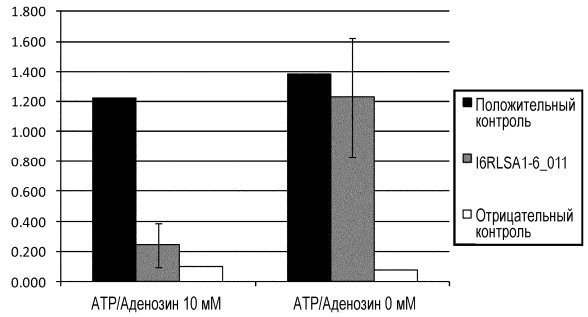
Фиг. 41



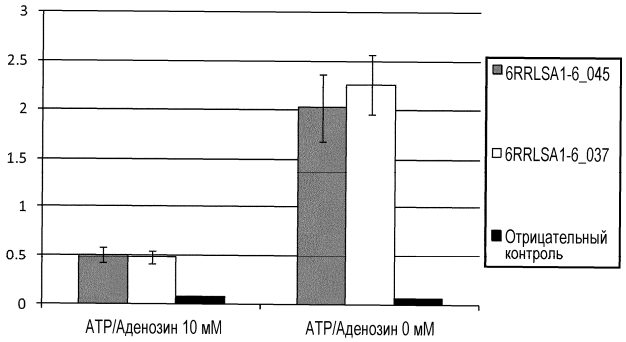
Фиг. 42



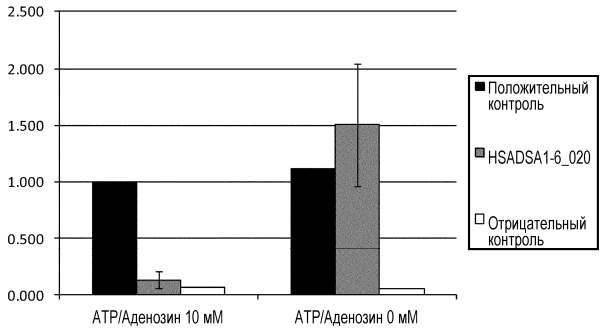
Фиг. 43



Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46