

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042588**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.02

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892063

(22) Дата подачи заявки
2017.03.14

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ С ИЗМЕНЕННЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ FcRn

(31) 62/307,686

(32) 2016.03.14

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/IB2017/000327

(87) WO 2017/158426 2017.09.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТЕТ И ОСЛО (NO)

(72) Изобретатель:
**Фосс Стиан, Андерсен Ян Терье,
Саннли Ингер (NO)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) ALGIRDAS GREVYS ET AL.: "Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 194, no. 11, 22 April 2015 (2015-04-22), pages 5497-5508, XP055375225, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1401218, e.g. page 5498, left-hand column, paragraph 3, 4; the whole document

DATTA-MANNAN AMITA ET AL.: "Humanized IgG1 Variants with Differential Binding Properties to the Neonatal Fc Receptor: Relationship to Pharmacokinetics in Mice and Primates", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 35, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 86-94, XP009077715, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/DMD.106.011734, e.g. page 87, left-hand column, paragraph 2; the whole document

WO-A1-2010045193

WO-A2-2006084264

M. JACK BORROK ET AL.: "pH-dependent Binding Engineering Reveals an FcRn Affinity Threshold That Governs IgG Recycling", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 290, no. 7, 23 December 2014 (2014-12-23), pages 4282-4290, XP055173622, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.603712, e.g. page 4, right-hand column, paragraph 2; the whole document

WILLIAM R. STROHL: "Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters", BIODRUGS, vol. 29, no. 4, 16 July 2015 (2015-07-16), pages 215-239, XP055304636, NZ, ISSN: 1173-8804, DOI: 10.1007/s40259-015-0133-6, e.g. abstract; table 2; the whole document

(57) Изобретение относится к композициям и способам для терапии, опосредуемой антителами. В частности, изобретение относится к модифицированным иммуноглобулинам с измененным временем полужизни.

B1

042588

042588

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для терапии, опосредуемой антителами. В частности, настоящее изобретение относится к модифицированным иммуноглобулинам с измененным периодом полужизни.

Уровень техники

Антитела представляют собой иммунологические белки, которые связываются со специфичным антигеном. У большинства млекопитающих, включая человека и мышей, антитела состоят из спаренных тяжелых и легких полипептидных цепей. Каждая цепь состоит из индивидуальных иммуноглобулиновых доменов (Ig), и соответственно для таких белков используется общий термин "иммуноглобулин". Каждая цепь состоит из двух различных областей, называемых переменными и константными областями. Последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепей значительно различаются между антителами и отвечают за связывание с антигеном-мишенью. Константные области характеризуются меньшим разнообразием последовательностей и отвечают за связывание с рядом природных белков, для запуска важных биохимических событий. У человека существует пять различных классов антител, включая IgA (который включает подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (который включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Отличительной особенностью упомянутых классов антител являются их константные области, хотя в V-области могут существовать более тонкие различия.

На фиг. 1 представлено антитело IgG1, используемое в настоящем документе в качестве примера для описания общих структурных особенностей иммуноглобулинов. Антитела IgG представляют собой тетрамерные белки, состоящие из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Тяжелая цепь IgG состоит из четырех доменов иммуноглобулина, соединенных в направлении от N-конца к C-концу в порядке VH-CH1-CH2-CH3, что означает переменный домен тяжелой цепи, константный домен тяжелой цепи 1, константный домен тяжелой цепи 2 и константный домен тяжелой цепи 3 (также обозначается VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3, что означает переменный домен тяжелой цепи, константный γ -домен 1, константный γ -домен 2 и константный γ -домен 3 соответственно). Легкая цепь IgG состоит из двух доменов иммуноглобулина, соединенных в направлении от N-конца к C-концу в порядке VL-CL, что означает переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи соответственно.

Переменная область антитела содержит антигенсвязывающие детерминанты молекулы и, следовательно, определяет специфичность антитела в отношении его антигена-мишени. Переменная область называется так, поскольку она наиболее значительно отличается по последовательности от других антител того же класса. Наиболее сильная переменность последовательности наблюдается в участках, определяющих комплементарность (CDR). Всего существует шесть CDR, по три на тяжелую цепь и легкую цепь, которые обозначаются CDR1 V_H, CDR2 V_H, CDR3 V_H, CDR1 V_L, CDR2 V_L и CDR3 V_L. Переменная область за пределами CDR называется каркасным участком (FR). Несмотря на то, что FR не столь разнообразны, как CDR, последовательность каркасных участков у разных антител может различаться. В целом, такая характерная структура антител обеспечивает стабильный каркас (участок FR), на основе которого иммунная система может исследовать существенное разнообразие антигенсвязывающих участков (CDR), обеспечивая специфичность в отношении широкого спектра антигенов. Доступен ряд структур с высоким разрешением для различных фрагментов переменных областей разных организмов, некоторые в несвязанной форме, а некоторые в комплексе с антигеном. Последовательность и структурные особенности переменных областей антител хорошо охарактеризованы (Morea et al., 1997, *Biophys Chem.* 68:9-16; Morea et al., 2000, *Methods*, 20:267-279, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки), и консервативные признаки антител позволили разработать множество методик модификации антител (Maupard et al., 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-376, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Например, существует возможность прививки CDR из одного антитела, например мышинового антитела, на каркасный участок другого антитела, например антитела человека. Этот метод, называемый в данной области "гуманизация", позволяет получать менее иммуногенные терапевтические средства на основе антител из антител из видов, отличных от человека. Фрагменты, включающие переменную область, могут существовать в отсутствие других областей антитела, включая, например, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), содержащий V_H-C γ 1 и V_H-C_L, переменный фрагмент (Fv), содержащий V_H и V_L, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий V_H и V_L, соединенные вместе в одной и той же цепи, а также множество других фрагментов переменных областей (Little et al., 2000, *Immunol Today*, 21:364-370, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Область Fc антитела взаимодействует с рядом рецепторов и лигандов Fc, обеспечивая ряд важных функциональных возможностей, называемых эффекторными функциями.

В IgG сайт на области Fc, содержащий аминокислоты как из домена C_H2, так и домена C_H3, опосредует взаимодействие с неонатальным рецептором Fc (FcRn), рецептором, который обеспечивает возвращение антитела после эндоцитоза из эндосомы обратно в кровотока (Raghavan et al., 1996, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Этот процесс, в сочетании с предотвращением фильтрации

почками благодаря большому размеру полноразмерной молекулы, обеспечивает благоприятные периоды полужизни антител в сыворотке крови в течение от одной до трех недель. Связывание Fc с FcRn также играет ключевую роль в транспорте антител внутри и между клетками. Сайт связывания для FcRn на Fc также является сайтом, с которым связываются бактериальные белки A и G. Прочное связывание с этими белками, как правило, применяют в качестве средства для очистки антител, используя аффинную хроматографию с носителями на основе белка A или белка G во время очистки белка. Следовательно, качество упомянутой области на Fc важно как для клинических свойств антител, так и для их очистки.

FcRn играет ключевую роль в нескольких иммунологических и неиммунологических процессах, поскольку он выступает посредником переноса материнских IgG плоду, регулирует устойчивость IgG и альбумина в сыворотке крови и транспортирует оба лиганда между различными клеточными компартментами. Помимо этого, FcRn усиливает презентацию и перекрестную презентацию антигена. В отличие от TRIM21, который обнаруживается в цитозоле, FcRn представляет собой трансмембранный рецептор, который находится преимущественно в подкисленных эндосомах и транспортирует свои лиганды посредством путей рециркуляции или трансцитоплазматического пути через слои поляризованных клеточек. Однако FcRn также может усиливать процессинг иммунных комплексов с последующей презентацией антигенных пептидов T-клеткам. Отличительной особенностью взаимодействия FcRn-IgG является то, что связывание FcRn с Fc IgG строго зависит от pH, в частности связывание происходит при кислом pH и связывание или высвобождение отсутствует при нейтральном pH, что является предпосылкой для опосредуемого FcRn переноса внутри клеток и за их пределы. Модификация взаимодействия FcRn-Fc IgG привела к получению антител с более коротким или более длительным периодом полужизни из сыворотки крови или с измененной способностью к транспортировке через клеточные слои. FcRn широко экспрессируется и как таковой обнаруживается в различных клеточных положениях как в гемопозитических, так и в негемопозитических клетках.

Существует потребность в улучшенных терапевтических IgG, которые проявляют повышенное pH-зависимое связывание с FcRn.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для терапии, опосредуемой антителами. В частности, настоящее изобретение относится к модифицированным иммуноглобулинам с измененным периодом полужизни.

Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композиции, содержащей терапевтический иммуноглобулин с измененной аффинностью связывания в отношении FcRn, причем указанный иммуноглобулин содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин относится к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин представляет собой гибрид области Fc одного из вариантов иммуноглобулинов, описанных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин содержит мутации в одном или более положениях, выбранных, например, из 311, 434, 428, 438 или 435. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация представляет собой, например:

IgG1-Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434W, IgG1-Q311R,
IgG1-N434W, IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E, IgG3(b)-Q311R/N434W/M438E/R435H,
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434P/M428E,
IgG1-Q311R/N434W/M428D, IgG1-Q311R/N434W/M428E/H433K,
IgG1-L309K/Q311R/N434W/M428E, IgG1-L309R/Q311R/N434W/M428E,
IgG1-L309S/Q311R/N434W/M428E или IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E/R435H

(например, константная область иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, или последовательности, которые по меньшей мере на 90% (например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичны SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16).

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая: иммуноглобулин, содержащий по меньшей мере одну мутацию в области Fc, причем указанный иммуноглобулин характеризуется измененным связыванием с FcRn, и при этом указанная мутация выбрана, например, из:

IgG1-Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434W, IgG1-Q311R,
IgG1-N434W, IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E, IgG3(b)-Q311R/N434W/M438E/R435H,
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434P/M428E,
IgG1-Q311R/N434W/M428D, IgG1-Q311R/N434W/M428E/H433K,
IgG1-L309K/Q311R/N434W/M428E, IgG1-L309R/Q311R/N434W/M428E,
IgG1-L309S/Q311R/N434W/M428E или IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E/R435H.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен иммуноглобулин IgG1 с измененным связыванием FcRn, причем указанный иммуноглобулин содержит мутации Q311R, N434W и M428E.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывается с мишенью, выбранной, например, из маркера рака, цитокина, маркера инфекционного заболевания или фактора роста.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложено применение иммуноглобулинов, описанных в настоящем документе, для лечения или предотвращения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание представляет собой, например, рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, отторжение трансплантата или инфекционное заболевание, однако в объем настоящего изобретения конкретно включены и другие заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывается с мишенью, выбранной, например, из маркера рака, цитокина, маркера инфекционного заболевания или фактора роста, однако в объем настоящего изобретения конкретно включены и другие мишени.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий обеспечение иммуноглобулинов, описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложены вакцинные композиции, содержащие варианты иммуноглобулинов или гибриды областей Fc, описанные в настоящем документе (например, гибридные с иммуногеном) и их применение для индукции иммунного ответа у субъекта.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), свидетельствующие о связывании панели Fc-модифицированных вариантов h9C12 IgG1 с FcRn человека при pH 6,0 (верхняя панель) и pH 7,4 (нижняя панель).

На фиг. 2 представлены сенсограммы, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), свидетельствующие о связывании панели Fc-модифицированных вариантов h9C12 IgG1 с FcRn человека при pH 6,0 (7,8-4000,0 нМ) и pH 7,4 (4000,0 нМ). IgG1-M252Y/S254T/T256E был включен в качестве контроля.

На фиг. 3 представлено сопоставление аминокислотных последовательностей вариантов IgG1. Аминокислотная последовательность константного домена Fc-модифицированных вариантов IgG1.

На фиг. 4 представлены последовательности из фиг. 3.

На фиг. 5 представлены результаты ИФА, свидетельствующие о связывании панели Fc-модифицированных вариантов h9C12 IgG1 и IgG3 с FcRn человека при pH 6,0 и 7,4.

На фиг. 6 представлены сенсограммы SPR, свидетельствующие о связывании панели Fc-модифицированных вариантов h9C12 IgG1 с FcRn человека при pH 6,0 (1000-15,6 нМ) (A-D) и pH 7,4 (1000 нМ) (E-F).

На фиг. 7 представлены данные о периоде полужизни в условиях *in vivo* (остаток, %) (A) вариантов h9C12 и (B) NIP IgG1 у мышей линии Tg32-Alb^{-/-}, трансгенных по гену FcRn человека. NIP = 4-гидрокси-3-йод-5-нитрофенилуксусная кислота.

На фиг. 8 представлены последовательности вариантов IgG.

Определения

В настоящем документе термин "антитело" используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. Термин также включает фрагменты антител, содержащие область Fc, и гибридные (слитые) белки, которые содержат область, эквивалентную области Fc иммуноглобулина.

Термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv), диатела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В настоящем документе термин "область Fc" используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область Fc тяжелой цепи IgG человека расположена от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) области Fc может присутствовать или может отсутствовать. Если не указано иное, нумерация остатков аминокислот в области Fc или константной области соответствует системе нумерации ЕС, также называемой индексом ЕС, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

В настоящем документе термин "эффektorные функции" используется в отношении тех видов био-

логической активности, относящихся к области Fc антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание с C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз; секрецию цитокинов, опосредуемое иммунными комплексами поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, подавление активности рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток.

Термин "дикий тип", если он используется в отношении белка, относится к белкам, кодируемым геном клетки, ткани или организма, за исключением белка, который обрабатывают для получения синтетических белков.

Термин "антигенсвязывающий домен" относится к части антигенсвязывающей молекулы, которая содержит область, которая специфично связывается и является комплементарной части или полноразмерному антигену. В случае большого антигена антигенсвязывающая молекула может связываться только с определенной частью антигена, эта часть называется эпитопом. Антигенсвязывающий домен может быть обеспечен, например, одним или более переменными доменами антитела (также называемыми переменными областями антитела). Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи антитела (V_L) и переменную область тяжелой цепи антитела (V_H).

Термин "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида. Например, для химерных антител компоненты, не связывающие антиген, могут быть получены из широкого разнообразия видов, включая приматов, таких как шимпанзе и человек. Гуманизированные антитела являются особенно предпочтительной формой химерных антител.

Термин "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, которую содержит тяжелая цепь антитела. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , β , δ , ϵ , γ и μ .

Подразумевается, что термин "область, эквивалентная области Fc иммуноглобулина" включает природные аллельные варианты области Fc иммуноглобулина, а также варианты, содержащие изменения, которые дают замены, добавления или делеции, но которые существенно не снижают способность иммуноглобулина опосредовать эффекторные функции (такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность). Например, одна или более аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца области Fc иммуноглобулина без существенной потери биологической функции. Такие варианты могут быть выбраны в соответствии с общими правилами, известными в данной области техники, так, чтобы оказывать минимальное влияние на активность (см., например, Bowie, J.U. et al., Science, 247:1306-10 (1990)).

Термин "каркас" или "FR" относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков гиперпеременного участка (HVR) (или CDR). FR переменного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно расположены в следующей последовательности в V_H (или V_L): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

В настоящем документе термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, которая по существу аналогична структуре нативного антитела, или содержащего тяжелые цепи, которые содержат область Fc, определенную в настоящем документе.

"Консенсусный каркас человека" представляет собой каркас, который представляет наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выборке каркасных последовательностей V_L или V_H иммуноглобулина человека. Обычно последовательности V_L или V_H иммуноглобулина человека выбирают из подгруппы последовательностей переменных доменов. Обычно подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication, 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в случае V_L подгруппа представляет собой подгруппу каппа I, описанную в Kabat et al., см. выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в случае V_H подгруппа представляет собой подгруппу III, описанную в Kabat et al., см. выше.

"Гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему остатки аминокислот из HVR вида, отличного от человека, и остатки аминокислот из FR человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все HVR (например, CDR) соответствуют HVR антитела, отличного от антитела человека, и все или по существу все FR соответствуют FR антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. "Гуманизированная форма" антитела, например антитела, отличного от антитела человека, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

В настоящем документе термин "гиперпеременный участок" или "HVR" относится к каждому из

участков варибельного домена антитела, последовательности которых являются гиперварибельными и/или образуют структурно определенные петли ("гиперварибельные петли"). Обычно нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). HVR обычно содержат остатки аминокислот из гиперварибельных петель и/или из "участков, определяющих комплементарность" (CDR), причем CDR имеют самую высокую варибельность последовательности и/или участвуют в распознавании антигена. За исключением CDR1 в V_H , CDR обычно содержат остатки аминокислот, которые образуют гиперварибельные петли. Гиперварибельные участки (HVR) также называются участками, определяющими комплементарность (CDR), и в настоящем документе эти термины используются взаимозаменяемо по отношению к частям варибельной области, которые образуют антигенсвязывающие участки. Этот конкретный участок был описан в работе Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), где определения включают перекрытия или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов включено в термин, определенный и используемый в настоящем документе. Соответствующие остатки аминокислот, которые включают CDR, как определено в каждом из цитируемых выше документов, для сравнения представлены в табл. 1. Точные номера остатков, которые включают конкретный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники обычно могут определить, какие остатки содержат конкретный CDR с учетом аминокислотной последовательности варибельной области антитела.

Термин "вариант" и "мутант" применительно к полипептиду относится к аминокислотной последовательности, которая отличается по одной или более аминокислотам от другого, обычно родственного полипептида. Вариант может иметь "консервативные" изменения, при которых замененная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства. Один тип консервативных замен аминокислот относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, включает глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, включает серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, включает аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, включает фенилаланин, тирозин и триптофан; не-природные аминокислоты, такие как *p*-аминофенилаланин; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, включает лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, содержащих боковые цепи, включает цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот включают валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Реже вариант может содержать "неконсервативные" изменения (например, замену глицина триптофаном). Сходные незначительные изменения также могут включать делеции или вставки аминокислот (т.е. добавления) или и то, и другое. Указания по определению того, какие и сколько остатков аминокислот можно заменить, вставить или удалить без устранения биологической активности, можно получить при помощи компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники, например, программного обеспечения DNASTar. Варианты можно испытывать в функциональных количественных исследованиях. Предпочтительные варианты имеют менее 10% и предпочтительно менее 5% и еще более предпочтительно менее 2% изменений (независимо от того представляют они замены, делеции и т.д.). Для замены аминокислот используют следующую номенклатуру: исходная аминокислота, положение, заменяющая аминокислота. Соответственно, замена лизина аланином в положении 573 обозначается как "K573A", и замена лизина пролином в положении 573 обозначается как K573P. Множественные мутации разделяют путем добавления отметок "+" или "/", например "Gly205Arg + Ser411Phe" или "G205R/S411F", которые представляют мутации в положениях 205 и 411 при замене глицина (G) аргинином (R) и серина (S) фенилаланином (F) соответственно.

Сходство между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями описывается параметром "идентичность". Для целей настоящего изобретения степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453), который применяется в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: Европейский пакет открытого программного обеспечения по молекулярной биологии, Rice et al., 2000, Trends in Genetics, 16:276-277), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Необязательные использованные параметры 11644.000-EP7 включают штраф за открытие пробела 10, штраф за расширение пробела 0,5 и матрицу замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Результат программы Needle, помеченный как "самая длинная идентификация" (полученный с использованием функции - nobrief), используется в качестве процента идентичности и рассчитывается следующим образом:

$$\frac{\text{(Идентичные остатки} \times 100)}{\text{(Длина сопоставления-общее количество пробелов при сопоставлении)}}$$

Выражение "положение аминокислоты, соответствующее" положению в эталонной последовательности и аналогичное выражение предназначены для идентификации остатка аминокислоты, который в первичной или пространственной структуре соответствует конкретному положению в эталонной последовательности. Специалист в данной области техники поймет, что это можно сделать путем сопоставле-

ния конкретной последовательности с эталонной последовательностью и идентификации остатка аминокислоты, который сопоставляется с конкретным положением в эталонной последовательности.

Выражение X_{nnn} означает аминокислотный остаток X, расположенный в положении, соответствующем положению nnn в HSA, и выражение $X_{nnn}Y$ означает замену любой аминокислоты X, расположенной в положении, соответствующем положению nnn в HSA, остатком аминокислоты Y.

В настоящем документе термин "аффинность" относится к мере прочности связывания между двумя членами пары связывания, например иммуноглобулином и FcRn. K_d обозначает константу диссоциации и имеет размерность молярности. Константа аффинности является обратной константе диссоциации. Константа аффинности иногда используется как общий термин для описания химического соединения. Это прямая мера энергии связывания. Натуральный логарифм K линейно связан со свободной энергией связывания, энергией Гиббса, через уравнение $\Delta G_0 = -RTLN(K)$, где R представляет собой газовую постоянную и температура указывается в градусах Кельвина. Аффинность может быть определена экспериментально, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием коммерчески доступных блоков Biacore SPR (GE Healthcare).

В настоящем документе термин "в условиях, при которых у указанного субъекта развивается иммунный ответ" относится к любой качественной или количественной индукции, генерации и/или стимуляции иммунного ответа (например, врожденного или приобретенного).

В настоящем документе термин "иммунный ответ" относится к ответу иммунной системы субъекта. Например, иммунные ответы включают, но не ограничиваются ими, детектируемое изменение (например, увеличение) активации Toll-рецептора, экспрессии и/или секреции лимфокина (например, цитокина (например, цитокинов типа Th1 или Th2) или хемокина), активации макрофагов, активации дендритных клеток, активации Т-клеток (например, $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клеток), активации NK-клеток и/или активации В-клеток (например, выработки и/или секреции антител). Дополнительные примеры иммунных ответов включают связывание иммуногена (например, антигена (например, иммуногенного полипептида)) с молекулой ГКГС и индукцию ответа цитотоксического Т-лимфоцита ("CTL"), индукцию ответа В-клеток (например, выработку антител), и/или ответа хелперных Т-лимфоцитов, и/или ответа гиперчувствительности замедленного типа (DTH) на антиген, из которого получен иммуногенный полипептид, размножение (например, увеличение популяции клеток) клеток иммунной системы (например, Т-клеток, В-клеток (например, на любой стадии развития (например, плазматических клеток) и усиление процессинга и презентации антигена антигенпрезентирующими клетками. Иммунный ответ может быть нацелен к иммуногенам, которые иммунная система субъекта распознает как чужеродные (например, чужеродные антигены микроорганизмов (например, патогенов) или аутоантигены, распознанные как чужеродные). Следовательно, следует понимать, что в настоящем документе термин "иммунный ответ" относится к любому типу иммунного ответа, включая, но не ограничиваясь ими, врожденные иммунные ответы (например, активацию сигнального каскада с участием Toll-рецептора), опосредуемые клетками иммунные ответы (например, опосредуемые Т-клетками ответы (например, антигенспецифичными Т-клетками) и неспецифичными клетками иммунной системы) и гуморальные иммунные ответы (например, опосредуемые В-клетками ответы (например, посредством выработки и секреции антител в плазму крови, лимфу и/или тканевые жидкости). Термин "иммунный ответ" включает все аспекты способности иммунной системы субъекта отвечать на антигены и/или иммуногены (например, исходный ответ на иммуноген (например, патоген), а также приобретенные ответы (например, память), которые являются результатом адаптивного иммунного ответа).

В настоящем документе термин "иммунитет" относится к защите от заболевания (например, к предотвращению или ослаблению (например, подавлению) признака, симптома или состояния заболевания) при воздействии микроорганизма (например, патогена), способного вызывать заболевание. Иммуитет может быть врожденным (например, неадаптивные (например, не приобретенные) иммунные ответы, которые существуют в отсутствие предшествующего воздействия антигена) и/или приобретенным (например, иммунные ответы, которые опосредуются В- и Т-клетками после предыдущего воздействия антигена (например, В- и Т-клетками, которые проявляют повышенную специфичность и реактивность в отношении антигена)).

В настоящем документе термин "иммуноген" относится к агенту (например, микроорганизму (например, бактерии, вирусу или грибку) и/или его части или его компоненту (например, белковому антигену)), который способен вызывать иммунный ответ у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногены вызывают иммунитет против иммуногена (например, микроорганизма (например, патогена или патогенного продукта)).

Термин "испытываемое (тестируемое) соединение" относится к любому химическому соединению, фармацевтическому препарату, лекарственному препарату и т.п., которое может применяться для лечения или предотвращения заболевания, недуга, недомогания или нарушения функции организма или может иным образом изменить физиологический или клеточный статус образца. Испытываемые соединения включают как известные, так и потенциальные терапевтические соединения. Испытываемое соединение может быть определено как терапевтическое путем скрининга с использованием способов скрининга согласно настоящему изобретению. "Известное терапевтическое соединение" относится к терапев-

тическому соединению, которое, как было показано (например, с помощью исследований на животных или предшествующего опыта применения у человека), является эффективным в таком лечении или прототипировании.

В настоящем документе термин "образец" используется в самом широком смысле. В одном варианте термин может относиться к образцу ткани. В другом варианте термин предназначен для включения образца или культуры, полученной из любого источника, в том числе биологического. Биологические образцы могут быть получены от животных (включая человека) и включают жидкости, твердые вещества, ткани и газы. Биологические образцы включают, но не ограничиваются ими, продукты крови, такие как плазма, сыворотка и т.п. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие типы образцов, применимые согласно настоящему изобретению. Образец, который предположительно содержит хромосому человека или последовательности, связанные с хромосомой человека, может содержать клетку, хромосомы, выделенные из клетки (например, при расхождении метафазных хромосом), геномную ДНК (в растворе или связанную с твердой подложкой, такой как подложка для проведения Саузерн-блоттинга), РНК (в растворе или связанную с твердой подложкой, такой как подложка для проведения Нозерн-блоттинга), кДНК (в растворе или связанную с твердой подложкой) и т.п. Образец, который предположительно содержит белок, может содержать клетку, часть ткани, экстракт, содержащий один или более белков, и т.п.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для терапии, опосредуемой антителами. В частности, настоящее изобретение относится к модифицированным иммуноглобулинам с измененным периодом полужизни.

Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных тяжелых и двух идентичных легких полипептидных цепей, удерживаемых вместе межцепочечными дисульфидными связями. Каждая отдельная легкая и тяжелая цепи складываются в области, содержащие приблизительно 110 аминокислот, что предполагает консервативную трехмерную конформацию. Легкая цепь содержит одну переменную область (называемую V_L) и одну константную область (C_L), тогда как тяжелая цепь содержит одну переменную область (V_H) и три константные области (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Пары областей связываются с образованием дискретных структур. В частности, переменные области легкой и тяжелой цепей, V_L и V_H , связываются с образованием области "FV", которая содержит антигенсвязывающий сайт.

Переменные области как тяжелой, так и легкой цепей демонстрируют значительную переменность структуры и аминокислотного состава в разных молекулах антител, тогда как константные области демонстрируют незначительную переменность. Каждое антитело распознает и связывает антиген посредством сайта связывания, определяемого связью переменных областей тяжелой и легкой цепей в области FV. Переменная область легкой цепи V_L и переменная область тяжелой цепи V_H конкретной молекулы антитела имеют специфичные аминокислотные последовательности, которые позволяют сайту связывания антигена принимать конформацию, которая связывается с антигенным эпитопом, распознаваемым данным конкретным антителом.

В пределах переменных областей расположены участки, в которых аминокислотная последовательность очень сильно различается у разных антител. В каждой тяжелой и легкой цепи находятся три этих так называемых "гиперпеременных" участков или "участков, определяющих комплементарность" (CDR). Три CDR из легкой цепи и три CDR из соответствующей тяжелой цепи образуют антигенсвязывающий сайт.

Аминокислотные последовательности многих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов определены, и выявлены две важные особенности молекул антител. Во-первых, каждая цепь состоит из ряда сходных, но не идентичных, последовательностей, каждая длиной приблизительно 110 аминокислот. Каждый из этих повторов соответствует дискретной, компактно сложенной области структуры белка, известной как домен белка. Легкая цепь состоит из двух таких доменов иммуноглобулина, тогда как тяжелая цепь антитела IgG содержит четыре домена.

Вторая важная особенность, выявленная путем сравнения аминокислотных последовательностей, состоит в том, что аминоконцевые последовательности как тяжелой, так и легкой цепей сильно различаются между различными антителами. Переменность последовательности ограничена приблизительно первыми 110 аминокислотами, соответствующими первому домену, тогда как остальные домены являются константными для цепей иммуноглобулина того же изотипа. Аминоконцевой переменной домен или V-домен тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L соответственно) вместе составляют V-область антитела и придают ему способность связываться с конкретным антигеном, тогда как константные домены (C-домены) тяжелых и легких цепей (C_H и C_L соответственно) составляют C-область. Множество C-доменов тяжелой цепи пронумерованы от аминоконцевого карбоксиконцу, например C_{H1} , C_{H2} и т.д.

Домены белка, описанные выше, связываются с образованием более крупных глобулярных доменов. Соответственно, полностью свернутая и собранная молекула антитела содержит три глобулярные части равного размера, соединенные гибким участком полипептидной цепи, известным как шарнирная область. Каждое плечо упомянутой Y-образной структуры образовано комплексом легкой цепи с аминоконцевой половиной тяжелой цепи, тогда как остов Y образован посредством спаривания карбокси-

концевых половин двух тяжелых цепей. Связь тяжелой и легкой цепей такова, что домены V_H и V_L спарены, так же как и домены C_H1 и C_L . Домены C_H3 спариваются друг с другом, однако домены C_H2 не взаимодействуют; боковые углеводные цепи, присоединенные к доменам C_H2 , лежат между двумя тяжелыми цепями. Два антигенсвязывающих сайта образованы спаренными доменами V_H и V_L на концах двух плеч Y.

Протеолитические ферменты (протеазы), которые расщепляют полипептидные последовательности, используются для анализа структуры молекул антител и для того чтобы определить, какие части молекулы ответственны за ее различные функции. Ограниченное расщепление протеазой папаином расщепляет молекулы антител на три фрагмента. Два фрагмента идентичны и обладают антигенсвязывающей активностью. Они называются фрагменты Fab, т.е. антигенсвязывающие фрагменты (Fragment antigen binding). Фрагменты Fab соответствуют двум идентичным плечам молекулы антитела, которые содержат полные легкие цепи, спаренные с доменами V_H и C_H1 тяжелых цепей. Другой фрагмент не обладает антигенсвязывающей активностью, но в первоначальных экспериментах было обнаружено, что он легко кристаллизуется и в связи с этим он был назван фрагментом Fc, т.е. кристаллизуемым фрагментом (Fragment crystallizable). Этот фрагмент соответствует спаренным доменам C_H2 и C_H3 и является частью молекулы антитела, которая взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками. Функциональные различия между изотипами тяжелой цепи обусловлены главным образом фрагментом Fc. Шарнирная область, которая соединяет части Fc и Fab молекулы антитела, фактически является гибким тросом, который обеспечивает независимое движение двух плеч Fab, а не жестким шарниром.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам опосредуемого антителами иммунитета против вирусных мишеней. В частности, настоящее изобретение относится к модифицированным иммуноглобулинам с антивирусной активностью.

Настоящее изобретение обеспечивает мутированные иммуноглобулины, содержащие одну или более мутаций, предпочтительно в области Fc или шарнирной области иммуноглобулина. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения мутация изменяет функцию иммуноглобулина желаемым способом. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено применение варианта иммуноглобулина, содержащего по меньшей мере одну мутацию в области Fc для модуляции связывания с FcRn, чтобы увеличить период полужизни антитела в условиях *in vivo*. Увеличенный период полужизни является предпочтительным для терапевтических антител.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин проявляет измененное связывание (например, повышенную или уменьшенную аффинность связывания) с FcRn по сравнению с иммуноглобулином, не содержащим мутацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин относится к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин содержит мутации в одном или более положениях, выбранных, например, из 311, 428, 434, 435 или 438, пронумерованных в соответствии с системой Kabat. В тексте настоящего описания приведена ссылка на систему нумерации, описанную в Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)). В упомянутых сборниках Kabat перечислены многие аминокислотные последовательности для антител для каждого подкласса и перечислены наиболее часто встречающиеся аминокислоты для каждого положения остатка в этом подклассе. Kabat использует метод присвоения номера остатка каждой аминокислоте в перечисленной последовательности, и этот способ присвоения номеров остатков стал обычным в данной области техники. В настоящем описании используется схема нумерации Kabat. Применительно к настоящему изобретению для присвоения номера остатка аминокислотной последовательности антитела-кандидата, которая не включена в сборник Kabat, следует выполнить следующие этапы. В целом последовательность-кандидат сопоставляют (выравнивают) с любой последовательностью иммуноглобулина или любой консенсусной последовательностью, перечисленной в Kabat et al. Сопоставление можно выполнять вручную или с помощью компьютера с использованием общепринятых компьютерных программ; примером такой программы является программа Align 2. Сопоставление может быть облегчено за счет использования некоторых остатков аминокислот, которые являются общими для большинства последовательностей Fab. Например, каждая из легкой и тяжелой цепей, как правило, содержит два цистеина, которые имеют одинаковые номера остатков; в домене V_L два цистеина, как правило, имеют номера остатков 23 и 88, и в домене V_H два остатка цистеина обычно имеют номера остатков 22 и 92. Остатки каркаса обычно, но не всегда, имеют примерно одинаковые номера остатков, однако CDR будут отличаться по размеру. Например, в случае CDR из последовательности-кандидата, которая длиннее, чем CDR в последовательности, описанной в Kabat et al., с которой ее сопоставляют, обычно к номеру остатка добавляют нижние индексы, чтобы указать на вставку дополнительных остатков. Для последовательностей-кандидатов, которые, например, сопоставляются с последовательностью, описанной в Kabat et al., для остатков 34 и 36, но не содержат остатка между ними, чтобы сопоставить его с остатком 35, номер 35 просто присваивается остатку.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, предложены варианты константной цепи (например, Fc). Иммуноглобулины, описанные в на-

стоящем документе, не ограничиваются конкретными последовательностями CDR или вариабельной области и могут быть получены или сконструированы для распознавания желаемого антигена или эпитопа. Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация выбрана, например, из:

IgG1-Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434W, IgG1-Q311R,
IgG1-N434W, IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E, IgG3(b)-Q311R/N434W/M438E/R435H,
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E, IgG1-Q311R/N434P/M428E,
IgG1-Q311R/N434W/M428D, IgG1-Q311R/N434W/M428E/H433K,
IgG1-L309K/Q311R/N434W/M428E, IgG1-L309R/Q311R/N434W/M428E,
IgG1-L309S/Q311R/N434W/M428E или IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E/R435H

(например, константная область иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательностей, которые по меньшей мере на 90% (например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичны SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16).

Согласно некоторым конкретным вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин содержит мутации Q311R, N434W и M428E.

Мутации, описанные выше, могут быть введены в любую подходящую молекулу иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин представляет собой моноклональное антитело и предпочтительно получен с помощью рекомбинантных методик.

Моноклональные антитела к антигенам-мишеням (например, поверхностному белку клеток, например, рецепторам) получают с помощью различных методик, включая обычные методологии получения моноклональных антител, такие как методики гибридизации соматических клеток, описанные Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительными являются процедуры гибридизации соматических клеток, в объем настоящего изобретения также включены другие методики получения моноклональных антител (например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов).

Предпочтительной системой на животных для получения гибридом является система на мышах.

Получение гибридом у мышей является общепринятой процедурой. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры для слияния (например, мышинные клетки миеломы) и процедуры слияния.

Моноклональные антитела человека (мАТ), направленные против белков человека, могут быть получены с использованием трансгенных мышей, несущих полную иммунную систему человека, но не систему мыши. Спленоциты от трансгенных мышей иммунизируют представляющим интерес антигеном и используют для получения гибридом, которые выделяют мАТ человека со специфичной аффинностью в отношении эпитопов из белка человека. (См., например, Wood et al., WO 91/00906, Kucherlapati et al., WO 91/10741; Lonberg et al., WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917 (каждый из документов полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), N. Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); L.L. Green et al., *Nature Genet.*, 7:13-21 (1994); S.L. Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1994); Bruggeman et al., *Immunol.*, 7:33-40 (1993); Tuailon et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90:3720-3724 (1993) и Bruggeman et al., *Eur. J. Immunol.*, 21:1323-1326 (1991)).

Моноклональные антитела также могут быть получены другими способами, известными специалистам в области технологии рекомбинантной ДНК. Был разработан альтернативный способ, называемый способом отображения комбинаторных библиотек антител, для идентификации и выделения фрагментов антител, имеющих конкретную антигенную специфичность, который может быть использован для получения моноклональных антител. (См., например, Sastry et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:5728 (1989); Huse et al., *Science*, 246:1275 (1989) и Orlandi et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:3833 (1989)). После иммунизации животного иммуногеном, как описано выше, клонируют репертуар антител полученного В-клеточного пула. Известны способы получения последовательности ДНК вариабельных областей разнообразной популяции молекул иммуноглобулинов с использованием смеси олигомерных праймеров и ПЦР. Например, смешанные олигонуклеотидные праймеры, соответствующие 5'-лидерным (сигнальный пептид) последовательностям и/или каркасной последовательности I (FR1), а также праймер для консервативной 3'-константной области могут быть использованы для ПЦР-амплификации вариабельных областей тяжелой и легкой цепей из ряда мышинных антител. (См., например, Larrick et al., *Biotechniques*, 11:152-156 (1991)). Аналогичная стратегия также может быть использована для амплификации вариабельных областей тяжелой и легкой цепей человека из антител человека (см., например, Larrick et al., *Methods: Companion to Methods in Enzymology*, 2:106-110 (1991)).

Химерные моноклональные антитела мыши-человека могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники. Например, ген, кодирующий константную область Fc молекулы моноклонального антитела мыши (или другого вида), расщепляют с помощью рестрикционных ферментов для удаления области, кодирующей Fc мыши, и заменяют ее эквивалентной частью гена, кодирующего константную область Fc человека (см., например, Robinson et al., PCT/US86/02269, заявка на Европейский патент 184187, заявка на Европейский патент 171496, заявка на

Европейский патент 173494, WO 86/01533, US 4816567, заявка на Европейский патент 125023 (каждый из документов полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), Better et al., Science, 240:1041-1043 (1988); Liu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84:3439-3443 (1987); Liu et al., J. Immunol., 139:3521-3526 (1987); Sun et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84:214-218 (1987); Nishimura et al., Canc. Res., 47:999-1005 (1987); Wood et al., Nature, 314:446-449 (1985) и Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst., 80:1553-1559 (1988)).

Химерное антитело может быть дополнительно гуманизировано путем замены последовательностей вариабельной области Fv, которые непосредственно не участвуют в связывании с антигеном, эквивалентными последовательностями из вариабельных областей Fv человека. Общие обзоры гуманизованных химерных антител представлены S.L. Morrison, Science, 229:1202-1207 (1985) и Oi et al., Bio. Techniques, 4:214 (1986). Упомянутые способы включают выделение, обработку и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть вариабельных областей Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой цепи или легкой цепи. Источники подходящей нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам в данной области техники и, например, могут быть получены из 7E3, гибридомы, вырабатывающей антитело к GPIIb/IIIa. Рекомбинантная ДНК, кодирующая химерное антитело или его фрагмент, затем может быть клонирована в соответствующий вектор экспрессии.

Подходящие гуманизованные антитела альтернативно могут быть получены путем замены CDR (например, US 5225539 (который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), Jones et al., Nature, 321:552-525 (1986); Verhoeyan et al., Science, 239:1534 (1988) и Beidler et al., J. Immunol., 141:4053 (1988)). Все из CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR из вида, отличного от человека, или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR из вида, отличного от человека. Необходимо заменить только то количество CDR, которое необходимо для связывания гуманизованного антитела с рецептором Fc.

Антитело может быть гуманизировано любым способом, который позволяет заменить по меньшей мере часть CDR из антитела человека CDR, полученным из антитела из вида, отличного от человека. CDR человека могут быть заменены CDR из вида, отличного от человека; используя сайт-направленный мутагенез олигонуклеотида.

В объем настоящего изобретения также включены химерные и гуманизованные антитела, в которых определенные аминокислоты были заменены, удалены или добавлены. В частности, предпочтительные гуманизованные антитела содержат замены аминокислот в каркасном участке, такие как те, которые улучшают связывание с антигеном. Например, в гуманизованном антителе, содержащем мышинные CDR, аминокислоты, расположенные в каркасном участке человека, могут быть заменены аминокислотами, расположенными в соответствующих положениях мышинового антитела. Известно, что в некоторых случаях такие замены улучшают связывание гуманизованных антител с антигеном.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой мышинное антитело или его фрагмент. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой бычье антитело или его фрагмент. Например, мышинное антитело может быть получено с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой. Антитела могут быть различных изоформ, включая, но не ограничиваясь ими, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgG4); IgM; IgA1; IgA2; IgAsec; IgD и IgE. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой изоформ IgG. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой изоформ IgM. Антитела могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или могут включать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv).

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин представляет собой рекомбинантное антитело (например, химерное или гуманизованное антитело), его субъединицу или антигенсвязывающий фрагмент (например, содержит вариабельную область или по меньшей мере участок, определяющий комплементарность (CDR)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин является одновалентным (например, содержит одну пару тяжелых и легких цепей или их антигенсвязывающих частей). Согласно другим вариантам реализации иммуноглобулин является двухвалентным (например, содержит две пары тяжелых и легких цепей или их антигенсвязывающих частей).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены вакцинные композиции, содержащие вариант иммуноглобулина или гибрид его Fc и иммуногена. Настоящее изобретение не ограничено конкретным составом вакцинной композиции. Фактически вакцинная композиция согласно настоящему изобретению может содержать один или более различных агентов в дополнение к гибриднему белку. Подходящие агенты или кофакторы включают, но не ограничиваются ими, адьюванты, поверхностно-активные вещества, добавки, буферы, солубилизаторы, хелаторы, масла, соли, терапевтические агенты, лекарственные препараты, биологически активные вещества, антибактериальные

средства и противомикробные агенты (например, антибиотики, противовирусные препараты и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вакцинная композиция, содержащая гибридный белок, содержит агент и/или кофактор, который повышает способность иммуногена индуцировать иммунный ответ (например, адъювант). Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения присутствие одного или более кофакторов или агентов уменьшает количество иммуногена, необходимого для индукции иммунного ответа (например, защитного иммунного ответа (например, защитной иммунизации)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствие одного или более кофакторов или агентов может быть использовано для сдвига иммунного ответа преимущественно в сторону клеточного (например, опосредуемого Т-клетками) или гуморального (например, опосредуемого антителами) иммунного ответа. Настоящее изобретение не ограничено типом кофактора или агента, используемого в терапевтическом агенте согласно настоящему изобретению.

Адъюванты описаны в общих чертах в *Vaccine Design the Subunit and Adjuvant Approach*, ed. by Powell and Newman, Plenum Press, New York, 1995. Настоящее изобретение не ограничено типом используемого адъюванта (например, для использования в композиции (например, фармацевтической композиции)). Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения подходящие адъюванты включают соль алюминия, такую как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения адъювант может представлять собой соль кальция, железа или цинка или может представлять собой нерастворимую суспензию ацилированного тирозина, или ацилированные сахара, катионно- или анионно-derivатизированные полисахариды, или полифосфазены.

В целом иммунный ответ на антиген вырабатывается в результате взаимодействия антигена с клетками иммунной системы. Иммунные ответы могут быть в общем разделены на две категории: гуморальные и опосредуемые клетками иммунные ответы (например, исторически характеризующиеся антителами и клеточными эффекторными механизмами защиты соответственно). Эти категории ответа были названы иммунными ответами типа Th1 (опосредуемый клетками ответ) и типа Th2 (гуморальный ответ).

Стимуляция иммунного ответа может быть результатом прямого или непрямого ответа клетки или компонента иммунной системы на вмешательство (например, воздействие иммуногена). Иммунные ответы могут быть измерены многими способами, включая активацию, пролиферацию или дифференцировку клеток иммунной системы (например, В-клеток, Т-клеток, дендритных клеток, АПК, макрофагов, НК-клеток, НКТ-клеток и т.д.); активацию и подавление экспрессии маркеров и цитокинов; стимуляцию титров IgA, IgM или IgG; спленоmegалию (включая повышенную клеточность селезенки); гиперплазию и смешанные клеточные инфильтраты в различных органах. Другие ответы, клетки и компоненты иммунной системы, которые могут быть оценены в отношении иммунной стимуляции, известны в данной области техники.

Несмотря на то, что понимание механизма не является необходимым для реализации настоящего изобретения и настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции и способы согласно настоящему изобретению индуцируют экспрессию и секрецию цитокинов (например, макрофагами, дендритными клетками и CD4⁺ Т-клетками). Модуляция экспрессии конкретного цитокина может происходить локально или системно. Известно, что профили цитокинов могут определять регуляторные и эффекторные функции Т-клеток в иммунных ответах. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения могут быть индуцированы цитокины типа Th1, и, следовательно, иммуностимулирующие композиции согласно настоящему изобретению могут стимулировать антигенспецифичный иммунный ответ типа Th1, включая цитотоксические Т-клетки (например, позволяя тем самым избежать нежелательных иммунных ответов типа Th2 (например, выработки цитокинов типа Th2 (например, ИЛ-13), вовлеченных в увеличение степени тяжести заболевания (например, индукция ИЛ-13 образования слизи))).

Цитокины играют определенную роль в направлении ответа Т-клеток. Хелперные (CD4⁺) Т-клетки управляют иммунным ответом млекопитающих посредством выработки растворимых факторов, которые действуют на другие клетки иммунной системы, включая В-клетки и другие Т-клетки. Большинство зрелых CD4⁺ Т-хелперных клеток экспрессируют один из двух профилей цитокинов: Th1 или Th2. CD4⁺ Т-клетки типа Th1 секретируют ИЛ-2, ИЛ-3, ИФН- γ , ГМ-КСФ и высокие уровни ФНО- α . Th2-клетки экспрессируют ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-13, ГМ-КСФ и низкие уровни ФНО- α . Цитокины типа Th1 стимулируют опосредуемый клетками иммунитет и гуморальный иммунитет, который характеризуется переключением класса иммуноглобулина на IgG2a у мышей и IgG1 у человека. Ответы Th1 также могут быть связаны с гиперчувствительностью замедленного типа и аутоиммунным заболеванием. Цитокины типа Th2 прежде всего индуцируют гуморальный иммунитет и индуцируют переключение класса на IgG1 и IgE. Изотипы антител, связанные с ответами Th1, обычно способны к нейтрализации и опсонизации, тогда как те, которые связаны с ответами Th2, больше связаны с аллергическими реакциями.

Было показано, что несколько факторов влияют на сдвиг иммунного ответа преимущественно в

сторону ответа типа Th1 или Th2. Наиболее хорошо охарактеризованными регуляторами являются цитокины. ИЛ-12 и ИФН- γ являются положительными регуляторами Th1 и отрицательными регуляторами Th2. ИЛ-12 стимулирует выработку ИФН- γ , и ИФН- γ обеспечивает положительную обратную связь для ИЛ-12. ИЛ-4 и ИЛ-10, по-видимому, являются важными для установления профиля Th2-цитокинов и снижения уровня выработки Th1-цитокинов.

Соответственно, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа типа Th1 у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей иммуноген. Однако согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ стимуляции у субъекта иммунного ответа типа Th2 (например, если необходимо сбалансированность ответ, опосредуемый Т-клетками), включающий введение субъекту композиции, содержащей иммуноген. Согласно дополнительным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения адъюванты могут применяться (например, могут быть введены совместно с композицией согласно настоящему изобретению), чтобы сдвинуть иммунный ответ преимущественно в сторону иммунного ответа типа Th1 или Th2. Например, адъюванты, которые индуцируют ответы типа Th2 или ослабляют ответы типа Th1, включают, но не ограничиваются ими, квасцы, сапонины и SB-As4. Адъюванты, которые индуцируют ответы типа Th1, включают, но не ограничиваются ими, MPL, MDP, ISCOMS, ИЛ-12, ИФН- γ и SB-AS2.

В композициях и способах согласно настоящему изобретению можно применять несколько других типов иммуногенов типа Th1 (например, в качестве адъюванта). К ним относятся, помимо прочего, перечисленные далее иммуногены. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяют монофосфориллипид А (например, в частности, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL)). 3D-MPL является известным адъювантом, производимым Ribi Immunochem, Монтана, США. Он часто поставляется в виде смеси химических соединений 3-де-О-ацилированного монофосфориллипида А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяют дифосфориллипид А и его 3-О-деацилированные варианты. Каждый из указанных иммуногенов может быть очищен и получен способами, описанными в GB 2122204В, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Были описаны другие очищенные и синтетические липополисахариды (см., например, патент США № 6005099 и EP 0729473, Hilgers et al., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, *Immunology*, 60(1):141-6 и EP 0549074, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3D-MPL применяют в форме дисперсного состава (например, состава, содержащего частицы с диаметром менее 0,2 мкм, описанного в EP 0689454, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в качестве иммуногена (например, адъюванта типа Th1) в композиции согласно настоящему изобретению применяют сапонины. Сапонины являются хорошо известными адъювантами (см., например, Lacaille-Dubois and Wagner (1996), *Phytomedicine*, vol. 2 p. 363-386). Примеры сапонинов включают Quil А (полученный из коры южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria Molina*) и его фракции (см., например, патент США № 5057540, *Kensil, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, 1996, 12(1-2):1-55 и EP 0362279, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Согласно настоящему изобретению также предусмотрено, что подходящими являются гемолитические сапонины QS7, QS17 и QS21 (фракции Quil А, очищенные с помощью ВЭЖХ; см., например, *Kensil et al.* (1991), *J. Immunology*, 146, 431-437, патент США № 5057540; WO 96/33739; WO 96/11711 и EP 0362279, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Согласно настоящему изобретению также предусмотрено, что подходящими являются комбинации QS21 и полисорбата или циклодекстрина (см., например, WO 99/10008, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в качестве адъюванта применяют иммуногенный олигонуклеотид, содержащий неметилированные динуклеотиды CpG ("CpG"). CpG является аббревиатурой для динуклеотидных мотивов цитозин-гуанозин, присутствующих в ДНК. CpG известен в данной области техники как адъювант при введении как системным путем, так и через слизистые оболочки (см., например, WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J. Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6 и патент США № 20050238660, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуностимулирующая последовательность представляет собой пурин-пурин-С-Г-пиримидин-пиримидин, где мотив CG не метилирован.

Несмотря на то, что понимание механизма не является необходимым для реализации настоящего изобретения и настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствие одного или более олигонуклеотидов CpG активирует различные подгруппы иммунных клеток, включая природные клетки-киллеры (которые вырабатывают ИФН- γ) и макрофаги. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения олигонуклеотиды CpG добавляют в состав композиции согласно настоящему изобретению.

бретению для индукции иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раствор свободной формы CpG вводят вместе с антигеном (например, присутствующим в растворе (см., например, WO 96/02555, который включен в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения олигонуклеотид CpG ковалентно конъюгирован с антигеном (см., например, WO 98/16247, который включен в настоящий документ посредством ссылки) или изготовлен с добавлением носителя, такого как гидроксид алюминия (см., например, Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения адьюванты, такие как полный адьювант Фрейнда и неполный адьювант Фрейнда, цитокины (например, интерлейкины (например, ИЛ-2, ИФН- γ , ИЛ-4 и т.д.), макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор некроза опухоли и т.д.), детоксицированные мутированные варианты бактериального ADP-рибозилирующего токсина, такого как холерный токсин (СТ), коклюшный токсин (РТ) или термолабильный токсин *E. coli* (LT), в частности LT-K63 (где аминокислота дикого типа в положении 63 заменена лизином), LT-R72 (где аминокислота дикого типа в положении 72 заменена аргинином), СТ-S109 (где аминокислота дикого типа в положении 109 заменена серином) и РТ-K9/G129 (где аминокислота дикого типа в положении 9 заменена лизином и аминокислота в положении 129 заменена глицином) (см., например, WO 93/13202 и WO 92/19265, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки), а также другие иммуногенные вещества (например, те, которые повышают эффективность композиции согласно настоящему изобретению) применяют с композицией, содержащей иммуноген согласно настоящему изобретению.

Дополнительные примеры адьювантов, которые можно применять в настоящем изобретении, включают поли-ди(карбоксилатфеноксифосфазен (полимер PCPP, Институт исследования вирусов, США), производные липополисахаридов, такие как монофосфориллипид А (MPL, Ribl ImmunoChem Research, Inc., Гамильтон, Монтана, США), мурамилдипептид (MDP, Ribl) и треонил-мурамилдипептид (t-MDP, Ribl), OM-174 (дисахарид глюкозамина, родственный липиду А, OM Pharma SA, Мейрин, Швейцария) и фактор удлинения *Leishmania* (очищенный белок *Leishmania*, Corixa Corporation, Сизтл, Вашингтон, США).

Адьюванты могут быть добавлены к композиции, содержащей иммуноген, или адьювант может быть приготовлен с носителями, например липосомами или солями металлов (например, солями алюминия (например, гидроксидом алюминия)), перед комбинированием или совместным введением с композицией.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция, содержащая иммуноген, содержит один адьювант. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит два или более адьюванта (см., например, WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241 и WO 94/00153, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция, содержащая иммуноген, содержит один или более мукоадгезивов (см., например, патент США № 20050281843, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Настоящее изобретение не ограничено типом используемого мукоадгезива. Фактически, согласно настоящему изобретению предусмотрено, что множество различных мукоадгезивов можно применять в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, сшитые производные полиакриловой кислоты (например, карбопол и поликарбофил), поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, полисахариды (например, альгинат и хитозан), гидроксипропилметилцеллюлозу, лектины, фимбриальные белки и карбоксиметилцеллюлозу. Несмотря на то, что понимание механизма не является необходимым для реализации настоящего изобретения и настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применение мукоадгезива (например, в композиции, содержащей иммуноген) усиливает индукцию иммунного ответа у субъекта (например, при введении композиции согласно настоящему изобретению) вследствие увеличения продолжительности и/или интенсивности воздействия иммуногена, которое испытывает субъект, при применении мукоадгезива по сравнению с продолжительностью и/или интенсивностью воздействия иммуногена без применения мукоадгезива.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулин и/или вакцинные композиции применяют в комбинации с соответствующими солями и буферами для доставки композиций субъекту. Буферы также применяют при введении композиции пациенту. Водные композиции содержат эффективное количество композиции, диспергированной в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Такие композиции также называются инокулятами.

Выражение "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным частицам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении в организм животного или человека. В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и замедляющие всасывание агенты и т.п. За исключением тех случаев, когда любые обычные среды или агент несовместимы с векто-

рами или клетками согласно настоящему изобретению, в объем настоящего изобретения включено их применение в терапевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активные композиции включают классические фармацевтические препараты. Введение упомянутых композиций в соответствии с настоящим изобретением осуществляют с помощью любого обычного пути введения при условии, что ткань-мишень доступна для этого пути. Подходящие пути введения включают пероральный, назальный, буккальный, ректальный, вагинальный или местный пути. В другом варианте введение можно осуществлять путем ортотопической, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутривенной или внутривенной инъекции.

Композиции также могут быть введены парентерально или внутривенно. Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей получают в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения такие препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, пригодные для введения путем инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях предпочтительным может быть включение изотонических агентов, например сахаров или хлорида натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть обеспечено путем применения в композициях агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения активных соединений в требуемом количестве в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией путем фильтрации. Обычно дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и сушки вымораживанием, которые позволяют получить порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его раствора, стерилизованного ранее путем фильтрации.

После приготовления композиции вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы могут быть легко введены в виде множества лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного препарата и т.п. Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор соответствующим образом буферизуют, если необходимо, и жидкий разбавитель сначала делают изотоничным с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Упомянутые конкретные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривенного введения. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена в 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса или впрыснута в предлагаемый сайт инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15th Edition, pages 1035-1038 и 1570-1580). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активные частицы или агенты приготовлены в виде терапевтической смеси, содержащей от приблизительно 0,0001 до 1,0 мг, или от приблизительно 0,001 до 0,1 мг, или от приблизительно 0,1 до 1,0 мг, или даже приблизительно 10 мг на дозу или примерно столько. Может быть введено несколько доз.

Дополнительные составы, которые пригодны для других способов введения, включают вагинальные суппозитории и пессарии. Также может применяться ректальный пессарий или суппозиторий. Суппозитории представляют собой твердые лекарственные формы различной массы и формы, обычно медикаментозные, для введения в прямую кишку, влагалище или уретру. После вставки суппозитории размягчаются, расплавляются или растворяются в жидкостях полости. В целом в случае суппозитория обычные связывающие агенты и носители могут включать, например, полиалкиленгликоли или триглицериды; подходящие суппозитории могут быть изготовлены из смесей, содержащих активный ингредиент, количество которого находится в пределах от 0,5 до 10%, предпочтительно 1-2%. Вагинальные суппозитории или пессарии обычно имеют шаровидную или яйцевидную форму и массу приблизительно 5 г каждый. Вагинальные лекарственные препараты доступны в различных физических формах, например

крема, гелях или жидкостях, которые отступают от классической концепции суппозиториев.

"Лечение" применительно к настоящему изобретению обозначает облегчение, полностью или частично, симптомов, связанных с расстройством или заболеванием, или замедление, ингибирование или остановку дальнейшего прогрессирования или ухудшения этих симптомов или предотвращение или профилактику заболевания или расстройства у субъекта, подверженного риску развития заболевания или расстройства. Следовательно, например, лечение вирусной инфекции может включать ингибирование или предотвращение репликации вируса у субъекта или уменьшение симптомов вирусной инфекции у субъекта.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" соединения согласно настоящему изобретению относится к количеству соединения, которое облегчает, полностью или частично, симптомы, связанные с расстройством или заболеванием, или замедляет, ингибирует или останавливает дальнейшее прогрессирование или ухудшение этих симптомов или предотвращает или обеспечивает профилактику заболевания или расстройства у субъекта, подверженного риску развития заболевания или расстройства.

Субъектом является любое животное, которое может получить пользу от введения соединения, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой млекопитающее, например человека, примата, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, грызуна, такого как, например, крыса или мышь. Как правило, субъект является человеком.

Терапевтически эффективное количество соединения, описанного в настоящем документе, используемого в настоящем изобретении, может варьироваться в зависимости от пути введения и лекарственной формы. Эффективные количества соединений согласно настоящему изобретению обычно находятся в диапазоне от приблизительно 0,001 до 100 мг/кг/сутки и более типично в диапазоне от приблизительно 0,05 до 10 мг/кг/сутки. Как правило, соединение или соединения, используемые в настоящем изобретении, выбраны для получения состава, который имеет высокий терапевтический индекс. Терапевтический индекс представляет собой соотношение доз, которые вызывают токсическое и терапевтическое действие, который может быть выражен как соотношение ЛД₅₀ и ЭД₅₀. ЛД₅₀ представляет собой дозу, летальную для 50% популяции, и ЭД₅₀ представляет собой терапевтически эффективную дозу для 50% популяции. ЛД₅₀ и ЭД₅₀ определяют с помощью обычных фармацевтических процедур в культурах клеток животных или у экспериментальных животных.

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции и лекарственные средства, которые могут быть получены путем комбинирования одного или более соединений, описанных в настоящем документе, их фармацевтически приемлемых солей, их стереоизомеров, их таутомеров или их сольватов, с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами, связывающими агентами, разбавителями или т.п. для ингибирования или лечения разновидностей первичного и/или метастатического рака предстательной железы. Указанные композиции могут быть изготовлены в форме, например, гранул, порошков, таблеток, капсул, сиропа, суппозиториев, инъекций, эмульсий, эликсиров, суспензий или растворов. Растворимые композиции могут быть приготовлены для различных путей введения, например перорального, парентерального, местного, ректального, назального пути введения, или для введения посредством имплантированного резервуара. Парентеральное или системное введение включает, но не ограничивается ими, подкожные, внутривенные, внутривенные и внутримышечные инъекции. Следующие лекарственные формы приведены в качестве примера и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

В случае перорального, буккального и подъязычного введения порошки, суспензии, гранулы, таблетки, пилюли, капсулы, гелевые капсулы и капсулы являются приемлемыми в виде твердых лекарственных форм. Они могут быть получены, например, путем смешивания одного или более соединений согласно настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемых солей или таутомеров по меньшей мере с одной добавкой, такой как крахмал или другая добавка. Подходящие добавки включают сахарозу, лактозу, сахар целлюлозы, маннит, мальтит, декстран, крахмал, агар, альгинаты, хитины, хитозаны, пектины, трагакантовую камедь, гуммиарабик, желатины, коллагены, казеин, альбумин, синтетические или полусинтетические полимеры или глицериды. Необязательно пероральные лекарственные формы могут содержать другие ингредиенты, чтобы облегчить введение, такие как неактивный разбавитель или смазывающие вещества, такие как стеарат магния, или консерванты, такие как парабен или сорбиновая кислота, или антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, токоферол или цистеин, дезинтегрирующий агент, связывающие агенты, загустители, буферы, подсластители, вкусовые агенты или ароматизаторы. Таблетки и пилюли могут быть дополнительно обработаны подходящими материалами для покрытия, известными в данной области техники.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут быть в форме фармацевтически приемлемых эмульсий, сиропов, эликсиров, суспензий и растворов, которые могут содержать неактивный разбавитель, такой как вода. Фармацевтически приемлемые составы и лекарственные средства могут быть получены в виде жидких суспензий или растворов с применением стерильной жидкости, такой как, но не ограничиваясь ими, масло, вода, спирт и их комбинации. Фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты могут быть добавлены, если необ-

ходимо пероральное или парентеральное введение.

Как отмечено выше, суспензии могут включать масла. Подходящие масла включают, но не ограничиваются ими, арахисовое масло, кунжутное масло, хлопковое масло, кукурузное масло и оливковое масло. Суспензионные препараты также могут содержать сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, изопропилмирикат, глицериды жирных кислот и глицериды ацетилованных жирных кислот. Суспензионные составы могут содержать спирты, такие как, но не ограничиваясь ими, этанол, изопропиловый спирт, гексадециловый спирт, глицерин и пропиленгликоль. В суспензионных составах также могут применяться простые эфиры, такие как, но не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоль, нефтяные углеводороды, такие как минеральное масло и вазелин; и вода.

Лекарственные формы для инъекций обычно включают водные суспензии или масляные суспензии, которые могут быть получены с использованием подходящего диспергирующего агента или смачивающего агента и суспендирующего агента. Формы для инъекций могут присутствовать в жидкой фазе или в виде суспензии, которую готовят с использованием растворителя или разбавителя. Приемлемые растворители или носители включают стерилизованную воду, раствор Рингера или изотонический водный физиологический раствор. В другом варианте в качестве растворителей или суспендирующих агентов могут применяться стерильные масла. Как правило, масло или жирная кислота являются нелетучими, включая натуральные или синтетические масла, жирные кислоты, моно-, ди- или триглицериды.

В случае введения путем инъекции фармацевтический состав и/или лекарственное средство может представлять собой порошок, подходящий для восстановления с использованием соответствующего раствора, как описано выше. Примеры подходящих порошков включают, но не ограничиваются ими, лиофилизованные порошки, высушенные с помощью ротационного испарителя порошки или высушенные распылением порошки, аморфные порошки, гранулы, осадки или частицы. В случае введения путем инъекции составы необязательно могут содержать стабилизаторы, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и их комбинации.

Для ректального введения фармацевтические составы и лекарственные средства могут быть в форме суппозитория, мази, клизмы, таблетки или крема для высвобождения соединения в кишечнике, сигмовидном изгибе ободочной кишки и/или прямой кишке. Ректальные суппозитории готовят путем смешивания одного или более соединений согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемых солей или таутомеров соединения с приемлемыми носителями, например маслом какао или полиэтиленгликолем, который присутствует в твердой фазе при нормальных температурах хранения и присутствует в жидкой фазе при температурах, которые пригодны для высвобождения лекарственного препарата внутри организма, например в прямой кишке. Для получения составов мягкого желатинового типа и суппозитория также можно применять масла. Воду, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и растворы родственных сахаров и глицерины можно применять для получения суспензионных составов, которые также могут содержать суспендирующие агенты, такие как пектины, карбомеры, метилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу или карбоксиметилцеллюлозу, а также буферы и консерванты.

Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить в легкие путем ингаляции через нос или рот. Подходящие фармацевтические составы для ингаляционного введения включают растворы, спреи, сухие порошки или аэрозоли, содержащие любые подходящие растворители и необязательно другие соединения, такие как, но не ограничиваясь ими, стабилизаторы, антимикробные агенты, антиоксиданты, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и их комбинации. Составы для ингаляционного введения содержат в качестве вспомогательных веществ, например, лактозу, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, гликохолат и дезоксихолат. Водные и неводные аэрозоли, как правило, применяют для доставки соединений согласно настоящему изобретению путем ингаляции.

Обычно водный аэрозоль получают путем приготовления водного раствора или суспензии соединения с обычными фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы могут быть различными в зависимости от требований конкретного соединения, но обычно включают неионные поверхностно-активные вещества (твины, плуроновые кислоты или полиэтиленгликоль), нетоксичные белки, такие как сывороточный альбумин, сложные эфиры сорбита, олеиновую кислоту, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахарные спирты. Аэрозоли обычно получают из изотонических растворов. Для доставки соединений согласно настоящему изобретению также можно применять неводную суспензию (например, во фторуглеродном пропелленте).

Аэрозоли, содержащие соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, могут быть удобно доставлены при помощи ингалятора, распылителя, герметичной упаковки или аэрозольного распылителя и подходящего пропеллента, например, включая, но не ограничиваясь ими, находящийся под давлением дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, азот, воздух или диоксид углерода. В случае аэрозоля под давлением дозированную лекарственную форму можно контролировать с помощью клапана для доставки дозированного количества. Капсулы и картриджи, например, изготовленные из желатина для применения в ингаляторе или инсуффляторе, могут быть приготовлены с использованием порошковой смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Доставка аэрозолей согласно настоящему изобретению при помощи ультразвуковых аэрозольных распылителей является предпочтительной, поскольку аэрозольные распылители уменьшают до минимума воздействие усилия сдвига на агент, которое может привести к разложению соединения.

В случае назального введения фармацевтические составы и лекарственные средства могут представлять собой спрей, капли для носа или аэрозоль, содержащий подходящий растворитель (растворители) и необязательно другие соединения, такие как, но не ограничиваясь ими, стабилизаторы, антимикробные агенты, антиоксиданты, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и их комбинации. Для введения в виде капель для носа соединения могут быть приготовлены в масляных растворах или в виде геля. Для введения назального аэрозоля может применяться любой подходящий пропеллент, включая сжатый воздух, азот, диоксид углерода или низкокипящий растворитель на углеводородной основе.

Лекарственные формы для местного (включая буккальное и подъязычное) или чрескожного введения соединений согласно настоящему изобретению включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы и патчи. Активный компонент может быть смешан в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом и с любыми консервантами или буферами, которые могут потребоваться. Порошки и спреи могут быть приготовлены, например, с помощью вспомогательных веществ, таких как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида или смеси этих веществ. Мази, пасты, кремы и гели также могут содержать вспомогательные вещества, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси.

Трансдермальные пластыри обладают дополнительным преимуществом в обеспечении контролируемой доставки соединения согласно настоящему изобретению в организм. Подходящие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования агента в соответствующей среде. Усилители всасывания также могут быть использованы для увеличения потока соединения согласно настоящему изобретению через кожу. Скорость такого потока можно контролировать с помощью мембраны, контролирующей скорость, или путем диспергирования соединения в полимерном матриксе или геле.

Помимо указанных примеров лекарственных форм, описанных выше, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и носители обычно известны специалистам в данной области техники и, следовательно, включены в объем настоящего изобретения. Подходящие вспомогательные вещества и носители описаны, например, в руководстве "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), которое включено в настоящий документ посредством ссылки.

Составы согласно настоящему изобретению могут быть разработаны так, чтобы обеспечивать кратковременное действие, быстрое высвобождение, длительное действие и замедленное высвобождение, как описано ниже. Следовательно, фармацевтические составы также могут быть приготовлены для контролируемого высвобождения или для медленного высвобождения.

Композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать, например, мицеллы или липосомы или какую-либо иную капсулированную форму или могут быть введены в форме с замедленным высвобождением, чтобы обеспечить длительное хранение и/или доставку. Следовательно, фармацевтические составы и лекарственные средства могут быть спрессованы в гранулы или цилиндры и имплантированы внутримышечно или подкожно в качестве депо-инъекций или в качестве имплантатов, таких как стенты. В подходящих имплантатах могут применяться известные инертные материалы, такие как силиконы и биоразлагаемые полимеры.

Конкретные дозы можно корректировать в зависимости от условий заболевания, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона субъекта, интервалов между введением доз, путей введения, скорости выделения и комбинаций лекарственных препаратов. Любая из вышеуказанных лекарственных форм, содержащих эффективные количества, находится в пределах обычных экспериментов и, следовательно, находится в пределах объема настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы и композиции для лечения и предотвращения любого количества расстройств.

Терапевтические антитела можно применять в лечении, например, рака, аутоиммунного заболевания, инфекции (например, вирусной инфекции) и т.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуноглобулины, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом (например, противораковым агентом, иммунодепрессантом или противовирусным агентом). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение с применением иммуноглобулина, описанного в настоящем документе, предшествует или следует после лечения с использованием другого агента с интервалами, варьирующимся от минут до недель. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых другой агент и иммуноглобулин вводят по отдельности в клетку, обычно необходимо убедиться в том, что интервал времени между каждой доставкой не является значительным, так что несколько способов лечения смогут оказать благоприятное комбинированное действие на клетку. В таких случаях предпола-

гается, что клетки вступают в контакт с обоими способами воздействия в течение приблизительно 12-24 ч между ними и более предпочтительно в течение приблизительно 6-12 ч между ними, причем наиболее предпочтительное время задержки составляет всего приблизительно 12 ч. В некоторых ситуациях желательным может быть значительное увеличение периода времени для лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (от 2 до 7) до нескольких недель (от 1 до 8).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяют более одного введения иммунотерапевтической композиции согласно настоящему изобретению или другого агента. Могут применяться различные комбинации, где иммуноглобулин представляет собой "А" и другой агент представляет собой "В", как показано ниже: А/В/А, В/А/В, В/В/А, А/А/В, В/А/А, А/В/В, В/В/В/А, В/В/А/В, А/А/В/В, А/В/А/В, А/В/В/А, В/В/А/А, В/А/В/А, В/А/А/В, В/В/В/А, А/А/А/В, В/А/А/А, А/В/А/А, А/А/В/А, А/В/В/В, В/А/В/В, В/В/А/В.

В объем настоящего изобретения включены другие комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одно или более соединений согласно настоящему изобретению и дополнительный активный агент вводят субъекту, чаще человеку, в последовательности и в течение интервала времени, которые позволяют соединению действовать совместно с другим агентом, чтобы обеспечить большую пользу по сравнению с пользой, полученной при их введении иным способом. Например, дополнительные активные агенты могут быть совместно введены путем совместного приготовления, введены одновременно или введены последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если указанные агенты не вводят одновременно, их следует вводить достаточно быстро один за другим так, чтобы обеспечить желаемое терапевтическое или профилактическое действие. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения соединение и дополнительные активные агенты действуют в промежутки времени, которые перекрываются. Каждый дополнительный активный агент можно вводить по отдельности, в любой подходящей форме и с помощью любого подходящего пути. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения соединения вводят до, одновременно или после введения дополнительных активных агентов.

В различных примерах соединения и дополнительные активные агенты вводят с интервалом менее чем приблизительно 1 ч, с интервалом приблизительно 1 ч, с интервалом от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, с интервалом от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, с интервалом от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, с интервалом от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, с интервалом от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, с интервалом от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, с интервалом от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, с интервалом от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, с интервалом от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, с интервалом от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, с интервалом от приблизительно 11 до приблизительно 12 ч, с интервалом не более 24 или не более 48 ч. В других примерах соединения и дополнительные активные агенты вводят одновременно. В других примерах соединения и дополнительные активные агенты вводят одновременно путем совместного приготовления.

В других примерах соединения и дополнительные активные агенты вводят с интервалом от приблизительно 2 до 4 дней, с интервалом от приблизительно 4 до 6 дней, с интервалом приблизительно 1 неделя, с интервалом от приблизительно 1 до 2 недель или с интервалом более 2 недель.

В некоторых примерах соединения согласно настоящему изобретению и необязательно дополнительные активные агенты циклически вводят субъекту. Циклическая терапия включает введение первого агента в течение определенного периода времени с последующим введением второго агента и/или третьего агента в течение определенного периода времени и повторение указанного последовательного введения. Циклическая терапия может обеспечить множество преимуществ, например уменьшить развитие резистентности к одному или более способам лечения, избежать или уменьшить побочные эффекты одного или более способов лечения и/или повысить эффективность лечения.

В других примерах одно или более соединений согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения и необязательно дополнительный активный агент вводят с применением цикла, продолжительностью менее приблизительно 3 недель, приблизительно один раз каждые две недели, приблизительно один раз каждые 10 дней или приблизительно один раз в неделю. Один цикл может включать введение соединения согласно настоящему изобретению и необязательно второго активного агента путем инфузии в течение приблизительно 90 мин каждого цикла, приблизительно 1 ч каждого цикла, приблизительно 45 мин каждого цикла, приблизительно 30 мин каждого цикла или приблизительно 15 мин каждого цикла. Каждый цикл может включать как минимум 1 неделю перерыва во введении, по меньшей мере 2 недели перерыва во введении, по меньшей мере 3 недели перерыва во введении. Количество введенных циклов составляет от приблизительно 1 до приблизительно 12 циклов, более типично от приблизительно 2 до приблизительно 10 циклов и более типично от приблизительно 2 до приблизительно 8 циклов.

Курсы лечения можно вводить субъекту одновременно, т.е. индивидуальные дозы дополнительных активных агентов вводят по отдельности, но в течение такого интервала времени, что соединение согласно настоящему изобретению может оказывать свое действие совместно с дополнительными активными агентами. Например, один компонент можно вводить один раз в неделю в комбинации с другими

компонентами, которые можно вводить один раз каждые две недели или один раз каждые три недели. Другими словами, схемы дозирования осуществляют одновременно, даже если терапевтические средства не вводят одновременно или в один и тот же день.

Дополнительные активные агенты могут действовать аддитивно или, более типично, синергически с соединением (соединениями) согласно настоящему изобретению. В одном примере одно или более соединений согласно настоящему изобретению вводят одновременно с одним или более дополнительными активными агентами в одной и той же фармацевтической композиции. В другом примере одно или более соединений согласно настоящему изобретению вводят одновременно с одним или более дополнительными активными агентами в отдельных фармацевтических композициях. В другом примере одно или более соединений согласно настоящему изобретению вводят до или после введения второго активного агента. В объем настоящего изобретения включено введение соединения согласно настоящему изобретению и второго активного агента с применением одного и того же или разных путей введения, например, перорального и парентерального пути введения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, если соединение согласно настоящему изобретению вводят одновременно со вторым активным агентом, который потенциально вызывает побочные эффекты, включая, но не ограничиваясь этим, токсичность, второй активный агент может быть предпочтительно введен в дозе, которая ниже пороговой дозы, вызывающей нежелательный побочный эффект.

Практически любой антиген может быть мишенью вариантов IgG, включая, но не ограничиваясь ими, белки, субъединицы, домены, мотивы и/или эпитопы, принадлежащие к следующему перечню антигенов-мишеней, который включает растворимые факторы, такие как цитокины, и связанные с мембраной факторы, включая трансмембранные рецепторы: 17-1A, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозина A1, A33, ACE, ACE-2, активин, активин A, активин AB, активин B, активин C, активин R1A, активин R1A ALK-2, активин R1B ALK-4, активин R1A, активин R1B, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адрессины, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, α -1-антитрипсин, антагонист α -V/ β -1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический фактор, интегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, стимулятор В-лимфоцитов (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, BMP-3 остеогенин, BMP-4, BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-1A (ALK-3), BMPR-1B (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-2 (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, бомбезин, костный нейротрофический фактор, BPDE, BPDE-DNA, BTC, фактор комплемента 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонин, цАМФ, карциноэмбриональный антиген (CEA), связанный с карциномой антиген, катепсин А, катепсин В, катепсин С/DPPI, катепсин D, катепсин Е, катепсин Н, катепсин L, катепсин О, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCI, 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, 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 (белки р67), 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, цГМФ, CINC, токсин Clostridium botulinum, токсин Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, STACK, CTGF, CTLA-4, 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, антиген цитокератина, связанный с опухолью, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, DAF-фактор, des(1-3)-IGF-I (ИФР-1 головного мозга), Dhh, дигоксин, DNAM-1, ДНКазу, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, рецептор эндотелина, энкефалиназу, eNOS, Eot, эотаксин 1, EpCAM, эфрин B2/EphB4, EPO, ERCC, E-селектин, ET-1, фактор IIa, фактор VII, фактор VIIIc, фактор IX, белок активации фибробластов (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолликулостимулирующий гормон, фракталкин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, 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, GFAP, GFRA-1, GFR-альфа1, GFR- α 2, GFR- α 3, GITR, глюкагон, ГЛЮТ-4, гликопротеин IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), ГМ-КСФ, gp130, gp72, GRO, фактор высвобождения гормона роста, гаптен (NP-сар или NIP-сар), HB-EGF, HCC, гликопротеин оболочки HCMV gB, гликопротеин оболочки HCMV gH, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Her В gp120, гепараназу, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин вируса простого герпеса (HSV) gB, гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA), HIV gp120, V3-петлю gp 120 HIV IIIB, 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, ИФН- γ , Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, IGF-связывающие белки, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, ИЛ, ИЛ-1, ИЛ-1R, ИЛ-2, ИЛ-2R, ИЛ-4, ИЛ-4R, ИЛ-5, ИЛ-5R, ИЛ-6, ИЛ-6R, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-18R, ИЛ-23, интерферон (ИФН)- α , ИФН- β , ИФН- γ , ингибин, iNOS, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин $\alpha 2$, интегрин $\alpha 3$, интегрин $\alpha 4$, интегрин $\alpha 4/\beta 7$, интегрин $\alpha 5$ (αV), интегрин $\alpha 5/\beta 1$, интегрин $\alpha 5/\beta 3$, интегрин $\alpha 6$, интегрин $\beta 1$, интегрин $\beta 2$, интерферон- γ , 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 Льюис Y, антиген, родственный антигену Льюису, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопротеины, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, сурфактант легких, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина- β , Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCK-2, MCP, M-KCФ, MDC, Mer, металлопротеазы, рецептор MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1- α , МК, ММАС1, 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, MPlF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, ингибирующее вещество Мюллера, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-кадгерин, NCA 90, NCAM, неприлизин, нейротрофин-3, -4 или -6, нейрогулин, фактор роста нейронов (NGF), NGFR, NGF- β , nNOS, NO, NOS, Npr, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, паратиреоидный гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, плацентарную щелочную фосфатазу (PLAP), PIGF, PLP, PP14, проинсулин, прорелаксин, белок С, PS, PSA, PSCA, специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA), PTEN, PTHrр, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, А-цепь релаксина, В-цепь релаксина, ренин, респираторно-синцитиальный вирус (RSV) F, RSV Fgp, Ret, ревматоидные факторы, 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, TAC1, TAG-72 (связанный с опухолью гликопротеин-72), TARC, TCA-3, Т-клеточные рецепторы (например, рецептор Т-клеток α/β), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, тестикулярную PLAP-подобную щелочную фосфатазу, Tfr, TGF, TGF- α , TGF- β , полиспецифичное антитело к TGF- β , TGF- β R1 (ALK-5), TGF- β RII, TGF- β RIII, TGF- β RIIIb, TGF- β RIII, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5, тромбин, Ск-1 тимуса, тиреотропный гормон, Tie, TIMP, TIQ, тканевой фактор, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, ФНО- α , ФНО- α - β , TNF- β 2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R3Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK RFN14), TNFRSF13B (TAC1), 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 R1CD120a, 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 (DcR3M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2-лиганд, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK лиганд ODF, OPG-лиганд), TNFSF12 (TWEAK Apo-3-лиганд, DR3-лиганд), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (лиганд LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (лиганд GITR, лиганд AITR, TL6), TNFSF1A (TNF- α коннектин, DIF, TNFSF2), TNFF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40-лиганд gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40-лиганд CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (лиганд Fas, лиганд Apo-1, лиганд APT1), TNFSF7 (CD27-лиганд CD70), TNFSF8 (CD30-лиганд CD153), TNFSF9 (лиганд 4-1BB, лиганд CD137), TP-1, t-PA, Тро, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, связанный с опухолью антиген CA 125, связанный с опухолью антиген, экспрессирующий углевод, родственный Льюис Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназу, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VE-кадгерин-2, VEGFR-1 (fit-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (fit-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, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD и рецепторы для гормонов и факторов роста.

Специалист в данной области техники поймет, что вышеупомянутый перечень мишеней относится не только к конкретным белкам и биомолекулам, но к биохимическому пути или путям, элементами которых они являются. Например, ссылка на CTLA-4 в качестве антигена-мишени подразумевает, что лиганды и рецепторы, которые принимают участие в пути костимуляции Т-клеток, включая CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28 и любые другие неоткрытые лиганды или рецепторы, которые связываются с указанными

белками, также являются мишенями. Следовательно, в настоящем документе мишень относится не только к конкретной биомолекуле, но и к набору белков, которые взаимодействуют с указанной мишенью, и к элементам биохимического пути, к которому относится указанная мишень. Специалист в данной области техники также поймет, что любой из вышеупомянутых целевых антигенов, лигандов или рецепторов, которые связываются с ними, или других элементов соответствующего им биохимического пути может быть функционально связан с вариантами Fc согласно настоящему изобретению для получения гибридного белка Fc. Так, например, гибридный Fc, который нацелен к EGFR, может быть сконструирован путем функционального соединения варианта Fc с EGF, TGF- β или любым другим лигандом, открытым или неоткрытым, который связывается с EGFR. Соответственно, вариант Fc согласно настоящему изобретению может быть функционально соединен с EGFR, чтобы получить гибридный Fc, который связывается с EGF, TGF- β или любым другим лигандом, открытым или неоткрытым, который связывается с EGFR. Соответственно, практически любой полипептид, независимо от того, является ли он лигандом, рецептором или каким-либо другим белком или белковым доменом, включая, но не ограничиваясь указанными выше мишенями, и белки, которые являются составными элементами соответствующих им биохимических путей, могут быть функционально соединены с вариантами Fc согласно настоящему изобретению для разработки гибрида Fc.

Выбор подходящего антигена зависит от желаемого применения. Для лечения рака желательно иметь мишень, экспрессия которой ограничена раковыми клетками. Некоторые мишени, которые особенно подходят для лечения антителами, включают мишени, обладающие сигнальными функциями. Другие терапевтические антитела оказывают свое действие, блокируя передачу сигналов посредством рецептора, ингибируя связывание рецептора и его когнатного лиганда. Другим механизмом действия терапевтических антител является подавление активности рецепторов. Другие антитела действуют путем, отличным от передачи сигнала посредством антигена-мишени. В некоторых случаях используют антитела, направленные против инфекционных агентов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения варианты Fc согласно настоящему изобретению встроены в антитело к цитокину. В другом варианте варианты Fc гибридизованы или конъюгированы с цитокином. В настоящем документе под термином "цитокин" понимают общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Например, как описано в работе Penichet et al., 2001, J. Immunol. Methods, 248:91-101, которая явным образом включена в настоящий документ посредством ссылки, цитокины могут быть гибридизованы с антителом, чтобы обеспечить набор желаемых свойств. Примеры подходящих цитокинов включают лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метионильный гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; про-релаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли- α и - β ; ингибирующее вещество Мюллера; связанный с гонадотропином пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТРО); факторы роста нервов, такие как NGF- β ; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β ; инсулиноподобные факторы роста I и II; эритропоэтин (ЕРО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ) и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12; ИЛ-15, фактор некроза опухоли, такой как ФНО- α или ФНО- β ; C5a; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). В настоящем документе термин "цитокин" включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

Цитокины и растворимые мишени, такие как члены суперсемейства ФНО, являются предпочтительными мишенями для использования в вариантах настоящего изобретения. Например, антитела, нацеленные к VEGF, CTLA-4 и ФНО, или их фрагменты являются особенно подходящими антителами для применения вариантов Fc, которые увеличивают связывание с FcRn. Терапевтические средства, направленные против этих мишеней, часто используются в лечении аутоиммунных заболеваний и требуют многократных инъекций в течение длительного периода времени. Соответственно, особенно предпочтительными являются более длительные периоды полужизни из сыворотки крови и менее частые обработки, обеспеченные вариантами настоящего изобретения.

Ряд антител и гибридов Fc, которые одобрены для применения, изучаются в клинических исследованиях или разрабатываются, могут получить преимущества от применения вариантов Fc согласно настоящему изобретению. В настоящем документе такие антитела и гибриды Fc называются "клиническими продуктами и кандидатами". Соответственно, в предпочтительном варианте реализации полипептиды Fc согласно настоящему изобретению можно применять в ряде клинических продуктов и кандидатов.

Например, ряд антител, мишенью которых является CD20, могут получить преимущества от применения полипептидов Fc согласно настоящему изобретению. Например, полипептиды Fc согласно настоящему изобретению можно применять в антителе, которое по существу аналогично ритуксимабу (ритуксан (Rituxan®), IDEC/Genentech/Roche) (см., например, патент США № 5736137), химерному антителу к CD20, одобренному для лечения неходжкинской лимфомы; в HuMax-CD20, антителе к CD20, которое разработано Genmab, в антителе к CD20, описанном в патенте США № 5500362, в AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) и PRO70769 (PCT/US2003/040426, озаглавленный "Варианты иммуноглобулинов и их применение").

Ряд антител, мишенью которых являются члены семейства рецепторов эпидермального фактора роста, включая EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), могут получить преимущества от применения полипептидов Fc согласно настоящему изобретению. Например, полипептиды Fc согласно настоящему изобретению можно применять в антителе, которое по существу сходно с трастузумабом (герцептин (Herceptin®), Genentech) (см., например, патент США № 5677171), гуманизированным антителом к Her2/neu, одобренным для лечения рака молочной железы; пертузумабе (rhuMab-2C4, омнитарг (Omnitarg™)), который разработан Genentech; антителе к Her2, описанном в патенте США № 4753894; цетуксимабе (эрбитукс (Erbix®), Imclone) (патент США № 4943533, PCT WO 96/40210), химерном антителе к EGFR, которое изучали в клинических исследованиях для лечения различных видов рака; ABX-EGF (патент США № 6235883), которое разработано Abgenix-ImmuneX-Amgen; HuMax-EGFr (US 10/172317), которое разработано Genmab; 425, EMD55900, EMD62000 и EMD72000 (Merck KGaA) (патент США № 5558864, Murthy et al., 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J. Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Институт исследований рака) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br. J. Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al., 1996, Br. J. Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al., 2003, Int. J. Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Канада и Centro de Immunologia Molecular, Куба (патент США № 5891996); № 6506883; Mateo et al., 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); МАТ-806 (Институт исследований рака Людвиг, Мемориал Слоан-Кеттеринг) (Jungbluth et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, Национальный институт исследований рака) (PCT WO 01/62931 A2); и SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138).

В другом предпочтительном варианте реализации полипептиды Fc согласно настоящему изобретению можно применять в алемтузумабе (кампат (Campath®), Millenium), гуманизованном моноклональном антителе, которое в настоящее время одобрено для лечения хронического В-клеточного лимфолейкоза. Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению можно применять в различных антителах или гибридах Fc, которые по существу аналогичны другим клиническим продуктам и кандидатам, включая, но не ограничиваясь ими, муромонаб-CD3 (Orthoclone ОКТ3®), антитело к CD3, разработанное Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ибритумомаб тиуксетан (зевалин (Zevalin®)), антитело к CD20, разработанное IDEC/Schering AG, гемтузумаб озогамидин (милотарг (Mylotarg®)), антитело к CD33 (белок р67), разработанное Celltech/Wyeth, алефацепт (амевив (Amevive®)), гибрид области Fc, нацеленный к LFA-3, разработанный Biogen, абциксимаб (реопро (ReoPro®)), разработанный Centocor/Lilly, базиликсимаб (симулект (Simulect®)), разработанный Novartis, паливизумаб (синагрис (Synagis®)), разработанный Med immun, инфиксимаб (ремикеид (Remicade®)), антитело к ФНО- α , разработанное Centocor, адалимумаб (хумира (Humira®)), антитело к ФНО- α , разработанное Abbott, хумикеид™, антитело к ФНО- α , разработанное Celltech, этанерцепт (энбрел (Enbrel®)), гибрид Fc, нацеленный к ФНО- α , разработанный ImmuneX/Amgen, АВХ-СВЛ, антитело к CD147, которое разработано Abgenix, АВХ-ИЛ8, антитело к ИЛ-8, которое разработано Abgenix, АВХ-МА1, антитело к MUC18, которое разработано Abgenix, пемтумомаб (R1549, 90Y-muHMFG1), антитело к MUC1, которое разработано Antisoma, Therex (R1550), антитело к MUC1, которое разработано Antisoma, AngioMab (AS 1405), которое разработано Antisoma, HuBC-1, которое разработано Antisoma, тиоплатин (AS 1407), который разработан Antisoma, антегрин (Antegren®) (натализумаб), антитело к α -4- β -1 (VLA-4) и α -4- β -7, которое разработано Biogen, МАТ к VLA-1, антитело к интегрину VLA-1, которое разработано Biogen, МАТ LTBR, антитело к рецептору лимфотоксина- β (LTBR), которое разработано Biogen, САТ-152, антитело к TGF- β 2, которое разработано Cambridge Antibody Technology, J695, антитело к ИЛ-12, которое разработано Cambridge Antibody Technology и Abbott, САТ-192, антитело к TGF- β 1, которое разработано Cambridge Antibody Technology и Genzyme, САТ-213, антитело к эотаксину 1, которое разработано Cambridge Antibody Technology, ЛymphoStat-B™, антитело к Blys, которое разработано Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences Inc., МАТ к TRAIL-R1, антитело к TRAIL-R1, которое разработано Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences, Inc., авастин™ (бевацизумаб, rhuMab-VEGF), антитело к VEGF, которое разработано Genentech, антитело к семейству рецепторов HER, которое разработано Genentech, антитело к тканевому фактору (ATF), которое разработано Genentech, ксолар™ (омализумаб), антитело к IgE, которое разработано Genentech, раптив™ (эфализумаб), антитело к CD11a, которое разработано

Genentech и Хота, антитело MLN-02 (ранее LDP-02), которое разработано Genentech и Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, антитело к CD4, которое разработано Genmab, HuMax-IL 15, антитело к ИЛ-15, которое разработано Genmab и Amgen, HuMax-инфлам, которое разработано Genmab и Medarex, HuMax-Cancer, антитело к гепараназе I, которое разработано Genmab и Medarex, а также Oxford GcoSciences, HuMax-лимфома, которое разработано Genmab и Amgen, HuMax-TAC, которое разработано Genmab, IDEC-131, антитело к CD40L, которое разработано IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (кленоликсимаб), антитело к CD4, которое разработано IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, антитело к CD80, которое разработано IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, антитело к CD23, которое разработано IDEC Pharmaceuticals, антитела к микробному фактору миграции (MIF), которые разработаны IDEC Pharmaceuticals, BEC2, антиидиотипическое антитело, которое разработано Imclone, IMC-1C11, антитело к KDR, которое разработано Imclone, DC101, антитело к flk-1, которое разработано Imclone, антитела к VE-кадгерину, которые разработаны Imclone, CEA-Cide™ (лабетузумаб), антитело к карциноэмбриональному антигену (CEA), которое разработано Immunomedics, LymphoCide™ (эпратузумаб), антитело к CD22, которое разработано Immunomedics, AFP-Cide, которое разработано Immunomedics, MyelomaCide, которое разработано Immunomedics, LkoCide, которое разработано Immunomedics, ProstaCide, которое разработано Immunomedics, MDX-010, антитело к CTLA4, которое разработано Medarex, MDX-060, антитело к CD30, которое разработано Medarex, MDX-070, которое разработано Medarex, MDX-018, которое разработано Medarex, осидем™ (IDM-1) и антитело к Her2, которые разработаны Medarex и Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, антитело к CD4, которое разработано Medarex и Genmab, HuMax-IL 15, антитело к ИЛ-15, которое разработано Medarex и Genmab, CNTO 148, антитело к ФНО- α , которое разработано Medarex и Centocor/J&J, CNTO 1275, направленное против цитокинов антитело, которое разработано Centocor/J&J, MOR101 и MOR102, антитела к внутриклеточной молекуле адгезии 1 (ICAM-1) (CD54), которые разработаны MorphoSys, MOR201, антитело к фактору роста фибробластов 3 (FGFR-3), которое разработано MorphoSys, нувион® (визилизумаб), антитело к CD3, которое разработано Protein Design Labs, HuZAF™, антитело к интерферону- γ , которое разработано Protein Design Labs, антитело к интегрину $\alpha 5\beta 1$, которое разработано Protein Design Labs, антитело к ИЛ-12, которое разработано Protein Design Labs, ING-1, антитело к Ер-CAM, которое разработано Хота, и MLN01, антитело к интегрину $\beta 2$, которое разработано Хота, все вышеприведенные ссылки в этом абзаце явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав вышеупомянутых клинических кандидатов и продуктов или в антитела и гибриды Fc, которые по существу сходны с ними. Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть включены в варианты вышеупомянутых клинических кандидатов и продуктов, которые гуманизированы, имеют созревшую аффинность, сконструированы или модифицированы каким-либо иным способом.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды Fc согласно настоящему изобретению применяют для лечения аутоиммунных, воспалительных или трансплантационных показаний. Антигены-мишени и клинические продукты и кандидаты, которые имеют отношение к таким заболеваниям, включают, но не ограничиваются ими, антитела к интегрину $\alpha 4\beta 7$, такие как LDP-02, антитела к интегрину $\beta 2$, такие как LDP-01, антитела к компоненту комплемента (C5), такие как 5G1.1, антитела к CD2, такие как BTI-322, MEDI-507, антитела к CD3, такие как OKT3, SMART антитела к CD3, антитела к CD4, такие как IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, антитела к CD11a, антитела к CD14, такие как IC14, антитела к CD18, антитела к CD23, такие как IDEC 152, антитела к CD25, такие как зенапакс, антитела к CD40L, такие как 5c8, антова, IDEC-131, антитела к CD64, такие как MDX-33, антитела к CD80, такие как IDEC-114, антитела к CD147, такие как ABX-CBL, антитела к E-селектину, такие как CDP850, антитела к gpIIb/IIIa, такие как реопро/абциксима, антитела к ICAM-3, такие как ICM3, антитела к ICE, такие как VX-740, антитела к FcR1, такие как MDX-33, антитела к IgE, такие как rhuMab-E25, антитела к ИЛ-4, такие как SB-240683, антитела к ИЛ-5, такие как SB-240563, SCH55700, антитела к ИЛ-8, такие как ABX-IL8, антитела к интерферону- γ , антитела к ФНО (ФНО, ФНО- α , ФНО- α), такие как CDP571, CDP870, D2E7, инфликсимаб, МАК-195F и антитела к VLA-4, такие как антегрэн.

Варианты Fc согласно настоящему изобретению, такие как варианты с повышенным связыванием с FcRn, могут применяться в молекулах ингибитора ФНО для обеспечения улучшенных свойств. Подходящие молекулы ингибитора ФНО включают любую молекулу, которая ингибирует действие ФНО- α у млекопитающего. Подходящие примеры включают гибрид Fc, энбрел® (этанерцепт) и антитела хумира® (адалimumаб) и ремикейд® (инфликсимаб). Моноклональные антитела (такие как ремикейд и хумира), сконструированные с применением вариантов Fc согласно настоящему изобретению для увеличения связывания с FcRn, могут обеспечивать улучшенную эффективность за счет увеличения периода полужизни.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяют антитела против инфекционных заболеваний. Антитела против эукариотических клеток включают антитела, направленные против дрожжевых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula*

polymorpha, Kluyveromyces fragilis и K. lactis, Pichia guilliermondii и P. pastoris, Schizosaccharomyces pombe, Plasmodium falciparum, а также Yarrowia lipolytica.

Подходящими также являются антитела против дополнительных грибковых клеток, включая антигены-мишени, связанные со штаммами Candida, включая Candida glabrata, Candida albicans, C. krusei, C. lusitanae и C. maltosa, а также виды Aspergillus, Cryptococcus, Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces и Penicillium, среди прочих.

Антитела, направленные против антигенов-мишеней, связанных с простейшими, включают, но не ограничиваются ими, антитела, связанные с видами Trypanosoma, Leishmania, включая Leishmania donovani; Plasmodium spp., Pneumocystis carinii, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia, Entamoeba histolytica и Cyclospora cayetanensis.

Антитела против прокариотических антигенов также являются подходящими, включая антитела против подходящих бактерий, таких как патогенные и непатогенные прокариоты, включая, но не ограничиваясь ими, Bacillus, включая Bacillus anthracis; Vibrio, например V. cholerae; Escherichia, например Enterotoxigenic E. coli, Shigella, например S. dysenteriae; Salmonella, например S. typhi; Mycobacterium, например M. tuberculosis, M. leprae; Clostridium, например C. botulinum, C. tetani, C. difficile, C. perfringens; Corynebacterium, например C. diphtheriae; Streptococcus, S. pyogenes, S. pneumoniae; Staphylococcus, например S. aureus; Haemophilus, например H. influenzae; Neisseria, например N. meningitidis, N. gonorrhoeae; Yersinia, например Y. lamblia, Y. pestis, Pseudomonas, например P. aeruginosa, P. putida; Chlamydia, например C. trachomatis; Bordetella, например B. pertussis; Treponema, например T. palladium; B. anthracis, Y. pestis, Brucella spp., F. tularensis, B. mallei, B. pseudomallei, B. mallei, B. pseudomallei, C. botulinum, Salmonella spp., токсин В (SEB) V. cholerae, E. coli O157:H7, Listeria spp., Trichosporon beigeli, Rhodotorula species, Hansenula anomala, Enterobacter sp., Klebsiella sp., Listeria sp., Mycoplasma sp. и т.п.

Согласно некоторым аспектам антитела направлены против вирусных инфекций; такие вирусы включают, но не ограничиваются ими, ортомиксовирусы (например, вирус гриппа), парамиксовирусы (например, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, вирус кори), аденовирусы, риновирусы, коронавирусы, реовирусы, тогавирусы (например, вирус краснухи), парвовирусы, поксвирусы (например, вирус натуральной оспы, вирус осповакцины), энтеровирусы (например, полиовирус, коксакивирус), вирусы гепатита (включая А, В и С), герпесвирусы (например, вирус простого герпеса, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр), ротавирусы, вирусы Норфолк, хантавирус, аренавирус, рабдовирус (например, вирус бешенства), ретровирусы (включая ВИЧ, HTLV-I и -II), паповавирусы (например, папилломавирус), полиомавирусы и пикорнавирусы и т.п.

Экспериментальная часть

Пример 1.

Модификация Fc для улучшения связывания с FcRn.

Неонатальный рецептор Fc (FcRn) регулирует трехнедельный период полужизни IgG у человека. Модификация антител IgG для улучшения pH-зависимого связывания с FcRn привела к получению примерных антител с увеличенным периодом полужизни/измененной фармакокинетикой и свойствами клеточного транспорта.

Материалы и методы.

Культура клеток. Линию клеток HEK293E поддерживали в DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в атмосфере увлажненного 5% CO₂/95% O₂ в инкубаторе.

Получение растворимого рекомбинантного FcRn человека. Конструкция эукариотического вектора pcDNA3, кодирующего рекомбинантную усеченную форму FcRn человека дикого типа, который содержит кДНК, кодирующую три внеклеточных домена (α 1- α 3), гибридованных с С-концом кДНК, кодирующей глутатион-S-трансферазу (GST) из Schistosoma japonicum, была описана (Berntzen, G., et al., J. Immunol. Methods, 2005. 298(1-2), p. 93-104; Andersen, J.T., et al., FEBS J., 2008. 275(16), p. 4097-110). Вектор также содержит кДНК, кодирующую β 2-микроглобулин человека и последовательность начала репликации из вируса Эпштейна-Барр. GST-меченый hFcRn получали путем кратковременной трансфекции клеток мезонефроса человека 293E (HEK293E) с применением полиэтиленимина Max (Polysciences), и рецептор очищали из собранного супернатанта с применением колонки GSTар FF, как описано (Berntzen et al., см. выше; Andersen et al., см. выше).

Мономерный His-меченый FcRn человека получали с применением бакуловирусной векторной системы экспрессии (Kim, J.K., et al., FcRn. Eur. J. Immunol., 1999, 29(9), p. 2819-25). Исходная суспензия вируса, кодирующего His-меченый FcRn человека, была безвозмездно предоставлена доктором Салли Уорд (Техасский университет, Юго-западный медицинский центр, Даллас, Техас, США). В общих чертах, FcRn человека очищали, используя колонку HisГар HP, поставляемую в форме, заряженной ионами Ni²⁺ (GE Healthcare). Колонку предварительно уравнивали с использованием 1× фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с добавлением 0,05% азида натрия, pH супернатанта доводили с использованием 1× ФСБ, 0,05% азида натрия (pH 10,9) до pH 7,2 и затем наносили на колонку HisГар HP со скоростью потока

5 мл/мин. Колонку промывали, используя 200 мл 1× ФСБ, и затем 50 мл 25 мМ имидазола, 1× ФСБ (pH 7,3), и FcRn человека элюировали с использованием 250 мМ имидазола, 1× ФСБ (pH 7,4). В собранном белке обменивали буфер на 1× ФСБ с использованием фильтров Amicron Ultra-10 (Millipore) с последующим выделением мономерной фракции. Для выделения мономерной фракции использовали колонку HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) перед концентрированием белка с использованием колонок Amicon Ultra (Millipore) и хранением при 4°C.

Конструирование и получение Fc-модифицированных вариантов IgG1. Векторы, кодирующие гуманизированные варианты 9C12 IgG1, были основаны на системе для экспрессии pLNOH2/pLNOk (Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods, 1997, 204(1), p. 77-87). В частности, гены, кодирующие варибельные (V) области тяжелой (H) и легкой (L) цепей, полученные из линии клеток гибридомы TC31-9C12.C9 (Банк гибридом для исследований развития, Университет Айовы) (Varghese, R., et al., J. Virol., 2004, 78(22), p. 12320-32), синтезировали как кассету для клонирования, фланкированную сайтами рестрикции, распознаваемыми эндонуклеазами BsmI/BsiWI. Затем фрагменты гена субклонировали в pLNOH2-^{NIP}hIgG1-WT-oriP и ^{NIP}pLNOk-oriP с получением pLNOH2-^{Hexon}hIgG1-WT-oriP и ^{Hexon}pLNOk-oriP, кодирующих химерную H-цепь и L-цепь человека соответственно. Вектор, кодирующий H-цепь, pLNOH2-^{Hexon}hIgG1-WT-oriP, затем использовали для получения вариантов h9C12 путем замены фрагментов гена C_H2 и C_H3 фрагментами, содержащими желаемые мутации. Фрагменты C_H2 заменяли с использованием уникальных сайтов рестрикции, распознаваемых эндонуклеазами AgeI и SfiI, тогда как фрагменты C_H3 заменяли с использованием SfiI и BamHI (все были получены от New England Biolabs). После совместной трансфекции векторов, кодирующих H-цепи и L-цепи, в клетки линии HEK293E с использованием Lipofectamine 2000 (Life Technologies), варианты h9C12 IgG1 очищали из собранного супернатанта с использованием колонки CaptureSelect (Life Technologies), специфичной в отношении C_H1. Мономерные фракции выделяли с помощью гель-хроматографии с использованием колонки Superdex 200 (GE Healthcare). Целостность белка подтверждали с помощью гель-электрофореза в ДСН-ПААГ в невозобновляющих условиях (Life Technologies).

ИФА. 96-луночные планшеты (Nunc) покрывали рекомбинантным гексоном AdV5 (Abd Serotech) (разведенным до концентрации 1 мкг/мл в ФСБ) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Оставшуюся площадь поверхности блокировали с использованием ФСБ/4% обезжиренного молока (S) (Acumedia) перед промыванием четыре раза с использованием ФСБ/0,005% твин-20 (T). В лунки добавляли титрованные количества вариантов h9C12, разведенных в ФСБ/T/S, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки, описанной выше, в лунки добавляли растворимый GST-меченый FcRn человека, разбавленный в ФСБ/S/T, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки, описанной выше, конъюгированное с ПХ антитело к GST (1:8000) разбавляли в добавленном ФСБ/S/T (Rockland Immunochemicals, США) с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки, описанной выше, связанный FcRn человека визуализировали путем добавления раствора тетраметилбензидина (ТМБ) (CalBiochem). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М HCl и поглощение при 450 нм регистрировали с использованием считывателя для планшетов SUNRISE (TECAN). ИФА проводили с использованием ФСБ с pH 6,0 или 7,4.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Для всех измерений кинетики использовали прибор Biacore 3000 (GE Healthcare). Гуманизированные варианты 9C12 IgG1 иммобилизовали с помощью связывания аминов на чипах CM5 в соответствии с инструкциями производителя. Связывание осуществляли путем впрыскивания 1-2,5 мкг/мл вариантов IgG1, растворенных в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5 (GE Healthcare). Буфер HBS-P (0,01 М HEPES, 0,15 NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) использовали в качестве подвижного и разбавляющего буфера. Затем впрыскивали растворимый мономерный FcRn человека в различных концентрациях. Анализ кинетики проводили с использованием программного обеспечения BIAevaluation, и данные по связыванию аппроксимировали с использованием простой модели биомолекулярного взаимодействия Ленгмюра первого порядка (1:1).

Результаты.

В настоящем документе описаны Fc-модифицированные антитела IgG с измененным связыванием FcRn человека, как представлено ниже. Мутированный вариант с тройной мутацией Q311R/N434W/M428E проявляет улучшенное pH-зависимое связывание, отличное от такового для опубликованных примеров.

IgG1-Q311R/N434W/M428E	
IgG1-Q311R/N434W	
IgG1-Q311R	
IgG1-N434W	
IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E	
IgG3(b)-Q311R/N434W/M438E/R435H	
IgG1-M252Y/S254T/T256E, также названный мутированный вариант/платформа YTE (Robbie, G.J., et al., Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(12): p. 6147-53; Dall'Acqua, W.F., P.A. Kiener, and H. Wu, J Biol Chem, 2006. 281(33): p. 23514-24).	Основной кандидат: AstraZeneca, включенный в качестве эталона.

Таблица 1

Кинетика связывания вариантов IgG1 человека с FcRn человека, согласно результатам SPR

pH=6,0				
Варианты IgG1	Ka (10 ⁴ /мс) ^a	Kd(10 ⁻² /с) ^a	KD (нМ) ^a	Изменение относительно дикого типа
Дикий тип	7,04±0,1	5,4±0,2	784,0	-
M252Y/S254T/T256E	8,66±0,2	0,78±0,0	93,0	8,4
Q311R/N434W/M428E	12,2±0,2	0,50±0,0	38,5	20,3
Q311R/N434W	16,1±0,2	0,36±0,0	22,3	35,1
Q311R	8,31±0,1	5,72±0,2	686,9	1,1
N434W	21,7±0,2	0,32±0,1	14,8	52,9
pH=7,4				
Дикий тип	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
M252Y/S254T/T256E	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
Q311R/N434W/M428E	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
Q311R/N434W	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
Q311R	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
N434W	Нет данных	Нет данных	1980,0	-

Пример 2.

В данном примере описаны дополнительные варианты IgG1 и IgG3 с измененным связыванием FcRn человека.

Материалы и методы.

Исследования в условиях *in vivo*. Мыши линии Tg32-Alb^{-/-} на основе генетического ядра C57BL/6J несут нулевые аллели FcRn HC (Fcgrt^{tm1Dcr}) и альбумина (Alb^{em12Mvw}) и экспрессируют геномный трансген hFcRn HC (FCGRТ) под контролем нативного промотора hFcRn. Мыши линии Tg32-Alb^{-/-} (пол - самки в возрасте 7-9 недель с массой тела от 17 до 27 г, 5 мышей/группу) получили 5 мг/кг вариантов IgG1 путем внутривенной инъекции. Образцы крови (25 мкл) получали из ретроорбитального синуса через 1, 3, 5, 7, 10, 12, 16, 19, 23, 30 и 37 дней после инъекции. После сбора образцов кровь немедленно смешивали с 1 мкл 1% K3-EDTA для предотвращения коагуляции и затем центрифугировали при 17000×g в течение 5 мин при 4°C. Плазму выделяли, разбавляли в соотношении 1:10 в 50% растворе глицерина/ФСБ и затем хранили при -20°C до исследования методом ИФА. Исследования в условиях *in vivo* проводили в Лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн, США).

Поверхностный плазмонный резонанс. Для всех измерений кинетики использовали прибор Biacore T200 (GE Healthcare). Варианты h9C12 иммобилизовали путем связывания аминов на чипах CM5 в соответствии с инструкциями производителя. Для всех экспериментов в качестве подвижного буфера и буфера для восстановления использовали фосфатный буфер (67 mM фосфат, 0,15 M NaCl, 0,005% твин-20) при pH 6,0 или буфер HBS-P (0,1 M HEPES, 0,15 NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20) при pH 7,4 соответственно. Рекомбинантный FcRn человека в различных концентрациях (1000,0-15,6 нМ) впрыскивали при скорости потока 50 мкл/мин при 25°C. Анализ кинетики проводили с использованием программного обеспечения BIAevaluation и данные по связыванию аппроксимировали с использованием простой модели взаимодействия Ленгмюра первого порядка (1:1).

ИФА. Выполняли, как описано в примере 1.

Таблица 2

IgG1 дикого типа
IgG1-Q311R/N434W/M428E
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E
IgG1-Q311R/N434P/M428E
IgG1-Q311R/N434W/M428D
IgG1-Q311R/N434W/M428E/H433K
IgG1-L309K/Q311R/N434W/M428E
IgG1-L309R/Q311R/N434W/M428E
IgG1-L309S/Q311R/N434W/M428E
IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E/R435H

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 5-7 и в табл. 3-5.

Таблица 3

Связывание вариантов h9C12 IgG1 и IgG3 человека с FcRn человека, согласно результатам ИФА

Варианты h9C12	Изменение относительно дикого типа (ИФА) при pH=6,0
IgG1 дикого типа	-
IgG1-Q311R/N434W/M428E*	6
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E	6
IgG1-Q311R/N434P/M428E	3
IgG1-Q311R/N434W/M428D	3
IgG1-Q311R/N434W/M428E/H433K	9
IgG1-L309K/Q311R/N434W/M428E	6
IgG1-L309R/Q311R/N434W/M428E	6
IgG1-L309S/Q311R/N434W/M428E	6
IgG3(b)-Q311R/N434W/M428E/R435H	3

Таблица 4

Кинетика связывания вариантов h9C12 IgG1 и IgG3 человека с FcRn человека, согласно результатам SPR

pH=6,0				
Варианты h9C12	ka(10 ⁵ /мс)	kd(10 ⁻² /с)	KD(нМ)	Изменение относительно дикого типа (KD) при pH=6,0
IgG1 дикого типа*	3,172	8,677	273	-
IgG1-Q311R/N434W/M428E*	0,117	1,106	9,3	29,30
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали
IgG1-Q311R/N434P/M428E	0,167	4,047	24,2	11,28
IgG1-Q311R/N434W/M428D	0,106	3,121	29,4	9,28
pH=7,4				
IgG1 дикого типа*	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
IgG1-Q311R/N434W/M428E*	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
IgG1-M252S/Q311R/N434W/M428E	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали	-
IgG1-Q311R/N434P/M428E	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-
IgG1-Q311R/N434W/M428D	Нет данных	Нет данных	Нет данных	-

Таблица 5

Период полужизни (дни) у мышей линии Tg32, гемизиготных по FcRn человека

Варианты IgG1	Специфичность IgG1	Путь	Доза (мг/кг)	Период полужизни (дни) (n=5)	+/- SD (дни)	Линия мышей
IgG1 дикого типа	h9C12	в/в	5	6,4	0,8	Гемизиготные мыши Tg32
IgG1-Q311R/N434W/M428E	h9C12	в/в	5	7,5	2,0	Гемизиготные мыши Tg32
IgG1 дикого типа	NIP	в/в	5	8,4	2,5	Гемизиготные мыши Tg32
IgG1-Q311R/N434W/M428E	NIP	в/в	5	12,3	1,3	Гемизиготные мыши Tg32

Все публикации и патенты, упомянутые в описании выше, включены в настоящий документ посредством ссылки. Различные модификации и варианты описанного способа и системы согласно настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники, не отступая от объема и сущности настоящего изобретения. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано применительно к конкретным предпочтительным вариантам реализации, следует понимать, что заявленное изобретение не должно быть неправомерно ограничено такими конкретными вариантами реализации. Соответственно, предусмотрено, что различные модификации описанных способов для реализации настоящего изобретения, которые очевидны для специалистов в соответствующих областях, включены в объем нижеследующей формулы настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для антитело-опосредованной терапии, содержащая иммуноглобулин в терапевтически эффективном количестве, где указанный иммуноглобулин содержит мутации Q311R, N434W и M428E, где нумерация аминокислот соответствует системе нумерации EU, причем указанная мутация увеличивает период полужизни указанного иммуноглобулина в сыворотке крови по сравнению с иммуноглобулином, не содержащим указанную мутацию, и при этом указанный иммуноглобулин является

человеческим IgG1-Q311R/N434W/M428E.

2. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что константная область указанного иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 7.

3. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что указанная мутация увеличивает период полужизни указанного иммуноглобулина в сыворотке крови по сравнению с иммуноглобулином, не содержащим указанную мутацию.

4. Композиция по любому из пп.1-3, характеризующаяся тем, что указанное антитело связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из маркера рака, цитокина, маркера инфекционного заболевания и фактора роста.

5. Применение иммуноглобулина, как определено в любом из пп.1-4, для лечения или предотвращения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом.

6. Применение по п.5, характеризующееся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, отторжения трансплантата и инфекционного заболевания.

7. Применение по п.5 или 6, характеризующееся тем, что указанный иммуноглобулин связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из маркера рака, цитокина, маркера инфекционного заболевания и фактора роста.

8. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий обеспечение иммуноглобулина, как определено в любом из пп.1-4, субъекту, нуждающемуся в этом.

9. Способ по п.8, характеризующийся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, отторжения трансплантата и инфекционного заболевания.

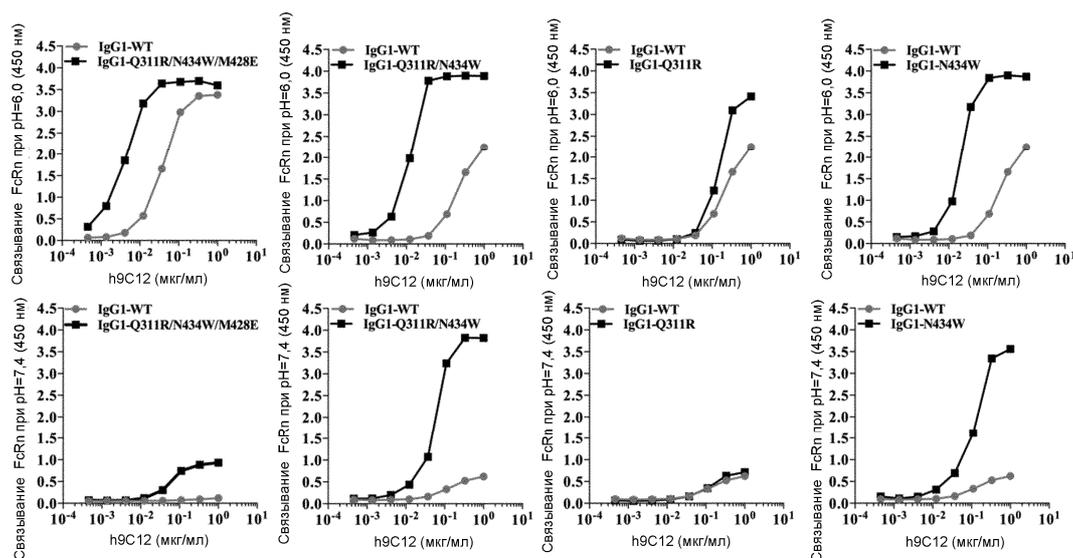
10. Способ по п.8 или 9, характеризующийся тем, что указанный иммуноглобулин связывается с мишенью, выбранной из группы, состоящей из маркера рака, цитокина, маркера инфекционного заболевания и фактора роста.

11. Терапевтический гибридный области Fc, содержащий область Fc из иммуноглобулина, как определено в любом из пп.1-4.

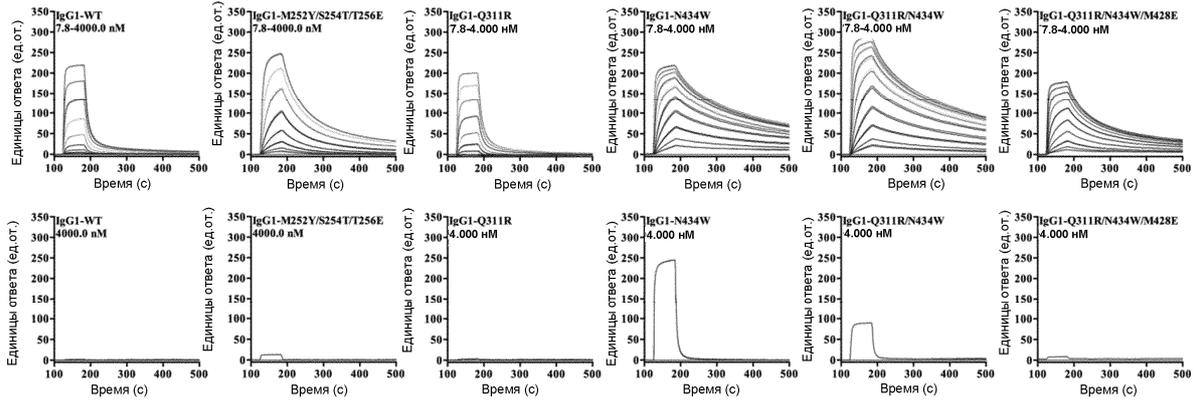
12. Иммуногенный гибридный белок, содержащий (а) иммуноглобулин, как определено в любом из пп.1-4, или (б) область Fc данного иммуноглобулина (а), гибридованную с иммуногеном.

13. Вакцинная композиция, используемая для индукции иммунного ответа у субъекта, содержащая гибридный белок по п.12 в терапевтически эффективном количестве.

14. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение вакцинной композиции по п.13 указанному субъекту в условиях, при которых у указанного субъекта развивается иммунный ответ на указанный иммуноген.



Фиг. 1



Фиг. 2

IgG1_WT ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS (SEQ ID NO: 1)
IgG1_Q311R/N434W/M428E ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS (SEQ ID NO: 2)
IgG1_Q311R/N434W ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS (SEQ ID NO: 3)
IgG1_Q311R ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS (SEQ ID NO: 4)
IgG1_N434W ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS (SEQ ID NO: 5)

IgG1_WT GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
IgG1_Q311R/N434W/M428E GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
IgG1_Q311R/N434W GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
IgG1_Q311R GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
IgG1_N434W GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

IgG1_WT PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
IgG1_Q311R/N434W/M428E PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
IgG1_Q311R/N434W PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
IgG1_Q311R PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
IgG1_N434W PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

311

IgG1_WT STYRVVSVLTVHLH³¹¹QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
IgG1_Q311R/N434W/M428E STYRVVSVLTVHLH³¹¹QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
IgG1_Q311R/N434W STYRVVSVLTVHLH³¹¹QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
IgG1_Q311R STYRVVSVLTVHLH³¹¹QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
IgG1_N434W STYRVVSVLTVHLH³¹¹QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

IgG1_WT LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
IgG1_Q311R/N434W/M428E LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
IgG1_Q311R/N434W LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
IgG1_Q311R LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
IgG1_N434W LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

428 434

IgG1_WT QQGNVFS⁴²⁸CSVMHEALH⁴³⁴NHYTQKSLSLSPGK
IgG1_Q311R/N434W/M428E QQGNVFS⁴²⁸CSVMHEALH⁴³⁴NHYTQKSLSLSPGK
IgG1_Q311R/N434W QQGNVFS⁴²⁸CSVMHEALH⁴³⁴NHYTQKSLSLSPGK
IgG1_Q311R QQGNVFS⁴²⁸CSVMHEALH⁴³⁴NHYTQKSLSLSPGK
IgG1_N434W QQGNVFS⁴²⁸CSVMHEALH⁴³⁴NHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 3

>IgG1_WT

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 1)

>IgG1_Q311R/N434W/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMSHEALHWHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2)

>IgG1_Q311R/N434W

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMSHEALHWHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 3)

>IgG1_Q311R

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

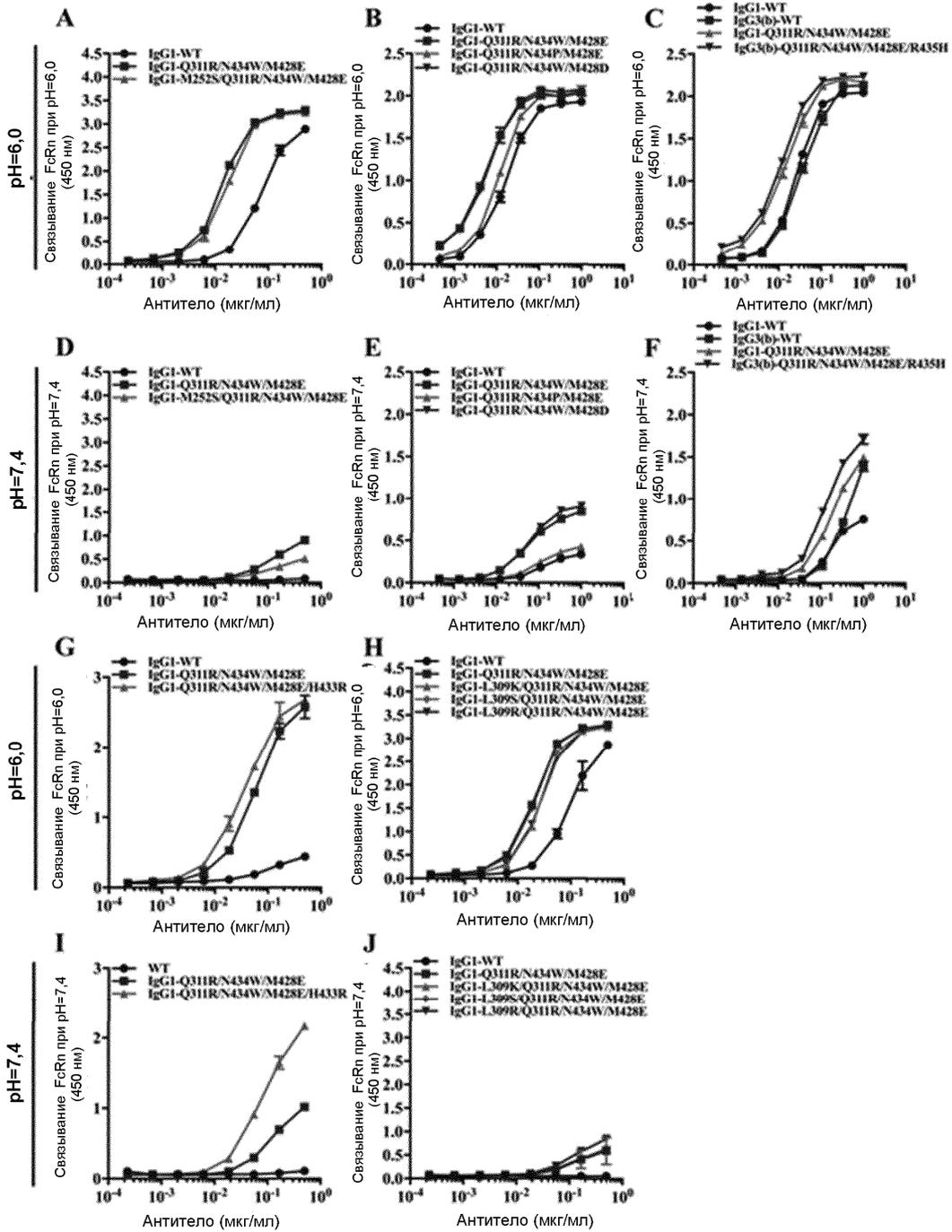
(SEQ ID NO: 4)

>IgG1_N434W

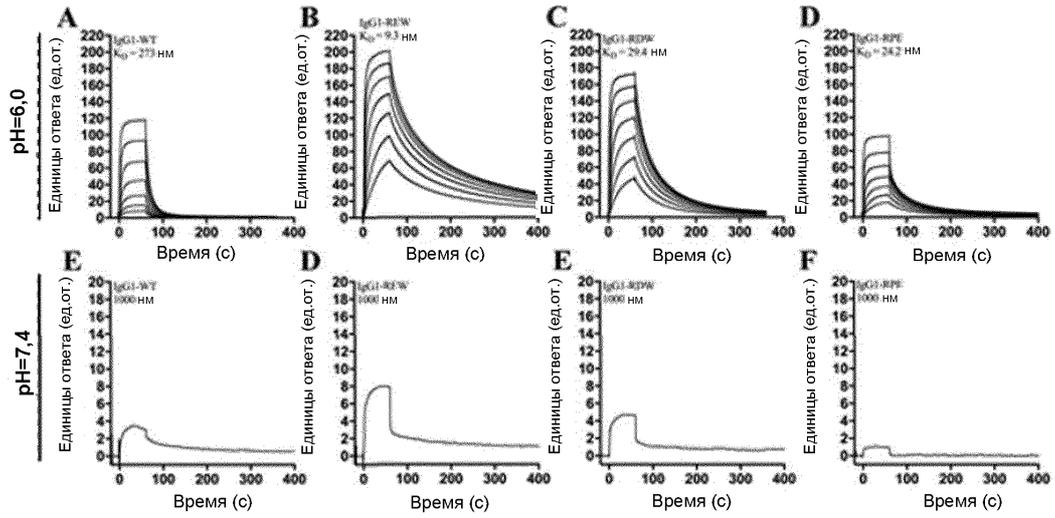
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMSHEALHWHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 5)

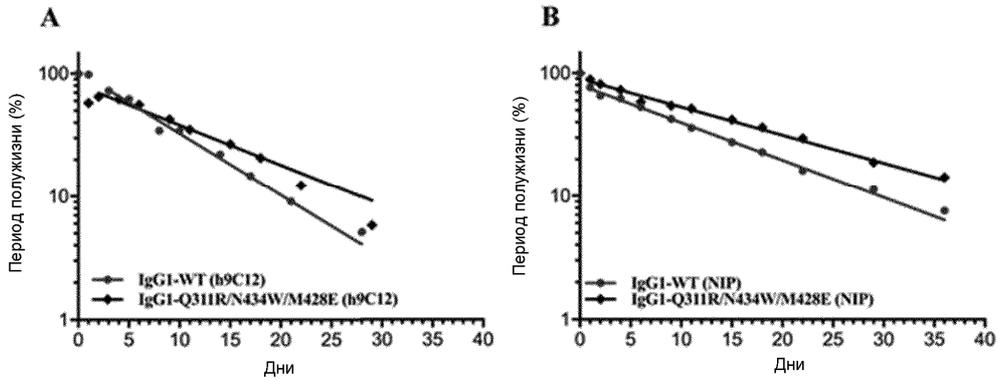
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

>IgG1_WT*

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNNHYTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 6)

>IgG1_Q311R/N434W/M428E*

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDQWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
EALHWHYHTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 7)

>IgG1_M252S/Q311R/N434W/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDQWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
EALHWHYHTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 8)

>IgG1_Q311R/N434P/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDQWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
EALHWHYHTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 9)

>IgG1_Q311R/N434W/M428D

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDQWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVDH
EALHWHYHTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 10)

>IgG1_Q311R/N434W/M428E/H433K

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
 EALKWHYTKQKLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 11)

>IgG1_L309K/Q311R/N434W/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
 EALHWHYTKQKLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 12)

>IgG1_L309R/Q311R/N434W/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
 EALHWHYTKQKLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 13)

>IgG1_L309S/Q311R/N434W/M428E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVEH
 EALHWHYTKQKLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 14)

>IgG3(b)_Q311R/N434W/M428E/R435H

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLDGTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLT
 VLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSG
 QPENNYNTTPMPLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVEHEALHWHYTKQKLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 15)

IgG3(b)_Q311R/N434W/M428E/R435H

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
 LGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLDGTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCD
 TTPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTFRVSVLTVLHRRDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMPLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVEHEALHWHYTKQKLSL
 SPGK
 (SEQ ID NO: 16)

Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2