(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 045483 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.28

(21) Номер заявки
201992068

(22) Дата подачи заявки
2018.03.02

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ГЛИКАНАМИ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/466,766; 62/480,126; 62/486,826; 62/563,718; 62/577,830**
(32) **2017.03.03; 2017.03.31; 2017.04.18; 2017.09.27; 2017.10.27**
(33) **US**
(43) **2020.03.04**
(86) **PCT/US2018/020562**
(87) **WO 2018/160909 2018.09.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дрэнсфилд Дэниэл Т., Прендергаст Джиллиан М., Иварон Дэвид А. (US)

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

(56) WO-A1-2016077526
WO-A1-2016033284
US-A1-20080279847
US-A1-20150368349
WO-A1-2017083582

(57) Предложены способы лечения рака, включающие введение взаимодействующих с гликанами антител. Предложены антитела против антигена сиалил-Tn, а также соответствующие композиции и препараты, подходящие для достижения нужных уровней биологической активности, биодоступности и токсичности.

045483 B1

045483 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США номер 62/466766, поданной 3 марта 2017 г. и озаглавленной GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE, предварительной патентной заявки США номер 62/480126, поданной 31 марта 2017 г. и озаглавленной GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE, предварительной патентной заявки США номер 62/486826, поданной 18 апреля 2017 г. и озаглавленной GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE, предварительной патентной заявки США номер 62/563718, поданной 27 сентября 2017 г. и озаглавленной GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE, и предварительной патентной заявки США номер 62/577830, поданной 27 октября 2017 г. и озаглавленной GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USE, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Список последовательностей

Настоящее изобретение содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия в формате ASCII, созданная 2 марта 2018 г., носит название 2033_1030PCT_SL.txt и имеет размер 24876 байтов.

Предпосылки создания изобретения

Аберрантное гликозилирование сопровождает некоторые из других мутаций, обычно наблюдаемых при карциномах. По оценкам, клетки примерно 80% всех карцином экспрессируют укороченные гликаны, антиген Tn и сиалированную форму, сиалил-Tn (STn). С некоторыми исключениями, Tn и STn не экспрессируются в нормальных, здоровых тканях. Кроме того, отсутствующая у человека иммуногенная сиаловая кислота, N-гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc), судя по всему, дифференциально экспрессируется на карциномах, таких как рак молочной железы, в форме Neu5Gc-STn (GcSTn).

Множество аберрантных форм гликозилирования были описаны при разных формах рака у человека, что позволяет идентифицировать определенные гликаны как класс молекул клеточной поверхности, подходящих для специфического нацеливания препаратов на опухоли (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). Например, при различных видах рака человека (таких как рак мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легкого и яичника, среди прочих) наблюдется высокая экспрессия антигена STn, который редко встречается в нормальных человеческих тканях (Karlen, P. et al., Gastroenterology. 1998 Dec; 11 5(6): 1395-404; Ohno, S. et al., Anticancer Res. 2006 Nov-Dec; 26(6A):4047-53). Кроме того, присутствие STn на ассоциированных с опухолями муцинах связано с неблагоприятным прогнозом болезни и, вследствие этого, он считается многообещающим эпитопом для обнаружения и таргетной терапии рака (Cao, Y. et al., Virchows Arch. 1997 Sep; 431(3): 159-66; Julien, S. et al., Br J Cancer. 2009 Jun 2; 100(11): 1746-54; Itzkowitz, S.H. et al., Cancer. 1990 Nov 1; 66(9): 1960-6; Motoo, Y. et al., Oncology. 1991; 48(4):321-6; Kobayashi, H. et al., J Clin Oncol. 1992 Jan; 10(1):95-101). Образование Tn и STn связано с соматическими мутациями в гене Cosmc, который кодирует молекулярный шаперон, необходимый для образования активной T-синтазы (Ju, T. et al., Nature. 2005 Oct 27; 437(7063):1252; Ju, T. et al., Cancer Res. 2008 Mar 15; 68(6): 1636-46). Оно также может являться результатом повышенной экспрессии сиалил-трансферазы, ST6GalNAc I (Ikehara, Y. et al., Glycobiology. 1999 Nov; 9(11): 1213-24; Brockhausen, I. et al., Biol Chem. 2001 Feb; 382(2):219-32). De novo экспрессия STn способна приводить к изменению клеток карциномы, изменениям злокачественного фенотипа и приводить к более агрессивному поведению клеток (Pinho, S. et al., Cancer Lett. 2007 May 8; 249(2): 157-70). Хотя STn экспрессируется на высоком уровне в злокачественных тканях, экспрессия на низких уровнях также обнаружена на здоровых клетках человека (Jass, J.R. et al., J Pathol. 1995 Jun; 176(2): 143-9; Kirkeby, S. et al., Arch Oral Biol. 2010 Nov; 55(11):830-41). Сам по себе STn привлекает внимание в качестве мишени для обнаружения и терапии рака (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). STn также присутствует в муцинах, ассоциированных с раковыми стволовыми клетками (Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426), и STn вовлечен в иммуносупрессию (Carrascal, M.A., et al., Molecular Oncology. 2014. 8(3): 753-65).

Помимо присутствия STn, и другие изменения гликозилирования были отмечены при раке. Одно из них включает Neu5Gc. N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac) и Neu5Gc являются двумя основными сиаловыми кислотами на поверхностях клеток млекопитающих. Neu5Ac и Neu5Gc отличаются лишь тем, что Neu5Gc содержит дополнительный атом кислорода, связанный с химической группой, присоединенной к углероду 5. Вследствие утраты функционального гена, сиаловая кислота в организме человека может синтезироваться лишь в форме Neu5Ac, но не Neu5Gc. Однако Neu5Gc может метаболически попадать в организм человека из продуктов питания животного происхождения, таких как красное мясо (Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Oct 14; 100(21): 12045-50; Nguyen, D.H. et al., J Immunol. 2005 Jul 1; 175(1):228-36; US7682794, US8084219, US2012/0142903, WO2010030666 и WO2010030666). Neu5Gc присутствует в значительном избытке в опухолях человека (Higashi, H. et al., Cancer Res. 1985 Aug; 45(8):3796-802; Miyoshi I. et al., Mol Immunol. 1986. 23: 631-638; Hirabayashi, Y. et al., Jpn J Cancer Res. 1987. 78: 614-620; Kawachi. S, et al., Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988. 85: 381-383;

Devine, P.L. et al., Cancer Res. 1991. 51: 5826-5836; Malykh, Y.N. et al., Biochimie. 2001. 83: 623-634 и Inoue, S. et al., 2010. Glycobiology. 20(6): 752-762) и находится на очень низком уровне в нормальных тканях человека, что упускалось из виду в течение нескольких десятилетий (Diaz, S.L. et al., PloS One. 2009. 4: e4241; Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100: 12045-12050; Varki, A. et al., Glycoconj J. 2009. 26: 231-245). Повышенное метаболическое накопление поступающей из продуктов питания Neu5Gc в раковых тканях в сравнении со здоровыми человеческими тканями, скорее всего, может быть объяснено по меньшей мере тремя факторами: быстрым ростом с недостаточным продуцированием конкурирующей эндогенной Neu5Ac, усиленным макропиноцитозом, вызванным факторами роста (Dharmawardhane, S. et al., Mol Biol Cell. 2000 Oct; 11(10):3341-52; Simonsen, A. et al., Curr Opin Cell Biol. 2001 Aug; 13(4):485-92; Johannes, L. et al., Traffic. 2002 Jul; 3(7):443-51; Amyere, M. et al., Int J Med Microbiol. 2002 Feb; 291(6-7):487-94), и стимуляцией экспрессии гена лизосомного переносчика сиаловой кислоты сиалина в результате гипоксии (Yin, J. et al., Cancer Res. 2006 Mar 15; 66(6):2937-45). Кроме того, все люди, протестированные до настоящего времени, имеют резервуар поликлональных антител против не принадлежащей человеку Neu5Gc, что делает ее первым примером ксено-аутоантигена (Padler-Karavani, V. et al., Glycobiology. 2008 Oct; 18(10):818-30; Varki, N.M. et al., Annu Rev Pathol. 2011; 6:365-93). Показано, что накопление пищевой Neu5Gc в злокачественных опухолях, несмотря на анти-Neu5Gc ответ, способствует прогрессированию опухолей за счет индукции слабого хронического воспаления (Hedlund, M. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Dec 2; 105(48):18936-41). Таким образом, Neu5Gc, содержащая гликановые эпитопы, на человеческих опухолях предоставляет ценную возможность таргетирования лекарственных средств. В недавнем исследовании у пациентов с раком было обнаружено наличие антител против Neu5Gc-содержащего STn (GcSTn), но не Neu5Ac-STn (AcSTn), и был изучен их потенциал в качестве специфического биомаркера для обнаружения рака (Padler-Karavani, V. et al., Cancer Res. 2011 May 1; 71(9):3352-63).

В данной области сохраняется потребность в терапевтических антителах, способных связывать гликаны, включая гликаны, связанные с заболеванием и пораженными болезнью клетками и тканями. Кроме того, сохраняется потребность в более эффективных способах получения таких антител и способах использования таких антител для таргетирования пораженных болезнью клеток и тканей. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность за счет предложения соответствующих соединений и способов.

Сущность изобретения

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта путем введения антитела, которое вводят в дозе от примерно 1 мг/кг до примерно 10 мг/кг, при этом антитело имеет конечный период полувыведения от примерно 50 часов до примерно 200 часов, и при этом антитело связывает антиген сиалил-Tn (STn).

Антитело может содержать вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 9; и вариабельный домен легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 10. Антитело может представлять собой конъюгат антитело-лекарственное средство. Антитело может быть конъюгировано с монометилауристатином E (MMAE). Антитело может быть введено внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения колоректального рака путем введения анти-STn антитела субъекту с колоректальным раком, при этом анти-STn антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9 и 11; и вариабельный домен легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10 и 12. Колоректальный рак может быть резистентным к лечению по меньшей мере одним из цетуксимаба, панитумумаба, бевацизумаба, рамуцирумаба, трастузумаба, понатиниба, сорафениба, 5-фторурацила, цисплатина, доцетаксела, гемцитабина, иринотекана, паклитаксела и оксалиплатина. Анти-STn антитело может представлять собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). ADC может включать по меньшей мере одно конъюгированное средство, при этом по меньшей мере одно конъюгированное средство выбирают из одного или более из ауристатина, майтанзина, тубулизина, алкалоида барвинка, димера пирролобензодиазепина, камптотецина, дуокармицина, аманитина, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и ингибитора митоген-активируемой протеинкиназы (MEK). ADC может включать один или более полимеров, при этом один или более полимеров соединяют анти-STn антитело и по меньшей мере одно конъюгированное средство. Один или более полимеров могут включать одно или более из поли(этиленгликоля) (PEG), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламида) (полиHPMA), поли(α-аминокислоты), углеводного полимера, гликополисахарида, гликолипида, гликоконъюгата, полиглицерина, поливинилового спирта, поли(акриловой кислоты), поликеталя и полиацеталя. Один или более полимеров могут включать поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаль) (PHF). Анти-STn антитело может уничтожать клетки, экспрессирующие STn, с полумаксимальной ингибирующей концентрацией от примерно 0,1 нМ до примерно 50 нМ.

Введение анти-STn антитела можно выполнять в сочетании с по меньшей мере одним другим методом лечения. Другой метод лечения может включать стандартный метод лечения. Другой метод лечения можно выбирать из введения одного или более из цетуксимаба, панитумумаба, бевацизумаба, рамуцируму-

маба, трастузумаба, понатиниба, сорафениба, 5-фторурацила, цисплатина, доцетаксела, гемцитабина, иринотекана, паклитаксела и оксалиплатина. Другой метод лечения также может включать введение по меньшей мере одного ингибитора клеточного цикла. Ингибитор клеточного цикла может представлять собой ингибитор циклин-зависимой киназы (CDK). Ингибитор CDK может ингибировать CDK4 и/или CDK6. Ингибитор CDK можно выбирать из палбоциклиба, рибоциклиба и абемациклиба. Анти-STn антитело можно вводить одновременно с другим методом лечения. Анти-STn антитело можно вводить последовательно с другим методом лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение анти-STn антитела субъекту, страдающему от рака, при этом анти-STn антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9 и 11; и вариабельный домен легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 10 и 12, причем введение анти-STn антитела выполняют в сочетании с по меньшей мере одним ингибитором клеточного цикла. Ингибитор клеточного цикла может представлять собой ингибитор циклин-зависимой киназы (CDK). Ингибитор CDK может ингибировать CDK4 и/или CDK6. Ингибитор CDK можно выбирать из палбоциклиба, рибоциклиба и абемациклиба. Анти-STn антитело можно вводить одновременно с ингибитором клеточного цикла. Анти-STn антитело можно вводить последовательно с ингибитором клеточного цикла.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к ADC, который включает анти-STn антитело, содержащее VH с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 7, 9 и 11; VL с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 8, 10 и 12; и одно или более цитотоксических средств. Цитотоксическое средство можно выбирать из по меньшей мере одного из ауристатина, майтанзина, тубулизина, алкалоида барвинка, димера пирролобензодиазепина, камптотецина, дуокармицина, аманитина, ингибитора PI3K и ингибитора MEK. Анти-STn антитело может быть конъюгировано с одним или более цитотоксическими средствами при помощи линкера. ADC может включать один или более полимеров, соединяющих анти-STn антитело и одно или более цитотоксических средств. Один или более полимеров могут включать одно или более из PEG, полиHPMA, поли(а-аминокислоты), углеводного полимера, гликополисахарида, гликолипида, гликоконъюгата, полиглицерина, поливинилового спирта, поли(акриловой кислоты), поликеталя и полиацеталя. Один или более полимеров могут включать PHF. Один или более полимеров могут быть присоединены к анти-STn антителу при помощи линкера. Одно или более цитотоксических средств могут быть присоединены к одному или более полимерам при помощи линкера. Линкер может представлять собой расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, при этом субъект имеет по меньшей мере одну раковую клетку, экспрессирующую STn, включающему введение анти-STn конъюгата антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе. По меньшей мере одна раковая клетка может представлять собой клетку рака яичника. По меньшей мере одна раковая клетка может быть резистентной к лечению по меньшей мере одним химиотерапевтическим средством. Химиотерапевтическое средство может представлять собой цисплатин. Анти-STn конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 25 мг/кг. Введение можно выполнять путем внутривенной инъекции. Анти-STn конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить ежедневно, еженедельно или ежемесячно.

Некоторые способы по настоящему изобретению включают способы лечения рака путем введения ADC субъекту, при этом ADC включает: VH, содержащую SEQ ID NO: 7; VL, содержащую SEQ ID NO: 8; по меньшей мере одну константную область IgG человека; и цитотоксическое конъюгированное средство, причем цитотоксическое конъюгированное средство конъюгировано с по меньшей мере одной константной областью IgG человека при помощи линкера. По меньшей мере одну константную область IgG человека можно выбирать из одной или более из SEQ ID NO: 15 и 16. Цитотоксическое конъюгированное средство может включать MMAE. ADC можно вводить в дозе от примерно 1 мг/кг до примерно 6 мг/кг. ADC можно вводить путем внутривенной болюсной инъекции. ADC можно вводить в виде части композиции, при этом композиция содержит по меньшей мере один эксципиент. Композицию можно вводить в объеме от примерно 0,1 мл/кг до примерно 10 мл/кг. Композицию можно вводить в объеме примерно 1,2 мл/кг. Композиция может содержать ADC в концентрации от примерно 0,5 мг/мл до примерно 10 мг/мл. ADC может иметь кажущийся конечный период полувыведения от примерно 2 суток до примерно 8 суток. ADC может иметь кажущуюся скорость клиренса от примерно 10 мл/кг/сутки до примерно 20 мл/кг/сутки. ADC может иметь кажущийся объем распределения в равновесном состоянии от примерно 50 до примерно 100 мл/кг. ADC может иметь максимальную наблюдаемую концентрацию от примерно 10 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл. ADC может иметь площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) от начала введения до последней наблюдаемой поддающейся количественному определению концентрации, составляющую от примерно 50 до примерно 500 суток*мкг/мл.

Краткое описание чертежей

Вышеизложенное и другие цели, признаки и преимущества будут очевидны из следующего далее описания конкретных вариантов осуществления изобретения, проиллюстрированных сопроводительными чертежами, в которых условные обозначения относятся к одинаковым частям в разных изображениях. Чертежи не обязательно масштабированы; вместо этого внимание уделяется иллюстрированию принципов различных вариантов осуществления изобретения.

Фиг. 1A представляет собой схематическое изображение α2,6-сиалированного N-ацетилгалактозамина (STn), где наибольшим по размеру эллипсом указана конкретная область STn, узнаваемая антителами группы 1.

Фиг. 1B представляет собой схематическое изображение α2,6-сиалированного N-ацетилгалактозамина (STn), где наибольшим по размеру эллипсом указана конкретная область STn, узнаваемая антителами группы 2.

Фиг. 1C представляет собой схематическое изображение α2,6-сиалированного N-ацетилгалактозамина (STn), где наибольшим по размеру эллипсом указана конкретная область STn, узнаваемая антителами группы 3.

Фиг. 1D представляет собой схематическое изображение α2,6-сиалированного N-ацетилгалактозамина (STn), где наибольшим по размеру эллипсом указана конкретная область STn, узнаваемая антителами группы 4.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий средние сывороточные концентрации антитела с течением времени после введения начальной дозы hSIA101-MMAE яванским макакам.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий средние сывороточные концентрации антитела с течением времени после введения второй дозы (в день 22 лечения) hSIA101-MMAE яванским макакам.

Фиг. 4 представляет собой набор графиков, показывающих объемы полученной от пациента ксенотрансплантированной опухоли в процессе лечения hSIA101-ADC в сравнении с другими методами лечения. Опухоли, представленные на верхней панели, были образованы из опухоли яичника от не получавшего химиотерапию пациента, и опухоли, представленные на нижней панели, были образованы из опухоли яичника от пациента, который ранее получал лечение химиотерапевтическими средствами.

Подробное описание

Введение.

По настоящему изобретению предложены антитела, специфические для, или взаимодействующие с эпитопами, содержащими углеводные группы, называемые в настоящем документе гликанами. Некоторые взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве биотерапевтических средств. Другие варианты осуществления относятся к способам получения таких взаимодействующих с гликанами антител.

В природе STn могут быть сталированными N-ацетилнейраминовой кислотой (Neu5Ac) или N-гликолилнейраминовой кислотой (Neu5Gc). Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть направлены на гликаны, имеющие любые STn (антитела против пан-STn), гликаны, имеющие STn, которые включают конкретно Neu5Ac (AcSTn), или гликаны, имеющие STn, которые включают конкретно Neu5Gc (GcSTn). В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению направлены на связанные с раком гликановые антигены, такие как α2,6-сиалированный N-ацетилгалактозамин (STn).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам получения взаимодействующих с гликанами антител. Такие способы могут включать использование мышей для вызывания иммунного ответа на один или более антигенов, включая STn (например, AcSTn и/или GcSTn). Как описано в настоящем документе, можно использовать ряд способов воздействия на получаемые при иммунизации мышей антитела. Такие способы могут включать варьирование линии и/или пола иммунизируемых мышей, варьирование используемого антигена, варьирование типа и дозы адъюванта, используемого при введении антигена, а также динамику иммунизации перед проведением слияния для получения гибридом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рака с использованием взаимодействующих с гликанами антител. Такие способы могут включать использование конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). ADC могут включать цитотоксические конъюгированные средства, присоединенные к взаимодействующим с гликанами антителам непосредственно или при помощи линкера. Взаимодействующие с гликанами антитела могут связывать STn. В некоторых вариантах осуществления способы лечения рака включают уничтожение раковых стволовых клеток. В некоторых аспектах взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы отдельно. В других аспектах взаимодействующие с гликанами антитела используют в сочетании с химиотерапевтическими средствами. Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть получены в виде композиций, содержащих один или более эксципиентов, для введения субъектам. Композиции и пути введения могут обеспечивать доставку взаимодействующих с гликанами антител в концентрациях и дозах, подходящих для достижения биодоступности, терапевтического окна, и/или объема распределения, необходи-

мых для эффективного лечения.

Также предложены оптимизированные, гуманизированные и конъюгированные формы взаимодействующих с гликанами антител, раскрытых в настоящем документе. Кроме того, предложены наборы, анализы и реагенты, включая антитела и/или способы по настоящему изобретению.

Определения.

Соседний: используемый в настоящем документе термин "соседний" относится к чему-либо граничащему, расположенному рядом или вблизи конкретного объекта. В некоторых вариантах осуществления "соседние остатки" представляют собой сахарные остатки в цепи гликана, которые связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления "соседние гликаны" представляют собой цепи гликанов, расположенные рядом друг с другом, либо в непосредственном контакте, либо на близком расстоянии, и без какого-либо иного гликана между ними.

Введенные в сочетании: используемые в настоящем документе термины "введенные в сочетании" или "комбинированное введение" означают, что субъект одновременно подвергается воздействию двух или более средств, вводимых в одно и то же время или в пределах некоторого интервала времени, так что субъект в какой-то момент времени одновременно подвергается воздействию обоих средств, и/или так, что у пациента может иметь место перекрывание эффектов от каждого из средств. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу одного или более средств вводят в пределах примерно 24 часов, 12 часов, 6 часов, 3 часов, 1 часа, 30 минут, 15 минут, 10 минут, 5 минут или 1 минуты от введения по меньшей мере одной дозы одного или более других средств. В некоторых вариантах осуществления введение происходит в режиме перекрывающихся доз. Используемый в настоящем документе термин "режим дозирования" относится к нескольким дозам, разнесенным во времени. Такие дозы могут быть введены с регулярными интервалами, или могут иметь место один или более пропусков во введении. В некоторых вариантах осуществления введение отдельных доз одного или более взаимодействующих с гликанами антител, описанных в настоящем документе, происходит с достаточно короткими интервалами времени, так что достигается комбинаторный (например, синергический) эффект.

Аминокислота: используемые в настоящем документе термины "аминокислота" и "аминокислоты" относятся ко всем природным L-альфа-аминокислотам, а также к неприродным аминокислотам. Аминокислоты обозначают либо однобуквенным, либо трехбуквенным кодом, следующим образом: аспарагиновая кислота (Asp:D), изолейцин (Ile:I), треонин (Thr:T), лейцин (Leu:L), серии (Ser:S), тирозин (Tyr:Y), глутаминовая кислота (Glu:E), фенилаланин (Phe:F), пролин (Pro:P), гистидин (His:H), глицин (Gly:G), лизин (Lys:K), аланин (Ala:A), аргинин (Arg:R), цистеин (Cys:C), триптофан (Trp:W), валин (Val:V), глутамин (Gln:Q), метионин (Met:M), аспарагин (Asn:N), где сначала приведена аминокислота, затем в скобках приведены трехбуквенный и однобуквенный код, соответственно.

Животное: используемый в настоящем документе термин "животное" относится к любому представителю животного царства. В некоторых вариантах осуществления "животное" означает людей на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления "животное" означает не являющимися людьми животных на любой стадии развития. В конкретных вариантах осуществления не являющееся человеком животное представляет собой млекопитающее (например, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают, но без ограничения, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и червей. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой трансгенное животное, генетически модифицированное животное или клон.

Антитело: в настоящем документе термин "антитело" используется в самом широком смысле и конкретно охватывает различные варианты осуществления, включая, но без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, образованные из по меньшей мере двух интактных антител), а также фрагменты антител, такие как диатела, при условии, что они обладают нужной биологической активностью. Антитела, прежде всего, являются молекулами на основе аминокислот, но также могут иметь одну или более модификаций, например, содержать сахарные фрагменты.

Фрагмент антитела: используемый в настоящем документе термин "фрагмент антитела" означает часть интактного антитела, предпочтительно, содержащую его антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами "Fab", каждый с одним антигенсвязывающим сайтом. Также образуется остаточный фрагмент "Fc", название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к получению фрагмента $F(ab')_2$, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все-еще способен к связыванию антигена. Взаимодействующие с гликанами антитела могут включать один или более из этих фрагментов. Для целей настоящего изобретения антитело может содержать вариабельный домен тяжелой и легкой цепи, а также Fc-область.

Антигенсвязывающая область: используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая область" означает часть антитела, фрагмента антитела или родственной молекулы, которая непо-

средственно взаимодействует с молекулой-мишенью или эпитопом. Антигенсвязывающие области, как правило, содержат пару вариабельных доменов, как в области Fab антитела или как связанные вместе области в scFv.

Примерно: используемый в настоящем документе термин "примерно", или "около", применительно к одному или более интересующим значениям, означает величину, которая сходна с указанной эталонной величиной. В конкретных вариантах осуществления термин "примерно", или "около", означает диапазон величин, которые находятся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее, в любом направлении (больше или меньше) от указанной эталонной величины, если нет иных указаний или иное не следует из контекста (исключение составляет число, которое превысило бы 100% от возможного значения).

Связанные с: используемые в настоящем документе термины "связанные с", "конъюгированные", "связанные", "присоединенные" и "привязанные" применительно к двум или более фрагментам означают, что фрагменты физически связаны или соединены между собой, либо непосредственно, либо через один или более дополнительных фрагментов, которые служат связывающими фрагментами, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, чтобы фрагменты оставались физически связанными в условиях, в которых используют структуру, например, физиологических условиях. "Связывание" не обязательно должно происходить строго посредством прямого ковалентного химического связывания. Также может подразумеваться образование ионных или водородных связей, или связывание на основе гибридизации, достаточно стабильное, чтобы "связанные" фрагменты оставались физически связанными.

Бифункциональные: используемый в настоящем документе термин "бифункциональные" относится к любым веществам, молекулам или фрагментам, которые способны выполнять, или сохранять, по меньшей мере две функции. Функции могут приводить к одному и тому же результату, или к разным результатам. Структуры, обеспечивающие функции, могут быть одинаковыми или разными.

Биомолекула: используемый в настоящем документе термин "биомолекула" означает любую природную молекулу на основе аминокислот, на основе нуклеиновых кислот, на основе углеводов или на основе липидов, и тому подобное.

Биспецифическое антитело: используемый в настоящем документе термин "биспецифическое антитело" означает антитело, способное связывать два разных антигена. Такие антитела, как правило, содержат области из по меньшей мере двух разных антител. Биспецифические антитела могут включать любые из антител, описанных в публикациях Riethmuller, G. 2012. Cancer Immunity. 12:12-18, Marvin, J.S. et al., 2005. Acta Pharmacologica Sinica. 26(6):649-58 и Schaefer, W. et al., 2011. PNAS. 108(27): 11187-92, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Ветвь: используемый в настоящем документе термин "ветвь" означает молекулу, фрагмент или придаток, который связан, или отходит от основной молекулы или источника. В некоторых вариантах осуществления "ответвленная цепь" или "ответвляющаяся цепь" содержит один или более остатков (включая, но без ограничения, сахарные остатки), которые отходят от родительской цепи. Используемый в настоящем документе термин "родительская цепь", как правило, означает цепь остатков (включая, но без ограничения, сахарные остатки), с которой связана ответвляющаяся цепь. В случае гликана с несколькими цепями, родительская цепь также может быть названа исходной цепью, с которой все такие ветви прямо или косвенно связаны. В случае полисахарида, имеющего цепь из остатков гексозы, связи в родительской цепи, как правило, имеют место между атомами углерода 1 и 4 соседних остатков, при этом ответвляющиеся цепи связаны с родительской цепью связью между атомом углерода 1 ответвляющегося остатка и атомом углерода 3 остатка родительской цепи, от которой отходит ветвь. Используемый в настоящем документе термин "ответвляющийся остаток" относится к остатку, присоединенному к родительской цепи в разветвленной цепи.

Раковые стволовые клетки: используемый в настоящем документе термин "раковые стволовые клетки (CSC)" означает подгруппу опухолевых клеток, обладающих способностью к самообновлению. CSC могут быть способны регенерировать клетки разных типов. В некоторых случаях эти клетки сложно или невозможно удалить путем хирургического или химического воздействия на опухоль.

Соединение: используемый в настоящем документе термин "соединение" означает отдельную химическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления конкретное соединение может существовать в одной или более изомерных или изотопных формах (включая, но без ограничения, стереоизомеры, геометрические изомеры и изотопы). В некоторых вариантах осуществления соединение предоставляют или используют только в одной такой форме. В некоторых вариантах осуществления соединение предоставляют или используют в виде смеси двух или более таких форм (включая, но без ограничения, рацемическую смесь стереоизомеров). Специалисты в данной области понимают, что некоторые соединения существуют в различных таких формах, проявляют разные свойства и/или виды активности (включая, но без ограничения, виды биологической активности). В таких случаях специалист в данной области может выбирать, или избегать, конкретные формы соединения для использования по настоящему изобретению. Например, соединения, содержащие асимметрично замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. Способы получения оптически активных форм из опти-

чески активных исходных материалов известны в данной области, например, путем разделения рацемических смесей или путем стереоселективного синтеза.

Циклические или циклизованные: используемый в настоящем документе термин "циклические" означает наличие замкнутой петли. Циклические молекулы не обязательно должны быть кольцевыми, лишь связанными, с образованием неразрывной цепи из субъединиц.

Гидроксилаза цитидин-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты.

Используемый в настоящем документе термин "гидроксилаза цитидин-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты" или "CMAH" означает фермент, отсутствующий у человека, но имеющийся у большинства других млекопитающих (включая, но без ограничения, мышей, свиней и шимпанзе), который катализирует образование N-гликолилнейраминовой кислоты из N-ацетилнейраминовой кислоты. Отсутствие этого фермента у человека является следствием мутации со сдвигом рамки, приводящей к преждевременной терминации транскрипта CMAH и продуцированию нефункционального белка.

Цитотоксическое: используемый в настоящем документе термин "цитотоксическое" относится к средству, которое уничтожает или оказывает повреждающее, токсическое или губительное действие на клетку (например, клетку млекопитающего (например, клетку человека)), бактерию, вирус, грибок, простейшее, паразита, прион или их сочетание.

Доставка: используемый в настоящем документе термин "доставка" означает действие или способ для переноса соединения, вещества, молекулы, фрагмента, груза или полезной нагрузки в намеченный участок.

Средство доставки: используемый в настоящем документе термин "средство доставки" означает любое вещество, которое облегчает, по меньшей мере частично, in vivo доставку соединения, вещества, молекулы, фрагмента, груза или полезной нагрузки.

Детектируемая метка: используемый в настоящем документе термин "детектируемая метка" означает один или более маркеров, сигналов или фрагментов, которые присоединены, встроены или связаны с другой молекулой, при этом маркеры, сигналы или фрагменты могут быть с легкостью обнаружены способами, известными в данной области, включая рентгеноскопию, флуоресценцию, хемилюминесценцию, ферментативную активность, поглощение и тому подобное. Детектируемые метки включают радиоактивные изотопы, флуорофоры, хромофоры, ферменты, красители, ионы металлов, лиганды, такие как биотин, авидин, стрептавидин и гаптены, квантовые точки и тому подобное. Детектируемые метки могут находиться в любом положении в молекуле, с которой они соединены, встроены или связаны. Например, в случае присоединения, встраивания или связывания с пептидом или белком они могут находиться в составе аминокислот, пептидов или белков, или расположены на N- или C-конце.

Библиотека дисплея: используемый в настоящем документе термин "библиотека дисплея" означает инструмент, используемый в научных исследованиях для идентификации биомолекулярных взаимодействий. Существуют различные вариации библиотек дисплея, которые включают использование бактериофагов, дрожжей и рибосом. В каждом случае белки в конкретной библиотеке (в настоящем документе также называемые "члены библиотеки") связаны (физически или за счет связи с хозяином) с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок. Когда молекулу-мишень инкубируют с членами библиотеки дисплея, любые члены библиотеки, которые связываются с мишенью, могут быть выделены, и последовательности, кодирующие связанный белок, могут быть определены путем анализа связанной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления библиотеки дисплея представляют собой "библиотеки фагового дисплея", в этом случае библиотека дисплея получена из вирусных частиц бактериофага (в настоящем документе также называемых "фаговые частицы"), при этом нуклеиновые кислоты были включены в фаговый геном, что приводит к продуцированию белков вирусной оболочки, слитых с белками, кодируемыми введенными нуклеиновыми кислотами. Такие слитые белки экспонируются на внешней поверхности собранных фаговых частиц, где они могут взаимодействовать с конкретной мишенью.

Дистальный: используемый в настоящем документе термин "дистальный" означает расположенный вдали от центра, либо вдали от интересующей точки или области.

Рекомбинантные: в настоящем документе варианты осуществления изобретения являются "рекомбинантными", если они спроектированы, чтобы иметь качество или свойство, структурное или химическое, отличающееся от такового у исходной, дикого типа или природной молекулы. Таким образом, рекомбинантными средствами или молекулами являются такие, проектирование и/или продуцирование которых включает манипуляции, произведенные рукой человека.

Эпитоп: используемый в настоящем документе термин "эпитоп" означает поверхность или область на молекуле, способную взаимодействовать с компонентами иммунной системы, включая, но без ограничения, антитела. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может включать сайт-мишень. Эпитопы могут включать область на антигене, или между двумя или более антигенами, которая специфически узнается и связывается соответствующим антителом. Некоторые эпитопы могут включать один или более сахарных остатков по всей длине одного или более гликанов. Такие эпитопы могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10 сахарных остатков. Эпитопы также могут включать одну или более областей взаимодействия между молекулами. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут

включать область соединения между двумя сахарными остатками, между ответвляющейся цепью и родительской цепью, или между гликаном и белком.

Эфирная связь: используемый в настоящем документе термин "эфирная связь" означает химическую связь, которая включает атом кислорода, связанный между двумя атомами углерода. В некоторых вариантах осуществления эфирные связи связывают сахарные остатки с другими фрагментами, включая, но без ограничения, другие сахарные остатки, с образованием цепи гликана. Такие связи также называют "гликозидными связями" или "гликозидными мостами". В контексте по меньшей мере одного сахарного остатка термины "связь" и/или "мост" также используют в настоящем документе применительно к гликозидной связи. В некоторых вариантах осуществления мосты могут связывать гликаны с другими молекулами, включая, но без ограничения, белки, липиды, фосфолипиды и сфинголипиды. В некоторых вариантах осуществления сахарные остатки могут быть связаны с белком, как правило, с образованием связи между сахарным остатком и аминокислотным остатком. Такие аминокислотные остатки включают серин и треонин. В некоторых вариантах осуществления эфирные связи связывают гликаны с гликановой матрицей при помощи углеводного линкера, который участвует в образовании связи. Гликозидные связи могут отличаться по своим стереохимическим свойствам. В некоторых вариантах осуществления альфа-ориентированные гликозидные связи (в настоящем документе также называемые "альфа-связи") приводят к аксиальной ориентации между связанным атомом кислорода эфирной связи и циклогексановым кольцом сахарного остатка. В некоторых вариантах осуществления бета-ориентированные гликозидные связи (в настоящем документе также называемые "бета-связи") приводят к экваториальной ориентации между связанным атомом кислорода эфирной связи и циклогексановым кольцом сахарного остатка.

Экспрессия: используемый в настоящем документе термин "экспрессия нуклеотидной последовательности" означает одно или более из следующих событий: (1) продуцирование РНК-матрицы с последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинг РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или 3'-концевого процессинга); (3) трансляцию РНК в полипептид или белок; (4) укладку полипептида или белка; и (5) посттрансляционную модификацию полипептида или белка.

Признак: используемый в настоящем документе термин "признак" означает характеристику, свойство или характерный элемент.

Препарат: используемый в настоящем документе термин "препарат" означает материал, или смесь, получаемый в соответствии с формулой, который может включать по меньшей мере одно антитело, соединение, вещество, молекулу, фрагмент, груз или полезную нагрузку и средство доставки, носитель или эксципиент.

Функциональные: используемый в настоящем документе термин "функциональная" биологическая молекула означает биологическую молекулу, имеющую структуру и форму, в которой она проявляет свойство и/или активность, по которым ее характеризуют. Используемый в настоящем документе термин "функциональная группа", или "химическая группа", означает характерную группу атомов или химических связей, которые являются частью большей по размеру молекулы. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы могут быть связаны с разными молекулами, но могут участвовать в аналогичных химических реакциях независимо от молекулы, частью которой они являются. Распространенные функциональные группы включают, но без ограничения, карбоксильные группы (-COOH), ацетильные группы (-COH), аминогруппы ($-NH_2$), метальные группы ($-CH_3$), сульфатные группы ($-SO_3H$) и ацильные группы. В некоторых вариантах осуществления добавление одной или более функциональных групп к молекуле может быть описано с использованием терминов, которые изменяют название функциональной группы за счет окончания "-илированный", например ацетилированный, метилированный и сульфатированный.

Гликан: в настоящем документе термины "гликан", "олигосахарид" и "полисахарид" используются взаимозаменяемо и означают полимеры, составленные из сахарных мономеров, как правило, связанных гликозидными связями, в настоящем документе также называемыми связями. В некоторых вариантах осуществления термины "гликан", "олигосахарид" и "полисахарид" могут быть использованы для обозначения углеводной части гликоконъюгата (например, гликопротеина, гликолипида или протеогликана).

Гликановая цепь: используемый в настоящем документе термин "гликановая цепь" означает сахарный полимер, содержащий два или более сахаров. В некоторых вариантах осуществления гликановые цепи ковалентно связаны с белками через остатки серина или треонина белка.

Богатая гликанами композиция: используемый в настоящем документе термин "богатая гликанами композиция" означает смесь, содержащую большую процентную долю гликанов. В некоторых вариантах осуществления гликаны в составе богатой гликанами композиции могут составлять от примерно 1% до примерно 10%, от примерно 5% до примерно 15%, от примерно 20% до примерно 40%, от примерно 30% до примерно 50%, от примерно 60% до примерно 80%, от примерно 70% до примерно 90% или по меньшей мере 100% в расчете на общую массу композиции.

Гликозидная связь: используемый в настоящем документе термин "гликозидная связь" означает ковалентную связь, образованную между углеводом и другой химической группой. В некоторых вариантах осуществления гликозидные связи образованы между восстанавливающим концом одной молекулы са-

хара и не восстанавливающим концом второй молекулы сахара или полисахаридной цепи. Такие гликозидные связи также известны как О-гликозидные связи из-за присутствия атома кислорода (или эфирной связи) между связанными сахарами. В некоторых вариантах осуществления гликозидная связь между двумя сахарами или между сахаром и линкером также может быть названа "мостом".

In vitro: используемый в настоящем документе термин "in vitro" относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток, в чашке Петри и так далее, а не в организме (например, животном, растении или микроорганизме).

In vivo: используемый в настоящем документе термин "in vivo" относится к событиям, которые происходят в организме (например, животном, растении или микроорганизме, либо в их клетках или тканях).

Выделенные: используемый в настоящем документе термин "выделенный" является синонимом термина "отделенный", однако при этом подразумевается, что отделение было произведено рукой человека. В одном варианте осуществления выделенное вещество или молекула представляет собой вещество или молекулу, которые были отделены от по меньшей мере некоторых из компонентов, с которыми они ранее были ассоциированы (либо в природе, либо в экспериментальных условиях). Выделенные вещества могут иметь разную степень чистоты относительно соединений, с которыми они ранее были ассоциированы. Выделенные вещества и/или молекулы могут быть отделены от по меньшей мере примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, или более, других компонентов, с которыми они исходно были ассоциированы. В некоторых вариантах осуществления выделенные вещества имеют чистоту более примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более примерно 99%. При использовании в настоящем документе вещество является "чистым", если оно практически свободно от других компонентов.

Набор: используемый в настоящем документе термин "набор" означает набор, включающий один или более компонентов, предназначенных для совместного использования, и инструкцию по их применению.

Нокаутный. В настоящем документе термин "нокаутный" используют применительно к организму, в котором существующий ген был инактивирован за счет манипуляций, произведенных человеком. В нокаутном организме про ген, который был инактивирован, говорят, что он был подвергнут "нокауту". В некоторых вариантах осуществления нокаутный ген может быть инактивирован за счет вставки нуклеотидной последовательности в ген или за счет полной замены гена.

Линкер. Используемый в настоящем документе термин "линкер" означает фрагмент, которые соединяет два или более доменов, фрагментов или молекул. В одном варианте осуществления линкер может содержать 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более атомов. В следующем варианте осуществления линкер может содержать группу атомов, например, 10-1000 атомов. Такие атомы или их группы могут включать, но без ограничения, углерод, амино, алкиламино, кислород, серу, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. В некоторых вариантах осуществления линкер может включать аминокислоту, пептид, полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, связанный линкером, может включать, но не ограничивается ими, атом, химическую группу, нуклеозид, нуклеотид, нуклеиновое основание, сахар, нуклеиновую кислоту, аминокислоту, пептид, полипептид, белок, белковый комплекс, полезную нагрузку (например, лекарственное средство) или маркер (включая, но без ограничения, химический, флуоресцентный, радиоактивный или биолюминесцентный маркер). Линкер может быть использован для любой полезной цели, например, для получения мультимеров или конъюгатов, а также для введения полезной нагрузки, как описано в настоящем документе. Примеры химических групп, которые могут быть включены в линкер, включают, но без ограничения, алкил, алкенил, алкинил, амидо, амино, эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероциклил, каждый из которых может быть, необязательно, замещенным, как описано в настоящем документе. Примеры линкеров включают, но без ограничения, ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные единицы этилена или пропиленгликоля, например, диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль или тетраэтиленгликоль) и декстрановые полимеры. Другие примеры включают, но без ограничения, расщепляемые фрагменты в линкере, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азотная связь (-N=N-), которые могут быть расщеплены при помощи восстанавливающего реагента или фотолиза. Неограничивающие примеры избирательно расщепляемых связей включают амидную связь, которая может быть расщеплена, например, за счет использования трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) или других восстанавливающих реагентов, и/или фотолиза, а также сложноэфирную связь, которая может быть расщеплена, например, при помощи кислотного или щелочного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой углеводный фрагмент, используемый для связывания гликанов с субстратом, таким как гликановая матрица. Такие углеводные линкеры включают, но без ограничения, $-O(CH_2)_2CH_2HN_2$ и $-O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$.

мРНК: используемый в настоящем документе термин "мРНК" означает матричную РНК, образующуюся в результате транскрипции гена и процессинга созданного транскрипта. В некоторых вариантах

осуществления мРНК, которая покинула ядро клетки, может быть экстрагирована из клетки или группы клеток и проанализирована для определения того, какие гены были транскрибированы в конкретное время или при конкретном наборе условий.

Муцин: используемый в настоящем документе термин "муцин" относится к семейству белков, которые являются в высокой степени гликозилированными. В некоторых вариантах осуществления муцины продуцируются подчелюстными железами и присутствуют в слюне и слизистом секрете.

Негативная селекция: используемый в настоящем документе термин "негативная селекция" означает селекцию членов библиотеки из библиотеки дисплея на основании их способности связывать молекулы и/или компоненты композиции, которые не включают антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления негативную селекцию используют до проведения позитивной селекции для удаления элементов, которые могут неспецифически связываться с мишенью.

Нецелевой: используемый в настоящем документе термин "нецелевой" относится к любому непреднамеренному эффекту на одну или более мишеней, генов или клеточных транскриптов.

Пациент: используемый в настоящем документе термин "пациент" означает субъекта, которому желательно, или необходимо, лечение, требуется лечение, который получает лечение, будет получать лечение, или субъекта, который находится под наблюдением квалифицированного (например, лицензированного) профессионала по поводу конкретного заболевания или состояния.

Пептид: используемый в настоящем документе термин "пептид" означает белок или полипептид, который имеет длину менее, или ровно, 50 аминокислот, например, длину примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Фармацевтически приемлемые: используемое в настоящем документе выражение "фармацевтически приемлемые" относится к таким соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, согласно здравому медицинскому суждению, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без вызывания избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции, либо других проблем и осложнений, в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты: используемое в настоящем документе выражение "фармацевтически приемлемый эксципиент" означает любой ингредиент, отличный от активных средств (например, описанных в настоящем документе), присутствующий в фармацевтической композиции и являющийся практически нетоксичным и не вызывающим воспаление у пациента. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой среду, в которой может быть суспендировано или растворено активное средство. Эксципиенты могут включать, например: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, дезинтегрирующие средства, красители (красящие вещества), смягчающие средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), образующие пленку или покрытие вещества, вкусо-ароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (вещества, препятствующие слеживанию и комкованию), смазывающие средства, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и воду для гидратации. Иллюстративные эксципиенты включают, но без ограничения: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кроскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинил пальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натриевую соль гликолята крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин A, витамин E, витамин C и ксилит.

Фармацевтически приемлемые соли: Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в настоящем документе, представляют собой формы описанных соединений, в которых кислотный или основной фрагмент находится в его солевой форме (например, которую получают путем реакции группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, соли минеральных или органических кислот с основными соединениями, такими как амины; соли щелочей или органических оснований с кислотными соединениями, такими как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерат, и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичных катионов аммония, четвертичного аммония и амина, в том числе, но без ограничения, аммония, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламина, диметиламина, три-

метиламина, триэтиламина, этиламина, и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли включают общепринятые нетоксичные соли, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемую соль получают из исходного соединения, содержащего основной или кислотный фрагмент, общепринятыми химическими методами. Как правило, такие соли могут быть получены путем реакции форм свободной кислоты или основания этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в смеси из них; как правило, предпочтительной является неводная среда, такая как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Список соответствующих солей можно найти в публикациях Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Фармацевтически приемлемый сольват: используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый сольват" означает кристаллическую форму соединения, в которой молекулы соответствующего растворителя встроены в кристаллическую решетку. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации или осаждения из раствора, содержащего органические растворители, воду, или их смесь. Примерами соответствующих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), N-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), NN'-диметилформамид (DMF), NN'-диметилацетамид (DMAC), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (DMPU), ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат, и тому подобное. Если растворителем является вода, сольват называют "гидратом". В некоторых вариантах осуществления растворитель, включенный в сольват, является таким, или находится на таком уровне, который физиологически переносится организмом, которому вводят сольват (например, в стандартной лекарственной форме фармацевтической композиции).

Фармакокинетические: используемый в настоящем документе термин "фармакокинетические" относится к любому одному или более свойствам молекулы или соединения, которые связаны с определением судьбы веществ, введенных в живой организм. Фармакокинетические свойства разделяют на несколько областей, включая степень и скорость абсорбции, распределение, метаболизм и экскрецию. Обычно используют аббревиатуру ADME, где (A) абсорбция представляет собой процесс проникновения вещества в кровоток; (D) распределение представляет собой диспергирование или рассеивание веществ по жидкостям и тканям организма; (M) метаболизм (или биотрансформация) представляет собой необратимую трансформацию исходного соединения в дочерние метаболиты; и (E) экскреция (или элиминация) представляет собой элиминацию веществ из организма. В редких случаях некоторые лекарственные средства необратимо накапливаются в тканях организма.

Физико-химические: используемый в настоящем документе термин "физико-химические" означает физические и/или химические свойства.

Позитивная селекция: используемый в настоящем документе термин "позитивная селекция" означает селекцию конкретного элемента из группы индивидуальных элементов. Такие элементы и их группы могут представлять собой, например, антитела. В некоторых случаях они могут представлять собой фрагменты антител или фрагменты антител, экспрессируемые в ассоциации со средством, способным экспрессировать такие фрагменты (например, членами библиотеки из библиотеки дисплея). Селекция может быть основана на способности отбираемых элементов связываться с желательной мишенью или эпитопом. В некоторых вариантах осуществления позитивная селекция может быть использована с библиотекой дисплея для идентификации фаговых частиц, экспрессирующих scFv, которые связываются с желательной мишенью. В других вариантах осуществления позитивная селекция может представлять собой селекцию антител-кандидатов из пула антител. В других случаях элементы могут представлять собой клетки, линии клеток или клоны, например, при селекции клонов для отбора гибридом. В таких случаях позитивная селекция может представлять собой клональную селекцию, основанную на одном или более признаков антител (например, специфичности в отношении одного или более нужных эпитопов), проявляемых такими клонами. В некоторых случаях нужные эпитопы в способах позитивной селекции могут включать STn (например, AcSTn и/или GcSTn).

Напротив, используемый в настоящем документе термин "негативная селекция" включает те же принципы и примеры, описанные для позитивной селекции, но при этом определяющую характеристику используют для удаления нежелательных элементов из группы индивидуальных элементов.

Предотвращение: используемый в настоящем документе термин "предотвращение" означает частичную или полную отсрочку начала возникновения инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичную или полную отсрочку начала возникновения одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичную или полную отсрочку начала возникновения одного или более симптомов, признаков или проявлений конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния; частичную или полную отсрочку прогрессирования инфекции, конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; и/или уменьшение рис-

ка развития патологии, связанной с инфекцией, заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Пролекарство: настоящее изобретение также включает пролекарства соединений, описанных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "пролекарства" означает любое вещество, молекулу или элемент, которые находятся в форме предшественника для данного вещества, молекулы или элемента, терапевтическое действие которых будет иметь место после химического или физического изменения. Пролекарства могут быть ковалентно связаны или секвестрированы определенным образом и высвобождаются или превращаются в активное лекарственное средство до, в процессе или после введения субъекту-млекопитающему. Пролекарства могут быть получены путем модификации функциональных групп, имеющихся в соединениях, таким образом, что происходит расщепление модифицированных групп либо в процессе обычных манипуляций, либо in vivo, с образованием исходных соединений. Пролекарства включают соединения, в которых гидроксильные, амино, сульфгидрильные или карбоксильные группы связаны с какой-либо группой, которая при введении субъекту-млекопитающему отщепляется, с образованием гидроксильной, амино, сульфгидрильной или карбоксильной группы, соответственно. Получение и использование пролекарств описано в публикациях T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, и Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Проксимальный: используемый в настоящем документе термин "проксимальный" означает расположенный вблизи от центра, либо от интересующей точки или области.

Область взаимодействия: используемый в настоящем документе термин "область взаимодействия" означает область, в которой два или более элементов взаимодействуют или перекрываются. В некоторых вариантах осуществления область взаимодействия может включать один или более сахарных остатков вдоль гликановой цепи, которые контактируют со второй гликановой цепью. В некоторых вариантах осуществления гликановые цепи представляют собой цепи, ответвляющиеся от одной и той же родительской цепи. В некоторых вариантах осуществления область взаимодействия может находиться между двумя гликановыми цепями, при этом одна цепь представляет собой ответвляющуюся цепь, а вторая цепь представляет собой родительскую цепь. В случае гликановых цепей области взаимодействия могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10 сахарных остатков. В некоторых вариантах осуществления области взаимодействия также могут находиться между гликанами и белками или между гликанами и липидами.

Остаток: используемый в настоящем документе термин "остаток" означает мономер, связанный с, или способный быть связанным с, полимером. В некоторых вариантах осуществления остатки включают молекулы сахаров, включая, но без ограничения, глюкозу, галактозу, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловые кислоты. В некоторых вариантах осуществления остатки включают аминокислоты.

Образец: используемый в настоящем документе термин "образец" означает аликвоту или часть, отобранную из источника и/или предоставленную для анализа или обработки. В некоторых вариантах осуществления образец получен из биологического источника (в настоящем документе также называемый "биологический образец"), такого как ткань, клетка или компонент (например, жидкость организма, включая, но без ограничения, кровь, плазму, сыворотку, слизистый секрет, лимфатическую жидкость, синовиальную жидкость, цереброспинальную жидкость, слюну, амниотическую жидкость, амниотическую пуповинную кровь, мочу, вагинальную жидкость и семенную жидкость). В некоторых вариантах осуществления образец может представлять собой, или включать, гомогенат, лизат или экстракт, полученный из цельного организма или подгруппы его тканей, клеток или компонентов, либо его фракцию или часть, включая, но без ограничения, например, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, лимфатическую жидкость, внешние секреты кожи, жидкость из дыхательных путей, кишечника и мочеполовых путей, слезы, слюну, молоко, клетки крови, опухоли, органы. В некоторых вариантах осуществления образец включает среду, такую как питательный бульон или гель, которая может содержать клеточные компоненты, такие как белки или молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления "первичный" образец представляет собой аликвоту из источника. В некоторых вариантах осуществления первичный образец подвергают одной или более стадиям обработки (например, разделению, очистке и так далее) для получения образца для анализа или другого применения.

Сиалил: используемый в настоящем документе префикс "сиалил", а также термин "сталированный" относятся к соединениям, содержащим сиаловую кислоту.

Единичная стандартная доза: используемый в настоящем документе термин "единичная стандартная доза" означает дозу какого-либо терапевтического средства, введенную в одной дозе/в один момент времени/одним путем введения/в одну точку контакта, то есть во время одного события введения. В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная доза предоставлена в виде дискретной лекарственной формы (например, таблетки, капсулы, пластыря, заполненного шприца, ампулы и так далее).

Разделенная доза: используемый в настоящем документе термин "разделенная доза" означает разделение единичной стандартной дозы или общей суточной дозы на две или более доз.

Стабильные: используемый в настоящем документе термин "стабильные" относится к соединению

или элементу, которые обладают достаточной прочностью для сохранения при выделении до достаточной для использования степени чистоты из реакционной смеси, и предпочтительно, способные быть сформулированными в эффективное лекарственное средство.

Стабилизированные: используемые в настоящем документе термины "стабилизировать", "стабилизированные", "стабилизированная область" относятся к приданию, или приобретению, стабильности. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряют относительно абсолютной величины. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряют относительно эталонного соединения или элемента.

Стандартное лечение: используемое в настоящем документе выражение "стандартное лечение" относится к способам терапевтического лечения, согласующимся со способами, которые практикуют большинство специалистов при проведении такого лечения.

Субъект: используемый в настоящем документе термин "субъект", или "пациент", относится к любому организму, которому может быть введена композиция по изобретению, например, с целью эксперимента, диагностики, профилактики и/или терапии. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы и люди) и/или растения.

Подчелюстные железы: используемый в настоящем документе термин "подчелюстные железы", или "поднижнечелюстные железы", означает продуцирующие слизистый секрет железы, расположенные под дном полости рта. Эти железы способны продуцировать муцины и, в некоторых вариантах осуществления, могут быть извлечены из млекопитающих в качестве источника муцина.

Страдающий от: индивидуум, "страдающий от" заболевания, нарушения и/или состояния, был диагностирован или имеет один или более симптомов заболевания, нарушения и/или состояния.

Подверженный: индивидуум, "подверженный" заболеванию, нарушению и/или состоянию, не был диагностирован и/или может не иметь симптомы заболевания, нарушения и/или состояния, но имеет предрасположенность к развитию заболевания или его симптомов. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, подверженный заболеванию, нарушению и/или состоянию (например, раку), может быть охарактеризован наличием одного или более из следующего: (1) генетическая мутация, связанная с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (2) генетический полиморфизм, связанный с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (3) повышенная и/или сниженная экспрессия и/или активность белка и/или нуклеиновой кислоты, связанных с заболеванием, нарушением и/или состоянием; (4) привычки и/или стиль жизни, связанный с развитием заболевания, нарушения и/или состояния; (5) заболевание, нарушение и/или состояние в семейном анамнезе; и (6) воздействие и/или инфицирование микроорганизмом, связанным с развитием заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, подверженного заболеванию, нарушению и/или состоянию, будет развиваться заболевание, нарушение и/или состояние. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, подверженного заболеванию, нарушению и/или состоянию, не будет развиваться заболевание, нарушение и/или состояние.

Синтетический: термин "синтетический" означает произведенный, полученный и/или изготовленный человеком. Синтез полинуклеотидов или полипептидов, или других молекул по настоящему изобретению может быть химическим или ферментативным.

Мишень: используемый в настоящем документе термин "мишень" относится к объекту или элементу, в отношении которого будет произведено действие. В некоторых вариантах осуществления мишенями называют антигены, которые будут использованы для получения антител, специфически связывающих антигены.

Скрининг мишенью. Используемый в настоящем документе термин "скрининг мишенью" означает использование вещества-мишени для идентификации партнеров по связыванию для данного вещества.

Сайт-мишень: используемый в настоящем документе термин "сайт-мишень" означает область на, или в, одном или более гликанах, гликопротеинах, биомолекулах и/или биоструктурах на, или в, клетке, внеклеточном пространстве, ткани, органе и/или организме, которую узнает связывающее вещество или эффекторная молекула (например, антитело). В некоторых вариантах осуществления гликановые сайты-мишени могут находиться исключительно на одном сахарном остатке, могут быть образованы двумя или более остатками, или могут включать как гликановые, так и не гликановые компоненты. В некоторых вариантах осуществления сайты-мишени образованы между двумя или более гликанами или гликопротеинами. В некоторых вариантах осуществления сайты-мишени образованы между ответвляющимися цепями одного и того же гликана, или между одной или более ответвляющимися цепями и родительской цепью.

Клетки мишени: используемый в настоящем документе термин "клетки-мишени" означает одну или более интересующих клеток. Клетки могут находиться in vitro, in vivo, in situ, либо в ткани или органе какого-либо организма. Организм может представлять собой животное, млекопитающее или человека (например, пациента-человека).

Концевой остаток: используемый в настоящем документе термин "концевой остаток" означает последний остаток в полимерной цепи. В некоторых вариантах осуществления концевые остатки представляют собой сахарные остатки, расположенные на не восстанавливающем конце полисахаридной цепи.

Терапевтические: используемый в настоящем документе термин "терапевтические" относится к любому веществу или процедуре, которые используют для лечения заболевания, нарушения или состояния. Например, терапевтическое лечение означает любое лечение, используемое для устранения заболевания, нарушения или состояния.

Терапевтическое средство: термин "терапевтическое средство" означает любое вещество, которое при введении субъекту производит терапевтический, диагностический и/или профилактический эффект, и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект.

Терапевтически эффективное количество: используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" означает количество доставляемого средства (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства, профилактического средства и так далее), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему от, или подверженному, инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния, для лечения, ослабления симптомов, диагностирования, предотвращения и/или отсрочки начала развития инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество предоставляют в однократной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вводят в режиме дозирования, который включает введение нескольких доз. Специалисты в данной области понимают, что в некоторых вариантах осуществления стандартную лекарственную форму можно считать содержащей терапевтически эффективное количество конкретного средства или элемента, если она содержит количество, которое является эффективным при введении в виде части такого режима дозирования.

Терапевтически эффективный результат: используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективный результат" означает результат, который является достаточным в случае субъекта, страдающего от, или подверженного, инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния, для лечения, ослабления симптомов, диагностирования, предотвращения и/или отсрочки начала развития инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния.

Общая суточная доза: используемый в настоящем документе термин "общая суточная доза" означает количество, вводимое или предписанное для введения в течение 24-часового периода времени. Оно может быть введено в виде единичной стандартной дозы.

Трансгенный: используемый в настоящем документе термин "трансгенный" относится к организму, который содержит один или более генов, введенных в геном организма, которые естественным образом отсутствуют у данного организма.

Лечение: используемый в настоящем документе термин "лечение" означает частичное или полное смягчение, исцеление, ослабление, улучшение, облегчение, отсрочку начала развития, ингибирование прогрессирования, уменьшение степени тяжести и/или уменьшение частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретной инфекции, заболевания, нарушения и/или состояния. Например, "лечение" рака может означать ингибирование выживания, роста и/или распространения опухоли. Лечение может быть применено к субъекту, который не имеет признаки заболевания, нарушения и/или состояния, и/или к субъекту, который имеет лишь ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния, с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Вариабельная область. Используемый в настоящем документе термин "вариабельная область", или "вариабельный домен", относится к специфическим доменам антитела, сильно отличающимся по последовательностям у разных антител, которые участвуют в связывании и определении специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена.

Цельные IgG: используемый в настоящем документе термин "цельные IgG" означает целые молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления целые молекулы IgG содержат области, естественным образом имеющиеся у двух или более других организмов.

Дикого типа: используемый в настоящем документе термин "дикого типа" относится к организму, который имеет природный геном (не имеет гены из других организмов).

I. Соединения и композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, а также композициям, включающим по меньшей мере одно взаимодействующее с гликанами антитело. В гликане все моносахаридные мономеры могут быть одинаковыми или могут отличаться. Обычные мономеры включают, но без ограничения, триозы, тетрозы, пентозы, глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, ликсозу, аллозу, альтрозу, маннозу, гулозу, йодозу, рибозу, манногептулозу, седогептулозу и талозу. Аминосахара также могут быть мономерами в гликане. Гликаны, содержащие такие сахара, в настоящем документе называют аминогликанами. В настоящем документе аминосахарами называют сахарные молекулы, которые содержат аминогруппу вместо гидроксильной группы или, в некоторых вариантах осуществления, сахар, производный от такого сахара. Примеры аминосахара включают, но без ограничения, глюкозамин, галактозамин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловые кислоты (включая, но без ограничения, N-ацетилнейраминовую кислоту и N-гликолилнейраминовую кислоту) и L-даунозамин.

Используемый в настоящем документе термин "взаимодействующее с гликанами антитело" означает антитело, которое может взаимодействовать с гликановым фрагментом. Такие антитела могут связываться с отдельным гликановым фрагментом, с несколькими гликановыми фрагментами или с эпитопами, которые включают как гликан, так и не гликановые компоненты. Не гликановые компоненты могут включать, но без ограничения, белки, связанные с белками фрагменты (например, посттрансляционные модификации), клетки и связанные с клетками молекулы/структуры. Взаимодействующие с гликанами антитела могут связывать, изменять, активировать, ингибировать, стабилизировать, разрушать и/или модулировать гликан или гликан-связанную молекулу или элемент. За счет этого взаимодействующие с гликанами антитела могут действовать в качестве терапевтической, либо паллиативной, профилактической, либо лечебной композиции. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела могут включать конъюгаты или сочетания с другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела направлены против гликанов, имеющих один или более аминосахаров. В следующем варианте осуществления один или более аминосахаров представляют собой сиаловую кислоту. В следующем варианте осуществления одна или более сиаловых кислот представляют собой N-ацетилнейраминовую кислоту и/или N-гликолилнейраминовую кислоту.

Антитела.

Взаимодействующие с гликанами антитела могут включать целые антитела или их фрагменты. В настоящем документе термин "антитело" используется в самом широком смысле и конкретно охватывает различные форматы, включая, но без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, образованные из по меньшей мере двух интактных антител), конъюгаты антител (включая, но без ограничения, конъюгаты антитело-лекарственное средство), варианты антител [включая, но без ограничения, миметики антител, химерные антитела (например, антитела с аминокислотными последовательностями из более чем одного биологического вида) и синтетические варианты], а также фрагменты антител, при условии, что они обладают нужной биологической активностью (например, активностью связывания, активации, ингибирования, стабилизации, разрушения и/или модулирования одной или более мишеней). Антитела, прежде всего, являются молекулами на основе аминокислот, но также могут иметь одну или более посттрансляционных или синтетических модификаций. Посттрансляционные модификации могут включать гликозилирование.

Используемый в настоящем документе термин "фрагмент антитела" означает часть интактного антитела или его слитого белка, в некоторых случаях включающую по меньшей мере одну антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv); диатела; триатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами "Fab", каждый с одним антигенсвязывающим сайтом. Также образуется остаточный фрагмент "Fc", название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к получению фрагмента $F(ab')_2$, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все-еще способен к связыванию антигена. Взаимодействующие с гликанами антитела могут включать один или более из этих фрагментов и могут, например, быть получены путем ферментативного расщепления целого антитела или в результате рекомбинантной экспрессии.

"Природные антитела", как правило, представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с массой примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, известны, и сегменты, составляющие каждый из них, хорошо охарактеризованы и описаны (Matsuda, F. et al., 1998. The Journal of Experimental Medicine. 188(11); 2151-62 и Li, A. et al., 2004. Blood. 103(12: 4602-9, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом число дисульфидных связей варьируется среди тяжелых цепей иммуноглобулинов разных изотипов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет расположенные через регулярные промежутки внутрицепочечные дисульфидные мосты. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом ее конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи.

Используемый в настоящем документе термин "вариабельный домен" относится к специфическим доменам антитела, находящимся как на тяжелой, так и на легкой, цепях антитела, которые сильно отличаются по последовательностям у разных антител, и которые участвуют в связывании и определении специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельные домены включают гипервариабельные области. Используемый в настоящем документе термин "гипервариабельная область" означает область в вариабельном домене, которая содержит аминокислотные остатки, ответственные за связывание антигена. Аминокислоты, присутствующие в гипервариабельных областях, определяют структуру определяющих комплементарность областей (CDR), которые являются частью

антигенсвязывающего сайта антитела. Используемый в настоящем документе термин "CDR" означает область антитела, которая содержит структуру, комплементарную ее антигену-мишени, или эпитопу. Другие части вариабельного домена, не взаимодействующие с антигеном, называют каркасными (FW) областями. Антигенсвязывающий сайт (также известный как рецептор антигена или паратоп) включает аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия с конкретным антигеном. Точные остатки, образующие антигенсвязывающий сайт, как правило, определяют методом кристаллография при совместной кристаллизации со связанным антигеном, однако также можно использовать компьютерные расчеты, основанные на сравнении с другими антителами (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Определение остатков, составляющих CDR, может включать использование систем нумерации, включая, но без ограничения, те, которые описаны Rabat [Wu, T.T. et al., 1970, JEM, 132(2):211-50 и Johnson, G. et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28(1): 214-8, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме], Chothia [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989) и Al-Lazikani, B. et al., 1997, J. Mol. Biol. 273(4):927-48, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме], Lefranc (Lefranc, M.P. et al., 2005, Immunome Res. 1:3) и Honegger (Honegger, A. and Pluckthun, A. 2001. J. Mol. Biol. 309(3):657-70, содержание публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Каждый из доменов VH и VL имеет по три области CDR. VL CDR в настоящем документе называют CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, в порядке их расположения в направлении от N- к C-концу вдоль полипептида вариабельного домена. VH CDR в настоящем документе называют CDR-H1, CDR- H2 и CDR-H3, в порядке их расположения в направлении от N- к C-концу вдоль полипептида вариабельного домена. Каждая из CDR имеет благоприятную каноническую структуру, за исключением CDR-H3, содержащей аминокислотные последовательности, которые могут быть сильно вариабельными по последовательности и длине у разных антител, следствием чего являются разные трехмерные структуры в антигенсвязывающих доменах (Nikoloudis, D. et al., 2014. PeerJ. 2:e456). В некоторых случаях области CDR-H3 можно анализировать среди панели родственных антител для оценки разнообразия антител. Различные способы определения последовательностей CDR известны в данной области и могут быть применены к известным последовательностям антител ((Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p. 47-54, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Используемый в настоящем документе термин "Fv" означает фрагмент антитела, который содержит минимальный фрагмент на антителе, необходимый для образования полного антигенсвязывающего сайта. Эти области состоят из димера из одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в прочной, нековалентной ассоциации. Фрагменты Fv могут быть получены путем протеолитического расщепления, однако являются очень нестабильными. В данной области известны рекомбинантные способы получения стабильных фрагментов Fv, как правило, за счет вставки гибкого линкера между вариабельным доменом легкой цепи и вариабельным доменом тяжелой цепи [с образованием одноцепочечного Fv (scFv)], или за счет введения дисульфидного моста между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46-47, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

"Легкие цепи" антитела любого из видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа и лямбда на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей антитела могут быть отнесены к разным классам. Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них также могут быть разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

Используемый в настоящем документе термин "одноцепочечный Fv", или "scFv", означает слитый белок из доменов VH и VL антитела, причем эти домены связаны между собой в одну полипептидную цепь гибким пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер полипептида Fv позволяет scFv формировать структуру, необходимую для связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления scFv используют в сочетании с фаговым дисплеем, дрожжевым дисплеем или другими способами дисплея, где они могут быть экспрессированы в ассоциации с компонентом поверхности (например, белком оболочки фага) и использованы для идентификации высокоаффинных пептидов для конкретного антигена.

Термин "диатела" означает небольшие фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, при этом фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи VH, соединенный с вариабельным доменом легкой цепи VL в одной полипептидной цепи. При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на одной цепи, домены вынужденно образуют пары с комплементарными доменами другой цепи, с образованием двух антигенсвязывающих сайтов. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Термин "интрателo" означает форму антитела, которая не секретируется из клетки, в которой она продуцируется, но вместо этого имеет в качестве мишени один или более внутриклеточных белков. Интратела могут быть использованы для оказания воздействия на многие клеточные процессы, включая, но без ограничения, внутриклеточную направленную миграцию, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, пролиферативную сигнализацию и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать терапию на основе интрател. В некоторых таких вариантах осуществления последовательности вариабельных доменов и/или последовательности CDR, раскрытые в настоящем документе, могут быть включены в один или более конструктов для терапии на основе интрател. В некоторых случаях интратела по изобретению могут быть направлены на один или более гликированных внутриклеточных белков или могут модулировать взаимодействие между одним или более гликированными внутриклеточными белками и альтернативным белком.

Используемый в настоящем документе термин "химерный антигенный рецептор", или "CAR", означает искусственные рецепторы, которые сконструированы для экспрессии на поверхности иммунных эффекторных клеток, результатом чего является специфическая направленность таких иммунных эффекторных клеток на клетки, экспрессирующие элементы, которые связывают с высокой аффинностью искусственные рецепторы. CAR могут быть сконструированы для включения одного или более сегментов антитела, вариабельного домена антитела и/или CDR антитела, так что, когда такие CAR экспрессируются на иммунных эффекторных клетках, иммунные эффекторные клетки связываются и уничтожают любые клетки, которые узнают части антитела в CAR. В некоторых случаях CAR сконструированы для специфического связывания раковых клеток, что приводит к регулируемому иммунной системой уничтожению раковых клеток.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" означает антитело, полученное из популяции практически гомогенных клеток (или клонов), то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут возникать в процессе продуцирования моноклонального антитела, такие варианты, как правило, присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), все моноклональные антитела направлены против одной детерминанты на антигене.

Определение "моноклональные" указывает на характер антитела, как полученного из практически гомогенной популяции антител, и не подразумевает необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. В настоящем документе моноклональные антитела включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного биологического вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время, как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител.

"Гуманизированные" формы не принадлежащих человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности из не принадлежащих человеку иммуноглобулинов. В основном, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в котором остатки из гипервариабельной области антитела-реципиента заменены остатками из гипервариабельной области антитела биологического вида, отличного от человека (антитело-донор), такого как мышь, крыса, кролик или примат, имеющими нужную специфичность, аффинность и эффективность.

Гуманизированные антитела могут иметь одну или более обратных мутаций, которые приводят к замене одной или более аминокислот обратно на аминокислоты антитела-донора. И наоборот, остатки из антитела-донора, включенные в гуманизированные антитела, могут быть подвергнуты мутациям для соответствия остаткам, присутствующим в человеческих антителах-реципиентах.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут представлять собой миметики антител. Термин "миметик антитела" означает любую молекулу, которая имитирует функцию или эффект антитела, и которая связывается специфически и с высокой аффинностью с его молекулярными мишенями. В некоторых вариантах осуществления миметики антител могут представлять собой монотела, сконструированные для включения домена фибронектина типа III (Fn3) в качестве белкового каркаса (US 6673901; US 6348584). В некоторых вариантах осуществления миметики антител могут представлять собой миметики, известные в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, молекулы аффител, аффилины, аффитины, антикалины, авимеры, дарпины, финомеры, а также пептиды доменов Кунитца. В других вариантах осуществления миметики антител могут включать одну или более не пептидных областей.

Используемый в настоящем документе термин "вариант антитела" означает биомолекулу, сходную с антителом по структуре, последовательности и/или функции, но имеющую некоторые отличия в ами-

нокислотной последовательности, составе или структуре в сравнении с другим антителом или природным антителом.

Получение антител.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению разработаны для связывания антигенов, описанных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "антиген" означает элемент, который индуцирует или вызывает иммунный ответ в организме. Иммунный ответ характеризуется по реакции клеток, тканей и/или органов организма на присутствие чужеродного элемента. Такой иммунный ответ, как правило, приводит к продуцированию организмом одного или более антител против чужеродного элемента, например, антигена или части антигена. В некоторых случаях способы иммунизации могут быть изменены в зависимости от одного или более желательных результатов иммунизации. Используемый в настоящем документе термин "результат иммунизации" означает один или более желательных эффектов иммунизации. Примеры включают высокие титры антитела и/или повышенную специфичность антитела в отношении интересующей мишени.

Антигены по изобретению могут включать гликаны, гликоконъюгаты (включая, но без ограничения, гликопротеины и гликолипиды), пептиды, полипептиды, слитые белки, или любые из вышеупомянутых, и могут быть конъюгированы или находиться в комплексе с одним или более отдельными адъювантами или гетерологичными белками. В некоторых вариантах осуществления антигены, используемые в способах по настоящему изобретению, могут включать сталированные гликаны, такие как STn. Антигены, имеющие STn, могут включать муцины. Муцины представляют собой семейство белков, которые в высокой степени гликозилированы. Они являются компонентом многих опухолей, возникающих из эпителиальных клеток (Ishida, A. et al., 2008. Proteomics. 8: 3342-9, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Они экспрессируются на высоком уровне подчелюстными железами и могут быть обнаружены в больших количествах в слюне и слизистом секрете. Полученные от животных муцины подчелюстных желез могут быть использованы в качестве антигенов для получения анти-STn антител в иммуногенных хозяевах. Муцины подчелюстных желез от разных биологических видов отличаются содержащимися в них STn в отношении форм AcSTn и GcSTn. Муцин подчелюстных желез свиньи (PSM) имеет особенно высокое содержание GcSTn, который составляет примерно 90% всего STn. STn из муцина подчелюстных желез крупного рогатого скота (BSM) содержит примерно равные процентные доли GcSTn и AcSTn. Муцин подчелюстных желез овец (OSM) имеет особенно высокое содержание AcSTn, который составляет примерно 90% всего STn. В некоторых случаях растворы, приготовленные для иммунизации, могут быть изменены для содержания одного или более из PSM, BSM и OSM в зависимости от желательной мишени антител, получаемых в результате иммунизации. PSM можно использовать в иммунизациях для получения в иммуногенных хозяевах антител, которые с большей вероятностью будут специфичными в отношении GcSTn. PSM богат Neu5Gc-содержащими гликопротеинами муцинового типа, на которых находится GcSTn. Среди известных в настоящее время источников с высоким содержанием Neu5Gc находится красное мясо; в частности, подчелюстные железы были ранее описаны в качестве обильного источника Neu5Gc вследствие высокой экспрессии фермента CMAH, который катализирует реакцию образования предшественника Neu5Gc, CMP-Neu5Ac. В некоторых случаях PSM может быть использован для предотвращения пан-анти-Neu5Gc ответа и индукции более специфичного иммунного ответа против GcSTn. OSM может быть использован в иммунизациях для получения в иммуногенных хозяевах антител, которые с большей вероятностью будут специфичными в отношении AcSTn.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к взаимодействующему с гликанами антителу, которое является GcSTn-специфичным. Антитело имеет небольшую перекрестную реактивность в отношении Neu5Ac-STn или Tn. Антитело может связывать GcSTn, но имеет сниженную аффинность для AcSTn.

В некоторых вариантах осуществления антигены могут быть подвергнуты ферментативному расщеплению перед проведением иммунизации для модулирования возникающего иммунного ответа у иммуногенных хозяев. В одном примере муцины подчелюстных желез можно обрабатывать ферментами трипсином или протеазой К перед проведением иммунизации. Активность таких ферментов может помогать отщеплению и, тем самым, уменьшать процентную долю и вариабельность не-STn эпитопов. Гликановые фрагменты могут экранировать от ферментативного протеолиза области пептида, к которым они прикреплены, которые за счет этого остаются интактными.

Титры антител, полученных в результате иммунизации, могут иметь разные уровни в зависимости от типа и количества антигена, используемого в таких иммунизациях. В некоторых случаях определенные антигены могут быть выбраны для использования в иммунизациях на основании ожидаемого титра.

Используемый в настоящем документе термин "адъювант" означает фармакологическое или иммунологическое средство, которое модифицирует эффект других средств. Адъюванты по настоящему изобретению включают, но без ограничения, химические композиции, биомолекулы, терапевтические средства и/или терапевтические режимы. Адъюванты могут включать адъювант Фрейнда (полный и/или неполный), иммуностимулирующие олигонуклеотиды [например, олигодезоксинуклеотиды (ODN) CpG], минерал-содержащие композиции, бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины, биоадгезивы, муко-

адгезивы, микрочастицы, липиды, липосомы, мурамилпептиды, N-окисленные полиэтилен-пиперазиновые производные, сапонины и/или иммуностимулирующие комплексы (ISCO). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут включать эмульсии типа масло-в-воде (например, субмикронные эмульсии типа масло-в-воде). Адъюванты по настоящему изобретению также могут включать любые из адъювантов, раскрытых в публикациях патента США № US20120027813 и/или патента США № US8506966, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Антитела по настоящему изобретению могут быть поликлональными или моноклональными, или рекомбинантными, полученными способами, известными в данной области или описанными в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению с целью обнаружения могут быть мечены детектируемой меткой, известной специалистам в данной области. Метка может представлять собой радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, хемилюминесцентное соединение, фермент или кофактор фермента, или любые другие метки, известные в данной области. В некоторых аспектах антитело, которое связывается с нужным антигеном, не является меченым, но может быть обнаружено за счет связывания меченого вторичного антитела, которое специфически связывается с первичным антителом.

Антитела по настоящему изобретению (например, взаимодействующие с гликанами антитела) включают, но без ограничения, поликлональные, моноклональные, полиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, полученные при помощи экспрессионной библиотеки Fab, анти-идиотипические (анти-ид) антитела (включая, например, анти-ид антитела к антителам по изобретению), полученные внутри клетки антитела (то есть интратела), а также эпитоп-связывающие фрагменты любых из вышеперечисленных. Антитела по настоящему изобретению (например, взаимодействующие с гликанами антитела) могут быть от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно, такие антитела являются антителами человека, мыши (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими, триспецифическими или большей степени специфичности). Полиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов антигена-мишени по настоящему изобретению, или могут быть специфичными как для антигена-мишени по настоящему изобретению, так и для гетерологичного эпитопа, такого как гетерологичный гликан, пептид или материал твердой подложки. (Смотри, например, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tub, A. et al., Trispecific F(ab)3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. J Immunol. 1991 Jul 1; 147(1):60-9; патенты США № 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; и Kostelny, S.A. et al., Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. Immunol. 1992 Mar 1; 148(5): 1547-53).

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть получены с использованием широко применяемых способов, известных в данной области, для получения моноклональных антител. В одном варианте осуществления моноклональные антитела получают с использованием технологии гибридом (Kohler, G. et al., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7; 256(5517):495-7). Для получения гибридом, сначала мышь, хомяка или другое подходящее животное-хозяина, как правило, иммунизируют иммунизирующим средством (например, антигеном-мишенью по изобретению) для стимуляции лимфоцитов, продуцирующих, или способных продуцировать, антитела, которые будут специфически связывать иммунизирующее средство. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать in vitro. Затем проводят слияние лимфоцитов с иммортализованными клеточными линиями, используя соответствующее средство для слияния, такое как полиэтиленгликоль, для получения клеток гибридомы (Goding, J.W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press. 1986; 59-1031). Иммортализованные клеточные линии, как правило, представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности, клетки миеломы грызунов, кролика, крупного рогатого скота и человека. Как правило, используют клеточные линии крысиной или мышиной миеломы. Клетки гибридомы можно культивировать в соответствующей культуральной среде, которая, предпочтительно, содержит одно или более веществ, ингибирующих рост или выживание не слитых иммортализованных клеток. Например, если в исходных клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"), эти вещества предотвращают рост дефицитных по HGPRT клеток.

Предпочтительными иммортализованными клеточными линиями являются такие, которые эффективно проходят слияние, поддерживают высокий уровень экспрессии антитела выбранными антителопродуцирующими клетками и являются чувствительными к среде, такой как среда HAT. Более предпочтительными иммортализованными клеточными линиями являются линии мышиной миеломы, которые могут быть получены, например, из Центра распределения клеток Института Салк, Сан-Диего, Калифорния, и из Американской коллекции типовых культур, Манасас, Вирджиния. Также описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышиной-человеческой гетеромиеломы, используемые для продуциро-

вания человеческих моноклональных антител (Kozbor, D. et al., A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. J Immunol. 1984 Dec; 133(6):3001-5; Brodeur, B. et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 1987; 33:51-63).

В некоторых вариантах осуществления клетки миеломы могут быть подвергнуты генетической манипуляции. Такую манипуляцию можно осуществлять с использованием мутагенеза при помощи нуклеазы "цинковые пальцы" (ZFN), как описано в настоящем документе. Альтернативно, можно использовать методы трансфекции, известные в данной области. Можно использовать клетки миеломы NS0 или другие клеточные линии мышиной миеломы. Например, Sp2/0-Agl4 может быть альтернативной клеточной линией для получения гибридомы.

Индуцированное подобными активаторам транскрипции эффекторными нуклеазами (TALEN) редактирование генома является альтернативным способом нокаута гена. TALEN представляют собой искусственные ферменты рестрикции, полученные путем слияния ДНК-связывающего домена TAL-эффектора с ДНК-расщепляющим доменом. Подобно ZFN, TALEN индуцирует двухцепочечные разрывы в нужных локусах, которые могут быть восстановлены при помощи NHEJ пониженной точности, с получением вставок/делеций в сайтах разрыва (Wood, A.J. et al., Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science. 2011 Jul 15; 333(6040): 307). Компания Cellectis Bioresearch (Cambridge, MA) предоставляет услуги по дизайну TALEN и конструированию плазмид. Затем культуральную среду, в которой культивируют клетки гибридомы, можно анализировать на присутствие моноклональных антител. Предпочтительно, специфичность связывания (то есть специфическую иммунореактивность) моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют методом иммунопреципитации или в in vitro анализе связывания, таком как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Такие методики и анализы известны специалистам в данной области. Специфичность связывания моноклонального антитела можно, например, определять при помощи анализа Скэтчарда (Munson, P.J. et al., Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal Biochem. 1980 Sep 1; 107(1):220-39). В некоторых случаях специфичность антитела для областей конкретного антигена можно характеризовать путем химической модификации антигенов перед проведением анализа на связывание антитела. В одном примере можно использовать обработку периодатом для разрушения C6 боковой цепи сиаловых кислот. Анализы можно проводить с использованием и без использования обработки периодатом для выявления того, является ли связывание в необработанных образцах специфичным для сиаловой кислоты. В некоторых случаях антигены, имеющие 9-O-ацетилированную сиаловую кислоту, можно подвергать обработке слабым основанием (например, 0,1 M NaOH) для разрушения 9-O-ацетильных групп. Анализы можно проводить с использованием и без использования обработки слабым основанием для выявления того, зависит ли связывание в необработанных образцах от 9-O-ацетилирования сиаловой кислоты.

После идентификации нужных клеток гибридом клоны можно субклонировать методом серийных разведений и выращивать стандартными способами. Подходящие для этой цели культуральные среды включают, например, модифицированную по способу Дульбекко среду Игла или среду RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридом можно выращивать in vivo в виде асцитов у млекопитающего.

Альтернативные способы клонирования гибридом могут включать способы, для которых доступны наборы от компании STEMCELL Technologies (Vancouver, BC, Canada), например, набор ClonaCell™-HY, включающий полутвердую среду на основе метилцеллюлозы и другие среды и реагенты для поддержания селекции и роста клонов гибридом. Однако среды в данном наборе содержат ЭТС, которая является экзогенным источником для включения Neu5Gc. Хотя аппарат для эндогенного синтеза Neu5Gc нарушен в гибридоме $Cmah^{-/-}$, Neu5Gc, включенная из культуральной среды, также может представлять проблему в некоторых случаях (Bardor, M. et al., Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. J Biol Chem. 2005. 280: 4228-4237). В таких случаях в культуральную среду можно добавлять Neu5Ac, чтобы устранить включение Neu5Gc за счет метаболической конкуренции (Ghaderi, D. et al., Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. Nat Biotechnol. 2010. 28: 863-867).

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно выделять или очищать из культуральной среды или асцитной жидкости общепринятыми методами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, хроматография на белок A-сефарозе, хроматография на гидроксилапатите, электрофорез в геле, диализ или аффинная хроматография.

В другом варианте осуществления моноклональные антитела по настоящему изобретению также можно получать методами рекомбинантных ДНК, такими как те, которые описаны в патенте США № 4816567, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. ДНК, кодирующую моноклональные антитела по изобретению, можно с легкостью выделять и секвенировать общепринятыми методами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Клетки гибридомы по изобретению служат в качестве предпочтительного источника ДНК. После выделения ДНК можно помещать в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева. Клетки-хозяева могут включать, но без ограничения, клетки HEK293, клетки HEK293T, клетки

COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (CHO) и клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, используемые для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующими последовательностями для константных доменов тяжелой и легкой цепи антитела человека гомологичных мышиных последовательностей (патент США № 4816567) или путем ковалентного связывания с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей, или части, кодирующей последовательности не являющегося иммуноглобулином полипептида. Таким не являющимся иммуноглобулином полипептидом можно заменять константные домены антитела по изобретению, или можно заменять вариабельный домены одного антигенсвязывающего сайта антитела по изобретению для создания химерного двухвалентного антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению (например, взаимодействующие с гликанами антитела) могут быть получены различными методами, известными специалистам в данной области. Для получения поликлональных антител in vivo животных-хозяев, таких как кролики, крысы, мыши, коровы, лошади, ослы, куры, обезьяны, овцы или козы, иммунизируют либо свободными, либо связанными с носителями антигенами, например, путем внутрибрюшинной и/или внутрикожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления инъекционный материал может представлять собой эмульсию, содержащую примерно 100 мкг антигена или белка-носителя. В некоторых вариантах осуществления инъекционные материалы могут включать богатую гликанами композицию, такую как муцин подчелюстных желез млекопитающего, не являющегося человеком, в растворе. Также можно использовать различные адъюванты для усиления иммунного ответа, в зависимости от вида хозяина. Адъюванты включают, но без ограничения, адъювант Фрейнда (полный и неполный), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы плюроники, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, TITERMAX® (CytRx Corp, Los Angeles, CA), гемоцианин лимфы улитки, динитрофенол, а также потенциально полезные для человека адъюванты, такие как БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена) и Corynebacterium parvum. Такие адъюванты также хорошо известны в данной области. Может потребоваться несколько бустерных инъекций, например, с интервалами примерно две недели, для достижения нужного титра антитела, которое может быть обнаружено, например, в анализе ELISA с использованием гликанов и/или свободного пептида, адсорбированного на твердой поверхности. Титр антител в сыворотке от иммунизированного животного может быть увеличен путем селекции антител, например, путем адсорбции антигенов на твердой подложке и элюции отобранных антител методами, хорошо известными в данной области.

Взаимодействующие с гликанами антитела, их варианты и фрагменты могут быть выбраны и продуцированы с использованием исследовательских методов с высокой пропускной способностью. В одном варианте осуществления взаимодействующие с гликанами антитела, которые включают синтетические антитела, их варианты и фрагменты, получают с использованием библиотек дисплея. Используемый в настоящем документе термин "дисплей" означает экспрессию или экспонирование белков или пептидов на поверхности конкретного хозяина. Используемый в настоящем документе термин "библиотека" означает коллекцию уникальных последовательностей кДНК и/или белков, закодированных ими. Библиотека может содержать от всего двух уникальных кДНК до сотен миллиардов уникальных кДНК. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела, которые являются синтетическими антителами, получают с использованием библиотек дисплея антител или библиотек дисплея фрагментов антител. Используемый в настоящем документе термин "библиотека дисплея фрагментов антител" означает библиотеку дисплея, в которой каждый член кодирует фрагмент антитела, содержащий по меньшей мере одну вариабельную область антитела. Такие фрагменты антител предпочтительно представляют собой фрагменты Fab, однако предусмотрены и другие фрагменты антител, такие как одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv). В библиотеке фрагментов Fab антител все закодированные Fab могут быть идентичными, за исключением аминокислотной последовательности, содержащейся в вариабельных петлях определяющих комплементарность областей (CDR) фрагмента Fab. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления аминокислотные последовательности в отдельных областях VH и/или VL также могут отличаться.

Библиотеки дисплея могут быть экспрессированы в ряде возможных хозяев, включая, но без ограничения, дрожжи, бактериофаги, бактерии и ретровирусы. Дополнительные технологии дисплея, которые могут быть использованы, включают рибосомный дисплей, дисплей на микрогранулах и методы связывания белка-ДНК. В предпочтительном варианте осуществления библиотеки дисплея Fab экспрессируются в дрожжах или в бактериофагах (в настоящем документе также называемых "фаги" или "фаговые частицы"). При экспрессии Fab располагаются на поверхности фага или дрожжей, где они могут взаимодействовать с конкретным антигеном. Антиген, который включает гликан или другой антиген из нужной мишени, может быть использован для отбора фаговых частиц или дрожжевых клеток, экспрессирующих фрагменты антител с наибольшей аффинностью для этого антигена. Последовательность ДНК, кодирующую CDR связанного фрагмента антитела, затем можно определять путем секвенирования с использованием связанной частицы или клетки. В одном варианте осуществления при получении антител используют позитивную селекцию. В некоторых вариантах осуществления при получении антител исполь-

зуют негативную селекцию. В некоторых вариантах осуществления используют методы как позитивной, так и негативной, селекции во время нескольких раундов селекции при получении антител с использованием библиотек дисплея.

При дрожжевом дисплее кДНК кодирующую разные фрагменты антител, вводят в дрожжевые клетки, где они экспрессируются, и фрагменты антител экспонируются на клеточной поверхности, как описано в публикации Chao et al. (Chao, G. et al., Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. NatProtoc. 2006; 1(2):755-68). При дисплее на поверхности дрожжей экспрессированные фрагменты антител могут содержать дополнительный домен, который включает дрожжевой белок агглютинин, Aga2p. Этот домен позволяет слитому белку фрагмента антитела присоединяться к внешней поверхности дрожжевой клетки за счет образования дисульфидных мостов с экспрессированным на поверхности Aga1p. Результатом является дрожжевая клетка, покрытая конкретным фрагментом антитела. Исходно используют библиотеки дисплея кДНК, кодирующих эти фрагменты антител, в которых каждый фрагмент антитела имеет уникальную последовательность. Такие слитые белки экспрессируются на клеточной поверхности миллионов дрожжевых клеток, где они могут взаимодействовать с нужным антигеном-мишенью, инкубируемым с клетками. Антигены-мишени могут быть ковалентно или иным образом модифицированы химической или магнитной группой, позволяющей эффективно сортировать клетки после успешного связывания с соответствующим фрагментом антитела. Извлечение можно осуществлять с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS), активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) или других методом сортировки клеток, известных в данной области. После отбора субпопуляции дрожжевых клеток соответствующие плазмиды могут быть проанализированы для определения последовательности CDR.

В технологии бактериофагового дисплея, как правило, используют нитчатый фаг, включая, но без ограничения, вирионы fd, F1 и M13. Такие штаммы являются не литическими, что позволяет непрерывно размножать хозяина и увеличивать вирусные титры. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител по настоящему изобретению, включают те, которые описаны в Miersch et al. (Miersch, S. et al., Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. Methods. 2012 Aug; 57(4):486-98), Bradbury et al. (Bradbury, A.R. et al., Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. Nat Biotechnol. 2011 Mar; 29(3):245-54), Brinkman et al. (Brinkmann, U. et al., Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. J Immunol Methods. 1995 May 11; 182(1):41-50); Ames et al. (Ames, R.S. et al., Conversion of murine Fobs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins. J Immunol Methods. 1995 Aug 18; 184(2):177-86); Kettleborough et al. (Kettleborough, C.A. et al., Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. Eur J Immunol. 1994 Apr; 24(4): 952-8); Persic et al. (Persic, L. et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. Gene. 1997 Mar 10; 187(1):9-18); PCT заявке № PCT/GB91/01134; PCT публикациях WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401 и патентах США № 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Экспрессию фрагмента антитела на бактериофагах можно осуществлять путем вставки кДНК, кодирующей фрагмент, в ген, экспрессирующий белок вирусной оболочки. Вирусная оболочка нитчатых бактериофагов состоит из пяти белков оболочки, закодированных в одноцепочечном геноме. Оболочечный белок pill является предпочтительным белком для экспрессии фрагмента антитела, как правило, на N-конце. Если экспрессия фрагмента антитела нарушает функцию белка pill, вирусная функция может быть восстановлена за счет совместной экспрессии белка pill дикого типа, хотя такая экспрессия будет уменьшать число фрагментов антител, экспрессированных на оболочке вируса, но может увеличивать доступ к фрагменту антитела для антигена-мишени. Альтернативно, экспрессия вирусных белков, а также фрагментов антител, может быть закодирована на нескольких плазмидах. Такой способ можно использовать для уменьшения общего размера инфекционной плазмиды и повышения эффективности трансформации.

Как описано выше, после выбора хозяина, экспрессирующего высокоаффинное антитело или фрагмент антитела (например, взаимодействующего с гликанами антитела), кодирующие области из антитела или фрагмента антитела могут быть выделены и использованы для получения целых антител, включая человеческие антитела, или любого другого нужного антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессированы в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как подробно описано ниже.

Последовательность ДНК, кодирующую высокоаффинное антитело, можно подвергать мутации в дополнительных раундах селекции, в процессе, известном как созревание аффинности. Используемый в настоящем документе термин "созревание аффинности" относится к способу, с помощью которого получают антитела с повышенной аффинностью для конкретного антигена за счет успешных раундов мутаций и селекции последовательности кДНК, кодирующей антитело или фрагмент антитела. В некоторых случаях этот процесс проводят in vitro. Для осуществления этого можно проводить амплификацию кодирующей последовательности CDR с использованием ПЦР с пониженной точностью, получая миллионы

копий, содержащих мутации, включая, но без ограничения, точечные мутации, мутации областей, мутации вставок и мутации делеций. Используемый в настоящем документе термин "точечная мутация" означает мутацию нуклеиновой кислоты, при которой один нуклеотид в нуклеотидной последовательности заменен на другой нуклеотид. Используемый в настоящем документе термин "мутация области" означает мутацию нуклеиновой кислоты, при которой два или более последовательных нуклеотидов заменены на другие нуклеотиды. Используемый в настоящем документе термин "мутация вставки" означает мутацию нуклеиновой кислоты, при которой один или более нуклеотидов вставлены в нуклеотидную последовательность. Используемый в настоящем документе термин "мутация делеций" означает мутацию нуклеиновой кислоты, при которой один или более нуклеотидов удалены из нуклеотидной последовательности. Мутации вставки или делеции могут включать полную замену всего кодона или замену одного кодона на другой за счет изменения одного или двух нуклеотидов исходного кодона.

Можно осуществлять мутагенез кодирующей CDR последовательности кДНК, получая миллионы мутантов с одиночными мутациями в областях CDR тяжелой и легкой цепей. При другом подходе случайные мутации вводят лишь в остатки CDR, которые с большей вероятностью могут приводить к повышению аффинности. Эти заново полученные библиотеки мутантов можно использовать для повторения процесса с целью скрининга на клоны, которые кодируют фрагменты антител с еще более высокой аффинностью для антигена-мишени. Непрерывные раунды мутаций и селекции способствуют синтезу клонов со все более и более высокой аффинностью (Chao, G. et al., Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc. 2006; 1(2):755-68).

Примеры методов, которые можно использовать для получения антител и фрагментов антител, таких как Fab и scFv, включают методы, описанные в патентах США № 4946778 и 5258498; Miersch et al. (Miersch, S. et al., Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. Methods. 2012 Aug; 57(4):486-98), Chao et al. (Chao, G. et al., Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc. 2006; 1(2):755-68), Huston et al. (Huston, J.S. et al., Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. Methods Enzymol. 1991; 203:46-88); Shu et al. (Shu, L. et al., Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Sep 1; 90(17):7995-9); и Skerra et al. (Skerra, A. et al., Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science. 1988 May 20; 240(4855): 1038-41), содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Для некоторых вариантов применения, включая in vivo применение антител (например, взаимодействующих с гликанами антител) у человека и в in vitro анализах обнаружения, может быть предпочтительным использование химерных, гуманизированных, или человеческих антител. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены от животных разных видов, например, антитела, имеющие вариабельную область из мышиного моноклонального иммуноглобулина и константную область человеческого иммуноглобулина. Способы получения химерных антител известны в данной области. (Morrison, S.L., Transfectomas provide novel chimeric antibodies. Science. 1985 Sep 20; 229(4719):1202-7; Gillies, S.D. et al., High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. J Immunol Methods. 1989 Dec 20; 125(l-2):191-202.; и патенты США № 5807715; 4816567 и 4816397, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител биологического вида, отличного от человека, которые связывают нужный антиген и имеют одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) из антител видов, отличных от человека, и каркасные области из молекулы человеческого иммуноглобулина. Часто каркасные остатки в каркасных областях человеческого антитела заменены соответствующими остатками из CDR и каркасных областей антитела-донора с целью изменения, предпочтительно улучшения, связывания антигена. Эти замены каркасных остатков определяют способами, хорошо известными в данной области, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и путем сравнения последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. (Патенты США № 5693762 и 5585089; Riechmann, L. et al., Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 1988 Mar 24; 332(6162):323-7, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Антитела могут быть гуманизированы с использованием различных методов, известных в данной области, включая, например, пересадку CDR (EP 239400; PCT публикация WO 91/09967; патенты США № 5225539; 5530101 и 5585089); маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, E.A., A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol. 1991 Apr-May; 28(4-5):489-98; Studnicka, G.M. et al., Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. Protein Eng. 1994 Jun; 7(6): 805-14; Roguska, M.A. et al., Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Feb 1; 91(3):969-73); и перетасовку цепей (патент США № 5565332); содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут быть разработаны для достижения нужной

специфичности связывания, комплементзависимой цитотоксичности и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, и так далее.

В некоторых случаях каркасные последовательности человеческого антитела выбирают путем выравнивания последовательностей антитела-донора с каркасными последовательностями человеческого антитела для выявления каркасов-кандидатов человеческого антитела с наиболее высоким уровнем гомологии. В некоторых случаях каркасные области можно выбирать из более чем одного каркаса-кандидата человеческого антитела (например, каркасные области 1-3 можно выбирать из одного кандидата и каркасную область 4 можно выбирать из альтернативного кандидата). В некоторых случаях каркасные области можно выбирать из человеческих консенсусных последовательностей во избежание риска включения иммуногенных эпитопов, образовавшихся в результате соматических мутаций. Консенсусные последовательности представляют собой последовательности, полученные путем сравнения многих последовательностей и выбора наиболее часто встречающихся остатков для каждого положения. В некоторых случаях каркасные последовательности человеческого антитела можно выбирать из последовательностей зародышевой линии антитела человека. Их можно получать путем поиска в базе данных (например, с использованием базы данных белков NCBI или других баз данных).

Каркасные последовательности легкой и тяжелой цепей человеческого антитела можно выбирать из одних и тех же, или из разных клонов. Легкая и тяжелая цепи, полученные из одного и того же клона, имеют больше вероятности связывания, с образованием сайтов связывания, которые являются функциональными; однако консервативный характер границы раздела между тяжелой и легкой цепями, как правило, позволяет легкой и тяжелой цепям из разных клонов связываться и быть функциональными. Информацию о частоте спаривания между каркасными последовательностями легкой и тяжелой цепей человеческих антител можно получить, например, из Tiller et al., 2013. MAbs. 5(3): 445-70, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Можно рассматривать возможность "обратных мутаций" остатков в последовательностях гуманизированного антитела для повышения или восстановления аффинности антитела, утраченной в процессе гуманизации. Обратная мутация включает изменение остатков, измененных в процессе гуманизации, обратно на остатки, присутствующие в исходной последовательности не принадлежащего человеку антитела. Остатки, которые являются кандидатами для проведения обратной мутации, могут быть идентифицированы, например, путем сравнения со стандартными конформациями, имеющими место в канонических структурах антител (смотри Al-Lazikani, et al., 1997. J. Mol. Biol. 273: 927-48, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Необычные канонические остатки могут быть идентифицированы и сделаны мишенью для обратной мутации. В некоторых случаях остатки, которые являются кандидатами для проведения обратной мутации, могут представлять собой "верньерные остатки", термин, как правило, относится к остаткам, находящимся в контакте с CDR. Эти остатки имеют большую вероятность оказания влияния на расположение и конформацию CDR, и, вследствие этого, на аффинность и/или специфичность антитела (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 6, p117). В некоторых случаях каркасные области человеческого антитела не изменяют, а проводят обратную мутацию CDR из антитела-донора, добиваясь соответствия человеческим областям CDR, в то же время, сохраняя связывание эмпирическими методами.

Полностью человеческие антитела (например, взаимодействующие с гликанами антитела) являются особенно предпочтительными для терапевтического лечения пациентов-людей, во избежание, или для уменьшения, иммунной реакции на чужеродный белок. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области, включая способы дисплея антител, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Смотри также, патенты США № 4444887 и 4716111; и PCT публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Человеческие антитела (например, взаимодействующие с гликанами антитела) также можно получать с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать полинуклеотиды человеческих иммуноглобулинов. Например, полинуклеотидные комплексы тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина можно вводить случайным образом, или путем гомологичной рекомбинации, в мышиные эмбриональные стволовые клетки. Альтернативно, вариабельную область, константную область и область вариабельности человеческого антитела можно вводить в мышиные эмбриональные стволовые клетки, в дополнение к полинуклеотидам тяжелой и легкой цепей человеческого антитела. Полинуклеотиды тяжелой и легкой цепей мышиного иммуноглобулина можно делать не функциональными отдельно или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает продуцирование эндогенного антитела. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и производят микроинъекцию в бластоцисты для получения химерных мышей. Химерных мышей затем скрещивают, получая гомозиготное потомство, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всей, или частью, молекулы гликана, глико-

конъюгата и/или полипептида по изобретению.

Таким образом, с использованием такого метода можно получать полезные человеческие IgG, IgA, IgM, IgD и IgE антитела. Для обзора технологий получения человеческих антител см. Lonberg and Huszar (Lonberg, N. et al., Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93). Для подробного описания технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител, а также протоколов для получения таких антител, смотри, например, PCT публикации WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; патенты США № 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771; 5939598; 6075181 и 6114598, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Кроме того, можно привлекать такие компании, как Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.), Protein Design Labs, Inc. (Mountain View, Calif.) и Genpharm (San Jose, Calif.) для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с использованием технологии, аналогичной описанным выше технологиям.

После того, как молекула антитела по настоящему изобретению была получена с использованием животных, линии клеток, химически синтезирована или рекомбинантно экспрессирована, ее можно очищать (то есть выделять) любым методом, известным в данной области для очистки молекулы иммуноглобулина или полипептида, например, методом хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, за счет аффинности для специфического антигена, на белке А и эксклюзионной хроматографии на колонке), центрифугирования, дифференциальной растворимости, или любым другим стандартным методом очистки белков. Кроме того, можно проводить слияние антител по настоящему изобретению, или их фрагментов, с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем документе или известными в данной области, для облегчения очистки.

Аффинность между антителом и мишенью или лигандом (таким как антиген, использованный для получения конкретного антитела) можно измерять в виде K_D с использованием одного или более анализов связывания, описанных в настоящем документе. В зависимости от желательного применения конкретного антитела могут быть желательны различные величины K_D. Высокоаффинные антитела, как правило, образуют связи с лигандами с величиной K_D примерно 10^{-5} М или менее, например, примерно 10^{-6} М или менее, примерно 10^{-7} М или менее, примерно 10^{-8} М или менее, примерно 10^{-9} М или менее, примерно 10^{-10} М или менее, примерно 10^{-11} М или менее, или примерно 10^{-12} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно характеризовать по их полумаксимальной эффективной или ингибирующей концентрации (EC_{50} или IC_{50}, соответственно). В некоторых случаях эта величина может представлять собой концентрацию антитела, необходимую для ингибирования клеток, экспрессирующих STn (например, уничтожения, уменьшения скорости пролиферации и/или устранения одной или более клеточных функций), на уровне, равном половине максимального ингибирования, наблюдаемого при максимально высоких концентрациях антитела. Такие величины IC_{50} могут составлять от примерно 0,001 нМ до примерно 0,01 нМ, от примерно 0,005 нМ до примерно 0,05 нМ, от примерно 0,01 нМ до примерно 1 нМ, от примерно 0,05 нМ до примерно 5 нМ, от примерно 0,1 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 0,5 нМ до примерно 25 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 50 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 75 нМ, от примерно 10 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 25 нМ до примерно 250 нМ, от примерно 200 нМ до примерно 1000 нМ или более 1000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, можно тестировать в отношении их способности к таргетированию полученных от пациента раковых клеток и/или раковых стволовых клеток (CSC). В таких вариантах осуществления полученные от пациента раковые клетки можно культивировать in vitro, и антитела по настоящему изобретению можно использовать для таргетирования таких клеток.

В других вариантах осуществления полученные от пациента клетки опухолей или фрагменты опухолей можно использовать для получения ксенотрансплантатов опухолей, полученных от пациента (PDX). В некоторых случаях фрагменты первичных или метастатических солидных опухолей, сохраняющие тканевую структуру, могут быть получены при хирургической процедуре или биопсии. В некоторых случаях можно использовать жидкость, собранную из злокачественных асцитов или плевральных выпотов. Опухоли можно имплантировать в виде фрагментов или одноклеточных суспензий, либо отдельных, либо, в некоторых исследованиях, покрытых матригелем® (Coming Life Sciences, Coming, NY) или смешанных с человеческими фибробластами или мезенхимальными стволовыми клетками. Зоны имплантации могут включать дорзальную области мыши (подкожная имплантация), хотя одним из вариантов может быть имплантация в тот же орган, что и исходная опухоль (ортотопическая имплантация, то есть в поджелудочную железу, ротовую полость, яичник, жировое тело молочной железы, головной мозг и так далее). Кроме того, независимо от происхождения опухоли, некоторые подходы могут включать имплантацию первичных опухолей в почечную капсулу в попытках увеличить процент успешных попыток имплантации. В таких исследованиях можно использовать различные линии мышей, имеющих разную степень иммуносупрессии. Для гормонально-зависимых опухолей в некоторых исследованиях можно использовать добавление гормонов с намерением увеличить степень приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления опухоли PDX можно создавать у не страдающих ожирением мышей с диабетом/тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD/SCID). Антитела можно вводить мы-

шам с опухолями PDX и анализировать эффект на объем опухолей. В некоторых случаях опухоли PDX можно иссекать, диссоциировать на клетки, и полученные клетки выращивать в культуре. Способность антител по настоящему изобретению таргетировать эти клетки можно оценивать in vitro.

Получение антител, моноклональных или поликлональных, известно в данной области. Методики получения антител хорошо известны в данной области и описаны, например, в публикациях Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 и Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Мишени.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут оказывать свое действие за счет связывания (обратимого или необратимого) с одним или более гликанами, либо гликан-ассоциированными или гликан-связанными мишенями. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела можно получать против любой области мишеней, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления мишени по настоящему изобретению включают гликаны. Гликаны, используемые для получения антител, могут включать цепь сахаров, имеющую по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 остатков. Некоторые гликаны, используемые для получения антител, могут включать от примерно 2 остатков до примерно 5 остатков.

В некоторых вариантах осуществления антигены-мишени взаимодействующих с гликанами антител включают сиаловые кислоты. N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac) и N-гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc) являются основными сиаловыми кислотами на поверхностях клеток млекопитающих. Из них, Neu5Ac естественным образом продуцируется у человека. Neu5Gc естественным образом продуцируется у большинства млекопитающих, за исключением людей вследствие мутации в гене гидроксилазы цитидин-монофосфат (ЦМФ)-N-ацетилнейраминовой кислоты (CMAH), ответственной за продуцирование ЦМФ-Neu5Gc из ЦМФ-Neu5Ac. Neu5Gc у человека, фактически, является иммуногенной, и почти у всех людей экспрессируются анти-Neu5Gc антитела. Несмотря на отсутствие продуцирования, большинство систем в организме человека содержат некоторое количество Neu5Gc из-за поглощения с пищей. Такие чужеродные продукты впоследствии встраиваются в человеческие гликопротеины. Такие гликопротеины предусмотрены в качестве мишеней по изобретению.

Гликановые антигены-мишени по настоящему изобретению могут включать, но без ограничения, те, которые приведены в табл. 1. Используемые аббревиатуры включают: Glc - глюкоза, Gal - галактоза, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, GalNAc - N-ацетилгалактозамин, GlcNAc6S - 6-сульфо-N-ацетилглюкозамин, KDN - 2-кето-3-дезокси-D-глицеро-D-галактонононовая кислота, Neu5,9Ac2 - N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовая кислота, Fuc - фукоза и Neu5GcOMe - 2-O-метил-N-гликолилнейраминовая кислота. O-гликозидные связи присутствуют между всеми остатками в перечисленных гликанах, при этом α и β указывают относительную стехиометрию между двумя остатками, связанными связью, причем α указывает на аксиальную ориентацию, и β указывает на экваториальную ориентацию. Числа после α и/или β, в формате x, x, указывают углеродное число каждого из атомов углерода из каждого из смежных остатков, участвующих в образовании связи. Хотя перечисленные гликаны представляют собой отдельные предусмотренные гликановые антигены-мишени, настоящее изобретение также включает варианты осуществления, в которых приведенные выше гликаны содержат иные сочетания α и β-ориентированных O-гликозидных связей, чем те, которые представлены. "R" представляет собой фрагмент, с которым может быть связан гликан. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой белок, при этом гликан, как правило, связан с остатком серина или треонина. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой молекулу линкера, используемого для соединения гликана с субстратом, например, в гликановой матрице. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой линкер с формулой $-(CH_2)_2CH_2NH_2$ или $-(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой биотин, альбумин, $ProNH_2$, -CH-, -OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, -H, гидридо, гидрокси, алкоксил, кислород, углерод, серу, азот, полиакриламид, фосфор, NH_2, $ProNH_2{=}O(CH_2)_2CH_2NH_2$, $(OCH_2CH_2)_6NH_2$, $O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$, флуоресцентные метки 2-аминобензамид (AB) и/или 2-аминобензоидную кислоту (AA), аналог 2-аминобензамида, содержащий алкиламин (AEAB), группы аминоокси, группы метиламиноокси, гидразидные группы, аминолипид 1,2-дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DHPE), аминоокси (AO) функционализированный DHPE и гликозилфосфатидилинозитол (GPI). Без намерения ограничивать источник или природу R, сюда могут входить структуры, которые влияют на физическое расположение остатка гликана. В некоторых вариантах осуществления группа R может включать сочетание групп R, приведенных в настоящем документе, например, биотинилированный полиакриламид. В некоторых вариантах осуществления группа R в сочетании с лежащим в основании субстратами могут влиять на расположение остатка гликана.

Таблица 1

Гликановые антигены-мишени

Гликан
GalNAcα-R
Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Galβ1,3GalNAcβ-R
Galβ1,3GlcNAcα-R
Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Galβ1,3GlcNAcβ-R
Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Galβ1,4GlcNAcβ-R
Galβ1,4Glcβ-R
KDNα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
KDNα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5,9Ac2α2,3Galβ-R
Neu5,9Ac2α2,6GalNAcα-R
Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5,9Ac2α2,6Galβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,3Galβ-R
Neu5Acα2,6(KDNα2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,6(Neu5Acα2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,6(Neu5Gcα2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,6GalNAcα-R
Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Acα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,6Galβ-R
Neu5Acα2,8KDNα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R

Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Acα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Acα2,8Neu5Gcα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ-R
Neu5Gc9Acα2,6GalNAcα-R
Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,6Galβ-R
Neu5GcOMeα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ-R
Neu5Gcα2,6GalNAcα-R
Neu5Gcα2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,6Galβ-R
Neu5Gcα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R

Гликановые мишени по настоящему изобретению могут включать одну или более областей узнавания антитела. Используемый в настоящем документе термин "область узнавания антитела" означает сегмент, расположенный на любой части молекулы, присоединенной группы, или расположенный на области взаимодействия между гликаном и другой молекулой, включая, но без ограничения, другой гликан, белок, мембрану, структуру клеточной поверхности или компонент внеклеточного матрикса. В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены на внутрицепочечных сайтах-мишенях, при этом термин "внутрицепочечные" означает находящиеся внутри настоящей полимерной цепи. Внутрицепочечные сайты-мишени могут включать области узнавания антитела, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10 остатков, связи между остатками или сочетания остатков и связей. В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены в областях взаимодействия между одной или более гликановыми цепями. Такие области могут находиться между 2, 3, 4 или по меньшей мере 5 гликановыми цепями.

В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены в областях взаимодействия между ответвляющимися гликановыми цепями, связанными с общей родительской цепью. В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены в областях взаимодействия между ответвляющейся гликановой цепью и родительской цепью. В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены в областях взаимодействия между гликанами и белками. Такие области взаимодействия могут включать химические связи между гликаном и белком, включая, но без ограничения, ковалентные связи, ионные связи, гидростатические связи, гидрофобные связи и водородные связи. В некоторых вариантах осуществления области узнавания антитела расположены в областях взаимодействия между гликанами и другими биомолекулами, включая, но без ограничения, липиды и нуклеиновые кислоты. Такие области взаимодействия могут включать химические связи между гликаном и биомолекулой, включая, но без ограничения, ковалентные связи, ионные связи, гидростатические связи, гидрофобные связи и водородные связи.

В некоторых вариантах осуществления гликановые мишени по настоящему изобретению представляют собой компоненты гликоконъюгатов. Используемый в настоящем документе термин "гликоконъюгат" означает элемент, связанный с гликановым фрагментом. В некоторых вариантах осуществления гликоконъюгаты представляет собой гликолипиды. Используемый в настоящем документе термин "гликолипид" относится к классу липидов, имеющих ковалентно присоединенный углеводный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления углеводные фрагменты, находящиеся на гликолипидах, могут представлять собой гликаны. В некоторых вариантах осуществления липидные компоненты гликолипидов включают церамидные фрагменты. Примеры гликолипидов, предусмотренных в качестве мишеней по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, глицерогликолипиды (включая, но без ограничения, галактолипиды и сульфолипиды), гликосфинголипиды (включая, но без ограничения, цереброзиды (например, галактоцереброзиды, глюкоцереброзиды и сульфатиды), ганглиозиды, глобозиды и гликофосфосфинголипиды) и гликозилфосфатидилинозитолы. В случае расположения в клеточных мембранах, гликановые фрагменты гликолипидов расположены на внеклеточной стороне мембраны, где они могут взаимодействовать с другими клетками, а также лигандами клеточной сигнализации (Maccioni, H.J. et al., Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex. FEBS Lett. 2011 Jun 6; 585(11):1691-8).

В некоторых вариантах осуществления гликоконъюгатные мишени по настоящему изобретению представляют собой гликопротеины и/или протеогликаны. Термин "гликопротеины" означает любые белки, которые ковалентно связаны с гликанами. Протеогликаны представляют собой класс белков, сильно гликозилированных гликанами, которые часто несут отрицательный заряд. Это свойство делает их очень гидрофильными и важными компонентами соединительной ткани.

Связанные с раком мишени.

В некоторых вариантах осуществления мишени по настоящему изобретению представляют собой связанные с раком антигены или эпитопы. В настоящем документе термин "связанные с раком" используют для описания элементов, которые могут быть каким-либо образом связаны с раком, злокачественными клетками и/или злокачественными тканями. Были идентифицированы многие связанные с раком антигены или эпитопы, содержащие гликаны, экспрессия которых соотносится с клетками опухолей (Heimburg-Molinaro, J. et al., Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8; 29(48):8802-26). В настоящем документе их называют "опухоль-ассоциированные углеводные антигены" или "TACA". TACA включают, но без ограничения, муцин-связанные антигены [включая, но без ограничения, Тп, сиалил-Tn (STn) и антиген Томсона-Фриденрайха], связанные с группой крови Льюиса антигены [включая, но без ограничения, Lewis^{Y} (Le^{Y}), Lewis^{x} (Le^{x}), сиалил-Lewis^{x} (SLe^{x}) и сиалил-Lewis^{A} (SLe^{A})], гликосфинголипид-связанные антигены [включая, но без ограничения, Globo H, стадиеспецифический эмбриональный антиген 3 (SSEA-3) и гликосфинголипиды, которые включают сиаловую кислоту], ганглиозид-связанные антигены [включая, но без ограничения, ганглиозиды GD2, GD3, GM2, фукозил GM1 и Neu5GcGM3] и связанные с полисиаловой кислотой антигены. Многие из таких антигенов описаны в международной публикации № WO 2015054600, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают связанные с группой крови Льюиса антигены. Связанные с группой крови Льюиса антигены содержат остаток фукозы, связанный с GlcNAc α1-3 связью или α1-4 связью. Они могут находиться как на гликолипидах, так и на гликопротеинах. Связанные с группой крови Льюиса антигены можно обнаружить в жидкостях организма индивидуумов, которые секретируют эти антигены. Их нахождение на красных клетках крови является следствием абсорбции антигенов Льюиса из сыворотки красными клетками крови.

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают Le^{Y}. Le^{Y} (также известный как CD174) состоит из Galβ1,4GlcNAC, имеющего α1,2-, а также α1,3-связанные остатки фукозы, с образованием эпитопа Fucα(1,2)Galβ(1,4)Fucα(1,3)GlcNAc. Он синтезируется из H-антигена при помощи α1,3-фукозилтрансфераз, которые присоединяют α1,3-фукозу к остатку GlcNAc родительской цепи. Le^{Y} может экспрессироваться при разных видах рака, включая, но без ограничения, рак яичника, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, легкого и эпителия. Из-за его низкого уровня экспрессии в нормальных тканях и повышенного уровня экспрессии при многих видах рака, антиген Le^{Y} является многообещающей мишенью для терапевтических антител.

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают Le^{x}. Le^{x} включает эпитоп Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R. Он также известен как CD15 и стадиеспецифический эмбриональный антиген 1 (SSEA-1). Этот антиген сначала был идентифицирован, как иммунореактивный с сывороткой, полученной от мыши, которую иммунизировали клетками тератокарциномы F9. Также была установлена корреляция Le^{x} с эмбриональным развитием на определенных стадиях. Он также экспрессируется в различных тканях, как при наличии, так и в отсутствие рака, но также может быть обнаружен в клетках рака молочной железы и рака яичника, где он экспрессируется только злокачественными клетками.

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают SLe^{A}

и/или SLe^x. SLe^A и SLe^x содержат структуры Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-R и Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R, соответственно. Их экспрессия повышена в раковых клетках. Присутствие этих антигенов в сыворотке коррелирует со злокачественностью и неблагоприятным прогнозом. SLe^x в основном встречается в виде концевого эпитопа муцина. Он экспрессируется при целом ряде различных видов рака, включая рак молочной железы, яичника, меланому, рак толстой кишки, печени, легкого и предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мишени SLe^A и SLe^x содержат Neu5Gc (в настоящем документе их называют GcSLe и $GcSLe^x$, соответственно).

В некоторых случаях связанные с раком мишени по изобретению могут включать муцины. Ishida с соавторами продемонстрировали, что взаимодействие MUC2 с дендритными клетками (с противоопухолевой активностью) приводит к апоптозу дендритных клеток (Ishida, A. et al., 2008. Proteomics. 8: 3342-9, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителам против муцина, используемым для предотвращения апоптоза дендритных клеток и поддержания противоопухолевой активности.

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают гликолипиды и/или эпитопы, находящиеся на гликолипидах, включая, но без ограничения, гликосфинголипиды. Гликосфинголипиды содержат липид церамид, связанный с гликаном гидроксильной группой церамида. На клеточной мембране гликосфинголипиды образуют кластеры, называемые "липидными рафтами".

В некоторых вариантах осуществления TACA-мишени по настоящему изобретению включают Globo H. Globo H представляет собой связанный с раком гликосфинголипид, впервые идентифицированный в клетках рака молочной железы. Гликановая часть Globo H включает Fucα(1-2)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-3)Galα(1-4)Galβ(1-4)Glcβ(1). Хотя его можно обнаружить в целом ряде нормальных эпителиальных тканей, была обнаружена связь Globo H с тканями многих опухолей, включая, но без ограничения, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, предстательной железы, легкого, поджелудочной железы, желудка, яичника и опухолей эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления связанные с раком гликосфинголипидные мишени по настоящему изобретению включают ганглиозиды. Ганглиозиды представляют собой гликосфинголипиды, содержащие одну или более сиаловых кислот. Согласно номенклатуре ганглиозидов, G используют в качестве аббревиатуры для ганглиозида. За этой аббревиатурой следуют буквы M, D или T, указывающие на число присоединенных остатков сиаловой кислоты (1, 2 или 3 соответственно). И наконец, цифры 1, 2 или 3 используют для обозначения порядка расстояния, которое каждый из них проходит при анализе методом тонкослойной хроматографии (при этом 3 проходит наибольшее расстояние, за ним следует 2, а затем 1). Известно, что ганглиозиды вовлечены в рост и метастазирование рака и могут экспрессироваться на клеточной поверхности опухолевых клеток. Ганглиозиды, экспрессируемые на опухолевых клетках, могут включать, но без ограничения, GD2, GD3, GM2 и фукозил-GM1 (в настоящем документе также называемый Fuc-GM1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействующие с гликанами антитела направлены против GD3. GD3 является регулятором роста клеток. В некоторых вариантах осуществления направленные на GD3 антитела используют для модулирования роста клеток и/или ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления направленные на GD3 антитела используют для модулирования прикрепления клеток. GD3, связанный с некоторыми клетками опухолей, может содержать остатки 9-O-ацетилированной сиаловой кислоты (Mukheijee, K. et al., 2008. J Cell Biochem. 105: 724-34 и Mukherjee, K. et al., 2009. Biol Chem. 390: 325-35, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых случаях антитела по изобретению являются избирательными для остатков 9-O-ацетилированной сиаловой кислоты. Некоторые антитела могут быть специфичными для 9-O-ацетилированных GD3. Такие антитела могут быть использованы для таргетирования опухолевых клеток, экспрессирующих 9-O-ацетилированный GD3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействующие с гликанами антитела направлены против GM2. В некоторых вариантах осуществления направленные на GM2 антитела используют для модулирования межклеточных контактов. В некоторых вариантах осуществления ганглиозидные мишени по настоящему изобретению содержат Neu5Gc. В некоторых вариантах осуществления такие мишени могут включать вариант GM3, содержащий Neu5Gc (в настоящем документе называемый GcGM3). Гликановый компонент GcGM3 представляет собой Neu5Gcα2-3Galβ1-4Glc. GcGM3 является известным компонентом опухолевых клеток (Casadesus, A.V. et al., 2013. Glycoconj J. 30(7):687-99, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления TACA по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один остаток Neu5Gc.

Рекомбинантные антитела.

Рекомбинантные антитела (например, взаимодействующие с гликанами антитела) по изобретению могут быть получены стандартными методами, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные антитела могут представлять собой анти-гликановые антитела. Кроме того, антитела могут представлять собой анти-STn антитела (например, анти-GcSTn или анти-AcSTn ан-

тителa). Рекомбинантные антитела по изобретению могут быть получены с использованием вариабельных доменов из антител, полученных из клеток гибридом способами, описанными в настоящем документе. Последовательности кДНК вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антител можно определять с использованием стандартных биохимических методов. Суммарную РНК можно экстрагировать из продуцирующих антитело клеток гибридомы и превращать в кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскриптазой (ОТ). Можно проводить ПЦР-амплификацию полученной кДНК для амплификации генов вариабельных областей. Такая амплификация может включать использование праймеров, специфичных для амплификации последовательностей тяжелой и легкой цепей. В других вариантах осуществления рекомбинантные антитела могут быть получены с использованием вариабельных доменов, полученных из других источников. Это включает использование вариабельных доменов, выбранных из одной или более библиотек фрагментов антител, например, библиотеки scFv, используемой для пэннинга антигенов. Полученные ПЦР-продукты затем можно субклонировать в плазмиды для анализа последовательностей. После секвенирования кодирующие антитело последовательности можно помещать в экспрессионные векторы. С целью гуманизации, кодирующие последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человеческого антитела можно использовать для замены гомологичных мышиных последовательностей. Полученные конструкты затем можно трансфицировать в клетки млекопитающих для крупномасштабной трансляции.

Анти-Tn антитела.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные антитела по изобретению (например, взаимодействующие с гликанами антитела) могут представлять собой анти-Tn антитела. Такие антитела могут связывать мишени, содержащие Tn. Анти-Tn антитела могут быть специфичными для Tn или могут связывать другие модифицированные формы Tn, например, Tn, связанный с другими фрагментами, включая, но без ограничения, дополнительные углеводные остатки. В некоторых случаях анти-Tn антитела могут представлять собой анти-сиалил-Tn антитела. Такие антитела могут связывать сталированный Tn, содержащий Neu5Ac, и/или сталированный Tn, содержащий Neu5Gc. Некоторые анти-Tn антитела могут специфически связывать кластеры антигена Tn.

Анти-STn антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению (например, взаимодействующие с гликанами антитела) могут специфически связывать STn. Анти-STn антитела по изобретению могут быть отнесены к определенной категории на основании их связывания с определенными фрагментами антигенов STn и/или на основании их специфичности в отношении AcSTn или GcSTn. В некоторых случаях анти-STn антитела по изобретению представляют собой антитела группы 1. Антитела "группы 1" по изобретению представляют собой антитела, способные связывать AcSTn и GcSTn. В настоящем документе такие антитела также могут быть названы антитела против пан-STn из-за их способности связывать структуры STn более широкого диапазона. В некоторых вариантах осуществления антитела группы 1 могут связывать фрагмент STn, указанный наибольшим эллипсом на фиг. 1A. В некоторых случаях анти-STn антитела по изобретению представляют собой антитела группы 2. Антитела "группы 2" по изобретению представляют собой антитела, способные связывать STn, а также некоторые родственные структуры, содержащие O-связи с остатками серина или треонина. В некоторых вариантах осуществления антитела группы 2 могут связывать гликаны, содержащие остаток сиалированной галактозы. В некоторых случаях антитела группы 2 могут связывать фрагмент STn, указанный наибольшим эллипсом на фиг. 1B. Некоторые антитела группы 2 предпочтительно связывают структуры с AcSTn в сравнении со структурами с GcSTn. Следующие анти-STn антитела могут представлять собой антитела группы 3. В настоящем документе антитела "группы 3" представляют собой антитела, способные связывать STn, но также способные связывать более широкую группу родственных структур. В отличие от антител группы 2, для антител группы 3 не требуется, чтобы такие структуры имели O-связь с остатками серина или треонина. В некоторых вариантах осуществления антитела группы 3 могут связывать фрагмент STn, указанный наибольшим эллипсом на фиг. 1C. И наконец, некоторые анти-STn антитела по изобретению могут представлять собой антитела группы 4. В настоящем документе антитела "группы 4" представляют собой антитела, способные связывать как AcSTn, так и GcSTn, а также не сталированный антиген Tn, и, таким образом, имеют более широкую специфичность. В некоторых вариантах осуществления антитела группы 4 могут связывать фрагмент STn, указанный наибольшим эллипсом на фиг. 1D.

В некоторых случаях анти-STn антитела по изобретению могут специфически связывать кластеры STn на конкретном антигене или клеточной поверхности. Некоторые такие антитела могут узнавать эпитопы, образующиеся при образовании кластера STn, в том числе эпитопы, включающие области контакта между соседними структурами STn. Такие эпитопы могут быть образованы при кластеризации 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более структур STn.

В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для связывания клеточных белков, несущих STn. Такие антитела могут быть полезны для таргетирования клеточных белков, связанных с раковыми клетками, которые можно отличать от аналогичных белков в не злокачественных клетках по экспрессии STn. В некоторых случаях такие белки могут включать белки клеточной поверхности. На белки на поверхности раковых клеток, несущие STn, могут

быть направлены анти-STn антитела в процессе лечения и/или диагностирования рака. Белки клеточной поверхности, несущие STn, могут быть идентифицированы методом масс-спектрометрии и/или иммунологическими методами (например, с использованием FACS-анализа, иммунопреципитации, иммуноблоттинга, ELISA и так далее). В некоторых случаях клеточные белки, несущие STn, могут включать маркеры раковых клеток, маркеры раковых стволовых клеток и/или сигнальные белки раковых стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточные белки, несущие STn, могут включать, но без ограничения, CD44, CD133, CD117, интегрины, Notch и Hedgehog.

Компоненты антител.

В некоторых случаях антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по изобретению могут содержать аминокислотные последовательности вариабельных доменов и/или CDR, предложенные в настоящем документе. В некоторых случаях антитела могут содержать любые последовательности антитела, или фрагмента антитела, приведенные в международной патентной публикации номер WO2017083582 (полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), включая: любые из последовательностей вариабельных доменов, приведенных в табл. 2 указанного документа; любые из последовательностей CDR, приведенных в табл. 3 указанного документа; любые из групп последовательностей VH CDR, приведенных в табл. 4 указанного документа; любые из групп последовательностей VL CDR, приведенных в табл. 5 указанного документа; любые из нуклеотидных последовательностей вариабельных доменов, приведенных в табл. 6 указанного документа; или любые из последовательностей гуманизированных вариабельных доменов, приведенных в табл. 11 указанного документа. Некоторые антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, могут включать разные сочетания таких последовательностей, или вариантов, имеющих по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,5% идентичности последовательности. В некоторых случаях антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, по изобретению могут содержать одну или более из последовательностей вариабельных доменов, приведенных ниже в табл. 2. Приведенные вариабельные домены легких цепей могут быть экспрессированы с присутствующим или отсутствующим С-концевым остатком аргинина. Этот остаток, как правило, связывает вариабельные домены легкой цепи с константными доменами легкой цепи и может быть экспрессирован в виде части константного домена легкой цепи вместо вариабельного домена легкой цепи. В некоторых случаях антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут содержать аминокислотную последовательность, имеющую от примерно 50% до примерно 99,9% идентичности последовательности (например, от примерно 50% до примерно 60%, от примерно 55% до примерно 65%, от примерно 60% до примерно 70%, от примерно 65% до примерно 75%, от примерно 70% до примерно 80%, от примерно 75% до примерно 85%, от примерно 80% до примерно 90%, от примерно 85% до примерно 95%, от примерно 90% до примерно 99,9%, от примерно 95% до примерно 99,9%, примерно 97%, примерно 97,5%, примерно 98%, примерно 98,5%, примерно 99%, примерно 99,5%, примерно 99,6%, примерно 99,7% или примерно 99,8%) с одной или более последовательностями вариабельных доменов, приведенными в табл. 2. В некоторых случаях антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по изобретению могут содержать аминокислотную последовательность, содержащую один или более фрагментов любой из приведенных последовательностей.

Таблица 2

Последовательности вариабельных доменов

Домен	Последовательность	SEQ ID NO
mSIA101, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPE QGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLN SLSSDDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTLVTVSA	1
mSIA101, домен VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNRGNHKNYLTWY RQKPGLPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFALTISSVQA EDLAVYYCQNDYTYPYTFGGGTKLEIKR	2
mSIA102, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPE QGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLT SLTSEDSAVYFCKRSYYGDWGQGTTLTVSS	3
mSIA102, домен VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQQKQGKS PQLLVYGATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSLQSEDFGSY YCQHFWGAPFTFGSGTKLEIK	4
mSIA103, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPE QGLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTACMHLN SLTSEDSAVYFCKRSLLALDYWGOGTTLTVSS	5
mSIA103, домен VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTNIAWYQQKPGR SPKVLIYSASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTDY FCQQYSSFPLTFGVGTKLELK	6
hSIA101, домен VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAP GQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAYME LRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGOGTLVTVSS	7
hSIA101, домен VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQNDYTYPYTFGOGTKVEIK	8
hSIA102, домен VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVRQAPG QGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYMELRS LRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTLVTVSS	9
hSIA102, домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQQKPGKA PKLLVYGATNLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFATYY CQHFWGAPFTFGQGTKVEIK	10
hSIA103, домен VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAP GQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTAYMQ LRSLRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGOGTLVTVSS	11
hSIA103, домен VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQKPGK APKVLIYSASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYF COOYSSFPLTFGOGTKVEIK	12

В некоторых случаях антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, по изобретению могут содержать любую из последовательностей IgG, приведенных в табл. 3. В некоторых случаях антитела, или их фрагменты, могут содержать аминокислотную последовательность, имеющую от примерно 50% до примерно 99,9% идентичности последовательности (например, от примерно 50% до примерно 60%, от примерно 55% до примерно 65%, от примерно 60% до примерно 70%, от примерно 65% до примерно 75%, от примерно 70% до примерно 80%, от примерно 75% до примерно 85%, от примерно 80% до примерно 90%, от примерно 85% до примерно 95%, от примерно 90% до примерно 99,9%, от примерно 95% до примерно 99,9%, примерно 97%, примерно 97,5%, примерно 98%, примерно 98,5%, примерно 99%, примерно 99,5%, примерно 99,6%, примерно 99,7% или примерно 99,8%) с одной или более из приведенных последовательностей константных доменов. В некоторых случаях антитела, или их фрагменты, по изобретению могут содержать аминокислотную последовательность, содержащую один или более фрагментов любой из приведенных последовательностей.

Таблица 3

Последовательности константных доменов IgG

Домен	Последовательность	SEQ ID NO
Мышиное IgG2a, области константного домена тяжелой цепи	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSWIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	13
Мышиное IgG2a, константная область легкой цепи каппа	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASWCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSY TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	14
Человеческое IgG1, константные области тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
Человеческое IgG1, константные области легкой цепи	RTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фрагментам антител, полученным с использованием одной или более последовательностей антител, или родственных вариантов, приведенных выше. Такие фрагменты антител могут включать фрагменты scFv, Fab, или любые другие фрагменты антител, в том числе, любые из тех, которые описаны в настоящем документе.

Гуманизированные антитела.

"Гуманизированные" формы не принадлежащих человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. В основном, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в котором остатки из гипервариабельной области антитела-реципиента заменены остатками из гипервариабельной области антитела биологического вида, отличного от человека (антитело-донор), такого как мышь, крыса, кролик или примат, имеющими нужную специфичность, аффинность и эффективность.

Для конструирования экспрессионных плазмид, кодирующих полностью гуманизированные антитела с человеческими константными областями, последовательности ДНК, кодирующие вариабельную область антитела, могут быть вставлены в экспрессионные векторы (например, экспрессионные векторы клеток млекопитающих) между расположенным выше промотором/энхансером, например, предранним промотором/энхансером цитомегаловируса (CMV IE), плюс сигнальная последовательность иммуноглобулина, и расположенным ниже геном константной области иммуноглобулина. Затем можно готовить образцы ДНК для трансфекции в клетки млекопитающих.

Для получения линий клеток и селекции полностью гуманизированных антител, пары плазмидных ДНК тяжелой и легкой цепей могут быть трансфицированы в клетки для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы клетки NS0 млекопитающих. Линии клеток, продуцирующих гуманизированные антитела, могут быть размножены для экспрессии антител, которые могут быть собраны и очищены из культуральной среды клеток.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела могут иметь перекрестную реактивность с антителами от видов, отличных от человека. Видовая перекрестная реактивность может позволять использовать антитела в организме других животных для разных целей. Например, перекрестно реагирующие антитела можно использовать в доклинических исследованиях на животных для полу-

чения информации об эффективности и/или токсичности антитела. Биологические виды, отличные от человека, могут включать мышь, крысу, кролика, собаку, свинью, козу, овцу или примата, такого как яванский макак.

Синтез IgG.

IgG антитела (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащие одну или более аминокислотных последовательностей вариабельных доменов и/или CDR, приведенных в настоящем документе (либо их фрагменты или варианты), могут быть синтезированы для дальнейшего тестирования и/или разработки препарата. Такие антитела могут быть получены путем вставки одного или более сегментов кДНК, кодирующих нужные аминокислотные последовательности, в экспрессионные векторы, подходящие для продуцирования IgG. Экспрессионные векторы могут включать экспрессионные векторы млекопитающих, подходящие для экспрессии IgG в клетках млекопитающих. Можно проводить экспрессию IgG в клетках млекопитающих, чтобы убедиться, что полученные антитела имеют модификации (например, гликозилирование), характерные для белков млекопитающих, и/или чтобы убедиться, что препараты антител не содержат эндотоксин и/или другие примеси, которые могут присутствовать в белковых препаратах из бактериальных экспрессионных систем.

Иммуногенные хозяева.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть получены с использованием при иммунизации в качестве хозяев животных, отличных от человека, которых в настоящем документе называют "иммуногенные хозяева". В некоторых вариантах осуществления иммуногенными хозяевами являются млекопитающие. В некоторых вариантах осуществления иммуногенными хозяевами являются трансгенные нокаутные мыши. Антигены, имеющие сайты-мишени и/или эпитопы-мишени для взаимодействующих с гликанами антител, могут быть использованы в контакте с иммуногенными хозяевами с целью стимуляции иммунного ответа и продуцирования в организме иммуногенного хозяина антител, которые специфически связывают сайты-мишени и/или эпитопы-мишени, присутствующие на введенных антигенах.

Антитела, полученные путем иммунизации, могут быть выделены из сыворотки иммуногенных хозяев. Антитело-продуцирующие клетки от иммуногенных хозяев также могут быть использованы для получения линий клеток, продуцирующих нужное антитело. В некоторых вариантах осуществления можно проводить скрининг на антитела и/или антитело-продуцирующие клетки от иммуногенного хозяина с использованием твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA) и/или гликановых матриц.

Последовательность антитела, структурный анализ и оптимизация.

В некоторых вариантах осуществления для антител по настоящему изобретению можно выполнять анализ последовательностей и/или структурный анализ, в которых их анализируют в отношении характеристик, которые могут влиять на химические свойства, аффинность, специфичность, укладку белка, стабильность, производственные характеристики, экспрессию и/или иммуногенность (то есть индукцию иммунных реакций у субъектов, получающих лечение такими антителами) антитела. Такой анализ может включать сравнения между антителами, связывающими одни и те же или аналогичные эпитопы.

Последовательности антител, связывающих один и тот же эпитоп, можно анализировать на вариации в последовательностях легкой и/или тяжелой цепи. Такой анализ может включать анализ последовательностей зародышевой линии и/или последовательностей CDR. Информацию, полученную в таком анализе, можно использовать для идентификации (и, необязательно, для модификации, удаления, замены или восстановления) консервативных аминокислотных остатков; консервативных сегментов аминокислот; аминокислотных положений с консервативными характеристиками боковых цепей; консервативной длины областей CDR; и других признаков, консервативных среди антител, связывающих один и тот же эпитоп. Эту информацию можно использовать для проектирования вариантов или для разработки методов оптимизации антител с целью усовершенствования аффинности, специфичности, укладки белка, стабильности, производственных характеристик, экспрессии и/или иммуногенности антитела.

Анализ последовательностей может включать выравнивание последовательностей двух или более антител, связывающих одинаковые или аналогичные эпитопы, для выявления сходства. В таком анализе можно сравнивать последовательность и/или длину областей антитела (например, CDR, вариабельных доменов, сегментов зародышевой линии). Можно выявлять и оценивать аминокислотные вставки, аминокислотные делеции и замены. Различия в последовательностях можно сравнивать с точки зрения аффинности и/или специфичности антитела.

В некоторых случаях анализ последовательностей проводят для выявления (и, необязательно, для модификации, удаления, замены или восстановления) одного или более неспаренных остатков цистеина или необычных дисульфидных связей; сайтов гликозилирования (например, сайтов N-связанных NXS/T); сайтов кислотного расщепления, сайтов аминокислотного окисления, сходства с мышиными последовательностями зародышевой линии; сайтов дезамидирования аспарагина; сайтов изомеризации аспартата; сайтов образования N-концевого пироглутамата и склонных к агрегации фрагментов в CDR.

В некоторых случаях настоящее изобретение относится к обусловленным анализом последовательности вариантам антител, представленных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "обусловленный анализом последовательности вариант" означает вариант антитела, который

был модифицирован на основании одного или более выводов из анализа последовательности антитела. В некоторых случаях антитела по изобретению могут быть модифицированы для получения вариантов антител, которые имеют модификации одного или более из: аффинности, специфичности, укладки белка, стабильности, производственных характеристик, экспрессии и/или иммуногенности антитела.

Некоторые обусловленные анализом последовательности варианты имеют модификацию длины одной или более областей CDR. Антитела с модифицированной длиной CDR могут иметь одну или более добавленных или удаленных аминокислот в одной или более областях CDR относительно исходной последовательности антитела. В некоторых случаях обусловленные анализом последовательности варианты могут иметь замену одной или более областей CDR одной или более областями CDR из другого антитела (например, антитела, связывающего тот же или аналогичный эпитоп). В некоторых случаях обусловленные анализом последовательности варианты могут иметь замену вариабельного домена тяжелой или легкой цепи из другого антитела (например, антитела, связывающего тот же или аналогичный эпитоп). Обусловленные анализом последовательности варианты могут иметь модификации в одном или более генах зародышевой линии, с которых экспрессируется антитело. Такие модификации могут включать точечные мутации, мутации области, мутации вставки или мутации делеции. В некоторых случаях модификации генов зародышевой линии проводят для перемещения CDR с одного известного гена зародышевой линии на другой. Обусловленные анализом последовательности варианты могут включать другие варианты, описанные в настоящем документе, в том числе, но без ограничения, scFv, монотела, диатела, интратела, CAR, миметики антител и так далее.

В некоторых вариантах осуществления анализ последовательности и/или структуры можно использовать с целью получения информации для конструирования библиотек дисплея фрагментов антител (включая, но без ограничения, библиотеки scFv, библиотеки фагового дисплея и библиотеки дрожжевого дисплея). В одном примере можно проводить выравнивание последовательностей для выравнивания последовательностей двух или более антител, имеющих общий антиген или эпитоп, и можно идентифицировать аминокислотные остатки, консервативные у выровненных антител или вариабельные у выровненных антител. В таких случаях можно конструировать библиотеки дисплея фрагментов антител таким образом, что вариабельность между членами библиотеки в основном ограничена вариабельными аминокислотами, идентифицированными в анализе последовательности. В некоторых случаях такие библиотеки можно использовать для выявления вариантов с измененной аффинностью и/или специфичностью в отношении антигена-мишени (например, STn) или конкретного эпитопа антигена-мишени (например, эпитопов, узнаваемых антителами группы 1, 2, 3 и 4, как описано в примере 1, далее в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут быть модифицированы для удаления, замены или иным способом элиминации одного или более неспаренных остатков цистеина. В некоторых случаях неспаренные остатки цистеина могут быть реакционноспособными, и в некоторых случаях могут влиять на аффинность и/или специфичность антитела. Соответственно, некоторые антитела по изобретению были модифицированы для элиминации неспаренных остатков цистеина. В некоторых случаях такие варианты могут иметь модифицированную специфичность и/или аффинность для эпитопа. В некоторых случаях модификация неспаренных остатков цистеина может приводить к модификации укладки антитела. В некоторых случаях эти варианты имеют замену или делецию одного или более остатков цистеина. В некоторых случаях эти варианты имеют один или более дополнительных аминокислотных остатков (включая, но без ограничения, добавление одного или более остатков цистеина) для предотвращения или уменьшения нежелательных эффектов неспаренных остатков цистеина. В некоторых случаях остатки цистеина заменены аминокислотой, имеющей гидрофобную боковую цепь (например, такой как тирозин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин или триптофан).

Тестирование и характеризация антител.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть протестированы и/или охарактеризованы с использованием различных методов. Такие методы могут быть использованы для определения различных характеристик, которые могут включать, но без ограничения, аффинность, специфичность и активность (например, активацию или ингибирование клеточных сигнальных путей или других видов клеточной или биологической активности) антитела. Тестирование антитела также может включать тестирование in vivo (например, в исследованиях на животных и/или с участием людей) одного или более из: токсичности, терапевтического эффекта, фармакодинамики, фармакокинетики, абсорбции, отложения, метаболизма и экскреции. Тестирование на животных может включать, но не ограничивается ими, тестирование на мышах, крысах, кроликах, морских свинках, свиньях, приматах (например, яванских макаках), овцах, козах, лошадях и крупном рогатом скоте.

Клеточные анализы.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть протестированы или охарактеризованы с использованием одного или более клеточных анализов. Такие клеточные анализы можно проводить in vitro с клетками в культуре. В некоторых случаях клеточные анализы можно проводить in vivo. Примеры in vivo клеточных анализов включают опухолевые модели, в которых опухолевые клетки инъецируют или иным образом вводят хозяину.

В некоторых случаях клетки, используемые в клеточных анализах, могут экспрессировать один или более гликанов-мишеней, узнаваемых одним или более антителами по изобретению. Такие гликаны могут быть естественным образом экспрессированы клетками или, альтернативно, клетки могут быть индуцированы для экспрессии одного или более гликанов, необходимых для целей конкретного анализа. Экспрессия может быть индуцирована одной или более обработками, которые приводят к повышению экспрессии гликозилированных белков или ферментов, регулирующих гликозилирование. В других случаях индуцированная экспрессия может включать трансфекцию, трансдукцию или иную форму введения одного или более генов или транскриптов для эндогенной экспрессии одного или более гликозилированных белков или ферментов, участвующих в регуляции гликозилирования.

В некоторых случаях клеточные анализы, описанные в настоящем документе, могут включать использование раковых клеток. Множество раковых линий клеток доступны для экспериментов по тестированию антител по изобретению. Такие клетки могут экспрессировать гликан-мишень или могут быть индуцированы для экспрессии гликанов-мишеней. Кроме того, для тестирования антител по изобретению могут быть использованы раковые линии клеток, которые представляют собой репрезентативные раковые стволовые клетки. Клеточные линии раковых стволовых клеток (CSC) могут быть выделены или дифференцированы из раковых клеток, растущих в культуре (например, путем сортировки на основании маркеров, специфических для раковых стволовых клеток). Линии клеток, используемые в клеточных анализах, могут включать, но без ограничения, линии клеток рака молочной железы, толстой кишки, яичника, лимфоцитов, костного мозга и кожи. Конкретные линии клеток могут включать, но без ограничения, клетки SNU-16, клетки LS-174T, клетки MC38, клетки TOV-112D, клетки TOV-21G, клетки Jurkat E6.1, клетки K-562, клетки B16-F0, клетки B16-F10, клетки LS180, клетки COLO205, клетки TB4, клетки HT29, клетки Pancl, клетки HPAC, клетки HPAFII, клетки RKO, клетки SW480 и клетки SNU-C2A.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать линии клеток рака яичника. Такие линии клеток могут включать, но без ограничения, линии клеток SKOV3, OVCAR3, OV90 и A2870. В некоторых случаях клетки CSC могут быть выделены из этих линий клеток путем выделения клеток, экспрессирующих клеточные маркеры CD44 и/или CD133.

Клетки OVCAR3 впервые были получены с использованием злокачественных асцитов, полученных от пациента, страдающего прогрессирующей аденокарциномой яичников (Hamilton, T.C. et al., 1983. Cancer Res. 43: 5379-89). Популяции раковых стволовых клеток могут быть выделены из культур клеток OVCAR3 путем селекции, основанной на специфических маркерах клеточной поверхности, таких как CD44 (участвующий в клеточной адгезии и миграции), CD133 и CD117 (Liang, D. et al., 2012. BMC Cancer. 12: 201, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Клетки OV90 представляют собой клетки эпителиального рака яичника, которые были аналогичным образом получены из человеческих асцитов (смотри патент США № 5710038). Клетки OV-90 при активации также могут экспрессировать CD44 (Meunier, L. et al., 2010. Transl Oncol. 3(4): 230-8).

Гликановые матрицы.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению можно получать с использованием гликановых матриц. Используемый в настоящем документе термин "гликановая матрица" означает инструмент, используемый для идентификации веществ, которые взаимодействуют с любым из ряда разных гликанов, связанных с субстратом матрицы. В некоторых вариантах осуществления гликановые матрицы включают ряд химически синтезированных гликанов, в настоящем документе называемых "гликановыми зондами". В некоторых вариантах осуществления гликановые матрицы включают по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 350, по меньшей мере 1000 или по меньшей мере 1500 гликановых зондов. В некоторых вариантах осуществления гликановые матрицы могут быть изготовлены по индивидуальному заказу для представления нужного набора гликановых зондов. В некоторых вариантах осуществления гликановые зонды могут быть присоединены к субстрату матрицы при помощи молекулы линкера. Такие линкеры могут включать молекулы, такие как, но без ограничения, $-O(CH_2)_2CH_2)NH_2$ и $O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$.

В некоторых вариантах осуществления гликановая матрица содержит более 70 химически синтезированных гликанов, большинство из которых представлены в виде Neu5Ac и Neu5Gc-содержащих гликановых пар. Некоторые примеры гликановых зондов могут включать: Neu5Ac-α-2-6-GalNAc (AcSTn); Neu5Gc-α-2-6-GalNAc (GcSTn); Neu5,9Ac2-α-2,6-GalNAc; Neu9Ac5Gc-α-2,6-GalNAc и GalNAc (Tn). Специфичность связывания антитела с AcSTn в сравнении с GcSTn можно определять с использованием матрицы или других способов определения специфичности, известных в данной области. Кроме того, можно определять профиль связывания антител с O-ацетилированным STn. Утрата O-ацетилирования на STn имеет отношение к раку, поскольку связанная с раком экспрессия коррелирует с повышенным узнаванием STn антителами (Ogata, S. et al., Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa. Cancer Res. 1995 May 1; 55(9): 1869-74). В некоторых случаях гликановые

матрицы могут быть использованы для определения узнавания STn в сравнении с Tn.

Методы скрининга библиотек дисплея фрагментов антител.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть получены и/или оптимизированы с использованием методов исследования с высокой пропускной способностью. Такие методы могут включать любой из методов дисплея (например, методов скрининга библиотек дисплея), раскрытых в международной патентной заявке № WO2014074532, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления синтетические антитела могут быть спроектированы, отобраны или оптимизированы путем скрининга при помощи антигенов-мишеней с использованием технологий дисплея (например, технологий фагового дисплея). Библиотеки фагового дисплея могут включать миллионы и миллиарды фаговых частиц, все из которых экспрессируют уникальные фрагменты антител на своих вирусных оболочках. Такие библиотеки могут являться богатыми источниками, которые могут быть использованы для отбора потенциально сотен фрагментов антител с различными уровнями аффинности в отношении одного или более интересующих антигенов (McCafferty, et al., 1990. Nature. 348:552-4; Edwards, B.M. et al., 2003. JMB. 334: 103-18; Schofield, D. et al., 2007. Genome Biol. 8, R254 и Pershad, K. et al., 2010. Protein Engineering Design and Selection. 23:279-88; содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Часто фрагменты антител, присутствующие в таких библиотеках, включают фрагменты scFv антител, которые представляют собой слитый белок из доменов VH и VL антитела, соединенных гибким линкером. В некоторых случаях scFv могут содержать одинаковые последовательности за исключением уникальных последовательностей, кодирующих вариабельные петли определяющих комплементарность областей (CDR). В некоторых случаях scFv экспрессируются в виде слитых белков, связанных с белками вирусной оболочки (например, N-концом белка pill вирусной оболочки). Цепи VL могут экспрессироваться отдельно, для сборки с цепями VH в периплазме перед включением комплекса в вирусную оболочку. Осажденные члены библиотеки можно секвенировать из связанного фага для получения кДНК, кодирующей нужный scFv. Такие последовательности могут быть непосредственно включены в последовательности антител для рекомбинантного продуцирования антител, или подвергнуты мутации и использованы для дальнейшей оптимизации за счет in vitro созревания аффинности.

Получение цитотоксических антител.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть способны к индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). ADCC представляет собой иммунный механизм, обеспечивающий лизис клеток в результате атаки иммунных клеток. Такие иммунные клетки могут включать CD56+ клетки, CD3- клетки - естественные киллеры (NK), моноциты и нейтрофилы ((Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 8, p186, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых случаях антитела по настоящему изобретению могут быть сконструированы для включения конкретного изотипа в зависимости от того, есть ли необходимость в ADCC или ADCP при связывании антитела. Такие антитела, например, могут быть сконструированы любым из способов, описанных в публикации Alderson, K.L. et al., J Biomed Biotechnol. 2011. 2011:379123). В случае мышиных антител, антитела разных изотипов более эффективны для стимуляции ADCC. IgG2a, например, более эффективно для индукции ADCC, чем IgG2b. Некоторые антитела по настоящему изобретению, включая мышиные IgG2b антитела, могут быть перепроектированы для создания из них IgG2a антител. Такие перепроектированные антитела могут быть более эффективными для индукции ADCC при связывании ассоциированных с клетками антигенов. В некоторых вариантах осуществления антитела перепроектируют путем модифицирования или введения одной или более посттрансляционных модификаций для усиления биологической активности в виде ADCC и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие вариабельные области антител, получаемых способами по настоящему изобретению, можно клонировать в экспрессионные векторы млекопитающих, кодирующие Fc-области человеческого антитела. Такие Fc-области могут представлять собой Fc-области из IgG1κ человека. Fc-области IgG1κ могут иметь аминокислотные мутации, которые, как известно, вызывают усиление связывания Fc-рецептора и ADCC.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут быть разработаны для вариантов терапевтического применения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). ADC представляют собой антитела, к которым присоединены одна или более нагрузок (например, лекарственных средств) [например, непосредственно или через линкер (например, расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер)]. ADC полезны для доставки лекарственных средств (например, терапевтических средств или цитотоксических средств) к одной или более клеткам-мишеням или тканям-мишеням (Panowski, S. et al., 2014. mAbs 6:1, 34-45). В некоторых случаях ADC могут быть разработаны для связывания с поверхностным антигеном на клетке-мишени. После связывания весь комплекс антитело-антиген может быть интернализован и направлен в лизосому клетки. Затем ADC может быть разрушен, с высвобождением связанной нагрузки. Если нагрузка представляет собой цитотоксическое средство, клетка-

мишень будет уничтожена или иным образом инактивирована. Цитотоксические средства могут включать, но без ограничения, ингибиторы цитоскелетной системы [например, ингибиторы полимеризации тубулина и ингибиторы важного для веретена деления белка кинезина (KSP)], повреждающие ДНК средства (например, калихеамицины, дуокармицины и димеры пирролобензодиазепина, такие как талирин и тезирин), ингибиторы топоизомеразы [например, соединения или производные камптотецина, такие как 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38), и производное экзатекана DXd], ингибиторы транскрипции (например, ингибиторы РНК-полимеразы, такие как аманитин) и ингибиторы киназы [например, ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) или ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы ((MEK)].

Ингибиторы полимеризации тубулина могут включать, но без ограничения, майтанзины (например, эмтанзин [DM1] и равтанзин [DM4]), ауристатины, тубулизины и алкалоиды барвинка, или их производные. Иллюстративные ауристатины включают ауристатин E (также известный как производное доластатина-10), ауристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), ауристатин F и доластатин. Иллюстративные соединения тубулизина включают природные тубулизины A, B, C, D, E, F, G, H, I, U и V, и аналоги тубулизина, такие как претубулизин D (PTb-D43) и N^{14}-дезацетокситубулизин H (Tb1). Иллюстративные алкалоиды барвинка включают винкристин, винбластин, виндезин и навелбин (винорелбин). В некоторых вариантах осуществления цитотоксические средства могут включать производные ауристатина [например, 1-аминопропан-2-илауристатин F, ауристатин F-гидроксипропиламид, ауристатин F-пропиламид, ауристатин F-фенилендиамин (AFP)]; производные тубулизина; производные алкалоидов барвинка [например, N-(3-гидроксипропил)виндезин (HPV)], а также любых из тех, которые описаны в патентах США № 8524214; 8685383; 8808679 и 9254339; публикациях патентных заявок США US20150314008A1, US20160220696A1 и US20160022829A1; содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению могут дополнительно включать один или более полимерных носителей, соединяющих антитело и лекарственные средства (например, конъюгаты антитело-полимер-лекарственное средство). Используемый в настоящем документе термин "полимерный носитель" означает полимер или модифицированный полимер, который может быть ковалентно присоединен к одному или более лекарственным средствам и/или антителам. Полимерные носители могут предоставлять дополнительные сайты конъюгации для лекарственных средств, увеличивая соотношение лекарственного средства и антитела, и усиливая терапевтические эффекты ADC. В некоторых вариантах осуществления полимерные носители, используемые по настоящему изобретению, могут быть водорастворимыми и/или биоразлагаемыми. Такие полимерные носители могут включать, но без ограничения, поли(этиленгликоль) (PEG), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламид) (полиHPMA), поли(α-аминокислоты) [например, поли(L-лизин), поли(L-глутаминовую кислоту) и поли((N-гидроксиалкил)глутамин)], углеводные полимеры [например, декстрины, гидроксиэтилкрахмал (HES) и полисиаловую кислоту], гликополисахариды (например, гомополисахарид, такой как целлюлоза, амилоза, декстран, леван, фукоидан, каррагинан, инулин, пектин, амилопектин, гликоген и ликсенан; или гомополисахарид, такой как агароза, гилуронан, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат, альгиновая кислота и гепарин), гликолипиды, гликоконъюгаты, полиглицерины, поливиниловые спирты, поли(акриловую кислоту), поликеталь и полиацеталь [например, поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаль), также известный как PHF или FLEXIMER®, описанный в патентах США № 5811510; 5863990 и 5958398; содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме], а также их производные, дендримеры, сополимеры и смеси. Например, полимерный носитель может включать сополимер полиацеталя/поликеталя (например, PHF) и гидрофильного полимера, такого как полиакрилаты, поливиниловые полимеры, полиэфиры, полиортоэфиры, полиамиды, полипептиды и их производные.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные средства присоединены (например, ковалентно связаны) к антителам по изобретению непосредственно или через линкеры. В некоторых вариантах осуществления лекарственные средства присоединены к полимерным носителям непосредственно или через линкеры, и полимерные носители присоединены к антителам непосредственно или через линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут включать фрагмент щавелевой, малоновой, янтарной, глутаровой, адипиновой, пимелиновой, пробковой, азелаиновой, себациновой, фталевой, изофталевой, терефталевой, дигликолевой кислоты, виннокаменной, глутаминовой, фумаровой или аспарагиновой кислоты, включая амидные, имидные или циклические имидные производные каждой из них, и каждые из них, необязательно, замещенные. Иллюстративные линкеры могут включать любой из линкеров, описанных в патентах США № 8524214; 8685383; 8808679; 9254339 и/или 9555112, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления линкеры могут представлять собой расщепляемые линкеры. Расщепляемые линкеры могут разрушаться в определенных условиях (таких как изменение pH, температуры, или восстановление) или расщепляться ферментами (например, протеазами и глюкуронидазами), с высвобождением лекарственных средств из ADC. Такие линкеры могут содержать лабильную связь, та-

кую как сложноэфирная связь, амидная связь или дисульфидная связь. Неограничивающие примеры расщепляемых линкеров могут включать pH-чувствительные линкеры (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, тиоэфир, ортоэфир, ацеталь или кеталь); чувствительные к восстановлению линкеры [например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) и N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-4-(1-(пиридин-2-илдисульфанил)этил)бензоат (SMPT)]; фоточувствительные линкеры и ферментативно расщепляемые линкеры [например, пептидные линкеры, такие как валин-цитруллин, валин-цитруллин-п-аминобензоилоксикарбонил (vc-PAB), малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензоилоксикарбонил (MC-vc-PAB), линкеры, расщепляемые глюкуронидазами, такие как глюкуронид-MABC, или линкеры, расщепляемые эстеразами].

В других вариантах осуществления линкеры могут представлять собой нерасщепляемые линкеры. Нерасщепляемые линкеры могут увеличивать стабильность в плазме ADC в сравнении с расщепляемыми линкерами. Иллюстративные примеры нерасщепляемых линкеров включают малеинимидалкан и малеинимидциклогексан (MCC).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению могут быть получены с использованием любого способа, известного в данной области. Например, лекарственные средства могут быть модифицированы для содержания функциональной группы, которая может вступать в реакцию с функциональной группой на антителе. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть получены путем реакции двух функциональных групп, с образованием конъюгата. В некоторых случаях полимерные носители могут быть модифицированы для содержания функциональных групп, которые могут вступать в реакцию с функциональной группой на лекарственных средствах и функциональной группой на антителе в разных химических условиях. Антитела, полимерные носители и лекарственные средства могут быть связаны, с образованием конъюгатов антитело-полимер-лекарственное средство, за счет цепи последовательных химических реакций. Для конъюгации с антителами можно использовать остаток лизина или цистеина в качестве сайта конъюгации. В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть сконструированы для содержания дополнительных остатков лизина или цистеина. Такие подходы могут помогать избегать разрушения структуры антитела (например, межцепочечных дисульфидных связей) и поддерживать стабильность и/или активность антитела.

Как описано в настоящем документе, соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) представляет собой среднее число лекарственных средств (например, терапевтических средств или цитотоксических средств), конъюгированных с антителами. В некоторых вариантах осуществления соотношение лекарственного средства и антитела в ADC по изобретению составляет по меньшей мере 1:1, по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 8:1, по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 12:1, по меньшей мере 15:1, по меньшей мере 20:1 или по меньшей мере 25:1.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут быть протестированы на их способность стимулировать гибель клеток, находясь в форме ADC. Анализы на жизнеспособность клеток можно проводить в присутствии и в отсутствие конъюгатов вторичное антитело-лекарственное средство. Антитела, эффективно ингибирующие рост клеток, затем могут быть использованы для проектирования прямых конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Использование таких конъюгатов вторичное антитело-лекарственное средство в анализах клеточной цитотоксичности может позволить быстро проводить предварительный скрининг многих ADC-кандидатов. В таких анализах неконъюгированное антитело-кандидат непосредственно добавляют к клеткам в присутствии вторичного антитела, конъюгированного с одним или более цитотоксическими средствами (называемого в настоящем документе 2°ADC). Интернализация комплекса антитело/2°AOC в клетки, которые экспрессируют на высоком уровне антиген-мишень, может приводить к зависимому от дозы высвобождению лекарственного средства в клетках, вызывая цитотоксический эффект уничтожения клеток (например, опухолевых клеток), при этом клетки, экспрессирующие на низком уровне антиген-мишень, не страдают (например, нормальные клетки).

ADC по изобретению могут быть сконструированы для таргетирования раковых клеток. Такие ADC могут включать антитела, направленные на один или более опухоль-ассоциированных углеводных антигенов (TACA). В некоторых случаях ADC по изобретению представляют собой анти-STn антитела. В некоторых вариантах осуществления ADC содержат один или более из вариабельных доменов, приведенных в табл. 2. Такие ADC также могут содержать по меньшей мере одну константную область IgG человека, включая, но без ограничения, любую из тех, которые приведены в табл. 3.

Получение химерных антигенных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления последовательности антител по изобретению можно использовать для создания химерного антигенного рецептора (CAR). CAR представляют собой экспрессируемые на иммунных клетках трансмембранные рецепторы, которые способствуют узнаванию и уничтожению клеток-мишеней (например, опухолевых клеток). CAR, как правило, включают три основные части. Они представляют собой эктодомен (также известный как домен узнавания), трансмембранный домен и внутриклеточный (сигнальный) домен.

Эктодомены способствуют связыванию с клеточными антигенами на клетках-мишенях, в то время как внутриклеточные домены, как правило, выполняют функции клеточной сигнализации для стимуляции уничтожения связанных клеток-мишеней. Кроме того, они могут иметь внеклеточный домен с одним или более вариабельными доменами антитела, описанными в настоящем документе, или их фрагментами. CAR по изобретению также включают трансмембранный домен и цитоплазматический фрагмент. CAR могут быть сконструированы для содержания одного или более сегментов антитела, вариабельного домена антитела и/или CDR антитела, так что, когда такие CAR экспрессируются на иммунных эффекторных клетках, иммунные эффекторные клетки связывают и уничтожают любые клетки, которые узнают фрагменты антитела CAR.

Характеристики CAR включают их способность перенаправлять специфичность и реакционную способность Т-клеток на выбранную мишень независимым от MHC образом, используя антигенсвязывающие свойства моноклональных антител. Не ограниченное MHC узнавание антигена придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность узнавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом, обходя основной защитный механизм опухолей. Кроме того, при экспрессии на Т-клетках CAR, предпочтительно, не димеризуется с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

CAR, сконструированные для таргетирования опухолей, могут иметь специфичность для одного или более опухоль-ассоциированных углеводных антигенов (TACA). В некоторых вариантах осуществления эктодомены таких CAR могут содержать один или более вариабельных доменов антитела или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируются на Т-клетках, которые могут быть названы "CAR-модифицированные Т-клетки" или "CAR-T". CAR-T могут быть сконструированы с эктодоменами CAR, имеющими один или более вариабельных доменов антитела.

Структурные особенности химерных антигенных рецепторов.

С использованием технологии переноса генов Т-клетки могут быть модифицированы для стабильной экспрессии на их поверхности антител, придающих нужную антигенную специфичность. В химерных антигенных рецепторах (CAR) объединены узнающий антиген домен конкретного антитела с внутриклеточным доменом цепи CD3-дзета или белком FcγRI, имеющими свойства активации Т-клеток, в один химерный слитый белок. Технология CAR обеспечивает не ограниченное MHC узнавание клеток-мишеней Т-клетками. Устранение ограничений, связанных с MHC, для Т-клеток облегчает использование этих молекул для любого пациента и, кроме того, как в $CD8^+$, так и в $CD4^+$ Т-клетках, обычно имеющих ограничения в отношении эпитопов MHC класса I или II, соответственно. Использование связывающих областей Ат позволяет Т-клеткам реагировать на эпитопы, образованные не только белком, но также углеводом и липидом. Такой подход с химерным рецептором особенно подходит для иммунотерапии рака, поскольку позволяет обходить многие из механизмов, с помощью которых опухоли избегают узнавания иммунной системой, таких как понижающая регуляция MHC, отсутствие экспрессии костимулирующих молекул, устойчивость к CTL и индукция Т-клеточной супрессии, и при этом использование как $CD8^+$ CTL, так и $CD4^+$ Т-клеток, позволяет комбинировать эффекты для оптимальной противоопухолевой эффективности. Показано, что такой подход применим к широкому диапазону опухолевых антигенов, в дополнение к вирусам, таким как ВИЧ (Finney, et al., J. Immunology, 2004, 172:104-113).

Хотя химерные антигенные рецепторы могут инициировать Т-клеточную активацию аналогично эндогенным Т-клеточным рецепторам, на практике, клиническому применению технологии CAR препятствовало недостаточное in vivo размножение Т-клеток с химерным антигенным рецептором. Например, CAR первого поколения включали в качестве их сигнального домена цитоплазматическую область CD3ξ или γ-цепь Fc-рецептора. Эти CAR первого поколения были протестированы в фазе I клинических испытаний у пациентов с раком яичника, раком почки, лимфомой и нейробластомой, и, как было обнаружено, вызывали умеренные ответы, эффективно перенаправляя Т-клеточную цитотоксичность, но без возможности пролиферации и выживания Т-клеток при повторяющемся воздействии антигена. Прототипы CAR второго поколения включали рецепторы, имеющие как CD28, так и CD3ξ, и CAR второго поколения были протестированы в лечении В-клеточных злокачественных новообразований и других видов рака (Sadelain, et al., (2009) Current Opinion in Immunology, 21(2):215-223). Таким образом, CAR быстро размножались в разнообразную палитру рецепторов с разными функциональными свойствами.

Недавно было обнаружено, что опосредованные CAR Т-клеточные ответы могут быть усилены за счет добавления костимулирующего домена. В доклинических исследованиях на моделях было установлено, что включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно увеличивает противоопухолевую активность и in vivo персистенцию химерных антигенных рецепторов, в сравнении с включением одной только цепи CD3-дзета (Porter, et al., N. Engl. J. Med. 2011, 365:725-733).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности антител по изобретению могут быть использованы для создания химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR представляют собой трансмембранные рецепторы, экспрессированные на иммунных клетках, которые облегчают узнавание и уничтожение клеток-мишеней (например, опухолевых клеток).

При многих видах рака опухоль-специфические антигены для таргетирования не были определены, однако в случае В-клеточных новообразований CD19 является многообещающей мишенью. Экспрессия CD19 ограничена нормальными и злокачественными В-клетками и предшественниками В-клеток. Пилотное клиническое исследование лечения аутологичными Т-клетками, экспрессирующими анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CART 19) проводили с участием пациентов с запущенным, p53-дефицитным хроническим лимфоидным лейкозом (CLL). Развитие CD19-специфического иммунного ответа в костном мозге было продемонстрировано на основании временного высвобождения цитокинов и абляции лейкозных клеток, что совпадало с пиком инфильтрации Т-клеток с химерным антигенным рецептором. (Porter, et al., N. Engl. J. Med. 2011, 365:725-733).

Дополнительные структурные особенности CAR могут включать любые из тех, которые описаны в нескольких PCT публикациях, права на которые переуступлены Городу Надежды, и которые имеют общего автора изобретения Michael Jensen. Например, в PCT публикации WO 00/23573 описаны генетически модифицированные CD20-специфические перенаправленные Т-клетки, экспрессирующие белок клеточной поверхности, имеющий внеклеточный домен, который содержит рецептор, специфичный для CD20, внутриклеточный сигнальный домен и трансмембранный домен. Применение таких клеток для клеточной иммунотерапии $CD20^+$ злокачественных новообразований и для устранения любой неблагоприятной функции В-клеток. В одном варианте осуществления белок клеточной поверхности представляет собой одноцепочечный рецептор FvFc:ξ, где Fv обозначает цепи VH и VL одноцепочечного моноклонального антитела против CD20, связанные пептидом, Fc представляет собой область шарнир-CH2-CH3 человеческого IgG1, и ξ представляет собой внутриклеточный сигнальный домен дзета-цепи человеческого CD3. Способ получения перенаправленной Т-клетки, экспрессирующей химерный Т-клеточный рецептор, методом электропорации с использованием "голой" ДНК, кодирующей рецептор. Аналогично, в PCT публикации WO 02/077029 описаны генетически модифицированные, CD19-специфичные перенаправленные иммунные клетки, экспрессирующие белок клеточной поверхности, имеющий внеклеточный домен, содержащий рецептор, специфичный для CD19, внутриклеточный сигнальный домен и трансмембранный домен. Применение таких клеток для клеточной иммунотерапии $CD19^+$ злокачественных новообразований и для устранения любой неблагоприятной функции В-клеток. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку, и белок клеточной поверхности представляет собой рецептор scFvFc:ξ, где Fv обозначает цепи VH и VL одноцепочечного моноклонального антитела против CD19, Fc представляет собой по меньшей мере часть константной области IgG1, и ξ, представляет собой внутриклеточный сигнальный домен дзета-цепи комплекса Т-клеточного антигенного рецептора (дзета-цепи человеческого CD3). Внеклеточный домен scFvFc и внутриклеточный домен дзета связаны трансмембранным доменом, таким как трансмембранный домен CD4. Способ получения перенаправленной Т-клетки, экспрессирующей химерный Т-клеточный рецептор, методом электропорации с использованием "голой" ДНК, кодирующей рецептор. Эти химерные антигенные рецепторы при экспрессии на Т-клетках обладают способностью перенаправлять узнавание антигена в зависимости от специфичности моноклонального антитела. Дизайн scFvFc: рецепторы со специфичностью для мишени - эпитопов на поверхности опухолевых клеток представляют собой концептуально многообещающую стратегию получения противоопухолевых иммунных эффекторных клеток для адоптивной терапии, не опирающуюся на ранее существующий противоопухолевый иммунитет. Такие рецепторы являются "универсальными" в том, что они связывают антиген независимым от MHC образом, следовательно, один рецепторный конструкт может быть использован для лечения популяции пациентов с положительными по антигену опухолями. В PCT публикациях WO 02/088334, WO 2007/059298 и WO 2010/065818, принадлежащих Городу Надежды, описаны "дзетакины", созданные из внеклеточного домена, включающего растворимый лиганд рецептора, связанный с областью подложки, способной привязывать внеклеточный домен к поверхности клетки, трансмембранной области и внутриклеточного сигнального домена. При экспрессии на поверхности Т-лимфоцитов дзетакины направляют Т-клеточную активность на конкретные клетки, экспрессирующие рецептор, для которого растворимый лиганд рецептора является специфическим.

Дополнительные признаки CAR могут включать любые из тех, которые раскрыты в двух PCT публикациях, права на которые переуступлены Университету Техаса, и которые имеют общего автора изобретения Lawrence Cooper. В PCT публикации № WO 2009/091826 описаны композиции, содержащие полипептид специфичного для человеческого CD19 химерного Т-клеточного рецептора (или химерного антигенного рецептора, CAR) (обозначенный hCD19CAR), который содержит внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, при этом внеклеточный домен содержит область связывания человеческого CD19. В другом аспекте CD19-связывающая область представляет собой $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv или scFv. Внутриклеточный домен может включать внутриклеточный сигнальный домен человеческого CD3ξ и может дополнительно включать внутриклеточный сегмент человеческого CD28. В некоторых аспектах трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В PCT публикации № WO 2013/074916 описаны способы и композиции для иммунотерапии с использованием CAR^+ Т-клеток, генетически модифицированных для элиминации экспрессии Т-

клеточного рецептора и/или HLA. В конкретных вариантах осуществления отрицательные по Т-клеточному рецептору и/или отрицательные по HLA Т-клетки получают с использованием нуклеаз "цинковые пальцы", например. CAR^+ Т-клетки из аллогенных здоровых доноров могут быть введены любому пациенту без вызывания реакции трансплантат против хозяина (GVHD), и действовать в качестве универсальных реагентов для массового лечения медицинских состояний, таких как рак, аутоиммунные заболевания и инфекция.

В PCT публикации WO 2011/041093, права на которую переуступлены Министерству здравоохранения и социального обеспечения США, описаны химерные антигенные рецепторы против рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов, содержащие антигенсвязывающий домен антитела KDR-1121 или DC101, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен Т-клеточного рецептора и внутриклеточный сигнальный домен Т-клеточного рецептора, и их применение для лечения рака.

PCT публикации WO 2012/079000 и WO 2013/040557, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, права на которые переуступлены Университету Пенсильвании, имеют общего автора изобретения Carl H. June; в этих публикациях описан CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, а также способы получения Т-клеток, трансфицированных РНК CAR, соответственно.

В PCT публикации WO2013/126712, права на которую также переуступлены Университету Пенсильвании, и которая имеет общего автора Carl H. June, описаны композиции и способы для получения персистирующей популяции Т-клеток, отличающихся продолжительным экспоненциальным размножением в культуре, независимым от лиганда и независимым от добавления экзогенных цитокинов или питающих клеток, которые полезны для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой домен, связывающий cMet. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой домен, связывающий мезотелин. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой домен, связывающий CD19. Шарнирный домен представляет собой домен IgG4, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой сигнальную область CD28. Также предложен вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), и CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета.

В PCT публикации WO 2014/039513, права на которую переуступлены Университету Пенсильвании, описаны композиции и способы для ингибирования одной или более изоформ диацилглицеринкиназы (DGK) в клетке с целью усиления цитолитической активности клетки. Клетки могут быть использованы для адоптивного переноса Т-клеток, при этом клетки модифицированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). Ингибирование DGK в Т-клетках, используемых для адоптивного переноса Т-клеток, приводит к повышению цитолитической активности Т-клеток и, таким образом, может быть использовано в лечении различных состояний, включая рак, инфекцию и иммунные нарушения.

В PCT публикации WO 2014/055771, права на которую переуступлены Университету Пенсильвании, описаны композиции и способы для лечения рака яичника. В частности, изобретение относится к введению генетически модифицированных Т-клеток, имеющих связывающий альфа-фолатный рецептор (FR-альфа) домен и костимулирующий домен CD27, для лечения рака яичника. В одном варианте осуществления связывающий FR-альфа домен заявлен как полностью человеческий, что предотвращает иммунный ответ хозяина.

В некоторых вариантах осуществления CAR по изобретению могут быть сконструированы для таргетирования опухолей. Такие CAR могут иметь специфичность в отношении одного или более TACA. В некоторых случаях эктодомены таких CAR могут содержать один или более вариабельных доменов антитела, приведенных в настоящем документе, или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления CAR по изобретению экспрессируются в Т-клетках, в настоящем документе называемых "CAR-модифицированные Т-клетки" или "CAR-T". CAR-T могут быть сконструированы с эктодоменами CAR, имеющими один или более вариабельных доменов антител, приведенных в настоящем документе.

Полиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут связывать более одного эпитопа. Используемые в настоящем документе термины "мультитело" или "полиспецифическое антитело" означают антитело, в котором две или более вариабельных областей связывают разные эпитопы. Эпитопы могут находиться на одной и той же, или на разных мишенях. В конкретных вариантах осуществления полиспецифическое антитело представляет собой "биспецифическое антитело", которое узнает два разных эпитопа на одном и том же, или на разных антигенах.

Биспецифические антитела.

Биспецифические антитела способны связывать два разных антигена. Такие антитела, как правило, содержат антигенсвязывающие области из по меньшей мере двух разных антител. Например, биспеци-

фическое моноклональное антитело (бсмАт, бсАт) представляет собой искусственный белок, состоящий из фрагментов двух разных моноклональных антител, что позволяет бсАт связывать антигены двух разных видов. Одним из распространенных применений данной технологии является противораковая иммунотерапия, при этом бсмАт сконструированы для одновременного связывания с цитотоксической клеткой (за счет рецептора, подобного CD3) и с мишенью, такой как опухолевая клетка, которая должна быть уничтожена.

Биспецифические антитела могут включать любые из тех, которые описаны в публикациях Riethmuller, G., 2012. Cancer Immunity. 12:12-18; Marvin, J.S. et al., 2005. Acta Pharmacologica Sinica. 26(6):649-58; и Schaefer, W. et al., 2011. PNAS. 108(27): 11187-92, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Были разработаны бсмАт нового поколения, называемые "трифункциональными биспецифическими" антителами. Они состоят из двух тяжелых и двух легких цепей, по одной из двух разных антител, при этом две области Fab (плечи) направлены против двух антигенов, и область Fc (нога) содержит две тяжелые цепи и образует третий связывающий сайт.

Из двух паратопов, образующих верхние части вариабельных доменов биспецифического антитела, один может быть направлен против антигена-мишени, а другой против антигена Т-лимфоцитов, такого как CD3. В случае трифункциональных антител область Fc может дополнительно связываться с клеткой, экспрессирующей Fc-рецепторы, такой как макрофаг, клетка - естественный киллер (NK) или дендритная клетка. Суммарно, клетка-мишень оказывается связанной с одной или двумя клетками иммунной системы, что впоследствии приводит к ее гибели.

Биспецифические антитела другого типа были разработаны для преодоления определенных проблем, таких как короткий период полувыведения, иммуногенность и побочные эффекты, вызываемые высвобождением цитокинов. Они включают химически связанные Fab, состоящие лишь из областей Fab, и различные виды двухвалентных и трехвалентных одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), слитых белков, имитирующих вариабельные домены двух антител. Наиболее разработанными из этих новых форматов являются биспецифические Т-клеточные рекрутеры (BiTE) и mAb2, антитела, сконструированные для содержания антигенсвязывающего фрагмента Fcab вместо константной области Fc.

Биспецифический одноцепочечный фрагмент Fv антитела (бс-scFv) был успешно использован для уничтожения раковых клеток. Некоторые виды рака у человека вызваны функциональными дефектами в p53, которые восстанавливают генной терапией с использованием p53 дикого типа. В публикации Weisbart, el al. описано конструирование и экспрессия биспецифического одноцепочечного антитела, которое проникает в живые клетки рака толстой кишки, связывает внутриклеточный p53 и восстанавливает его функцию дикого типа (Weisbart, et al., Int. J. Oncol. 2004 Oct; 25(4):1113-8; и Weisbart, et al. Jnt. J. Oncol. 2004 Dec; 25(6): 1867-73). В этих исследованиях биспецифический одноцепочечный фрагмент Fv антитела (бс-scFv) был сконструирован из (i) одноцепочечного фрагмента Fv антитела, мАт 3E10, который проникает в живые клетки и локализуется в ядре, и (ii) одноцепочечного фрагмента Fv не проникающего антитела, мАт PAb421, который связывает С-концевую часть p53. Связывание PAb421 приводит к восстановлению функций дикого типа некоторых мутантов p53, включая мутантов из клеток SW480 рака толстой кишки человека. Бс-scFv проникал в клетки SW480 и оказывал цитотоксический эффект, что свидетельствовало о способности к восстановлению активности мутантного p53. Клетки COS-7 (клетки почки обезьяны с p53 дикого типа) служили в качестве контроля, поскольку они являются нечувствительными к PAb421 из-за присутствия большого Т-антигена SV40, который ингибирует связывание PAb421 с p53. Бс-scFv проникал в клетки COS-7, но не оказывал цитотоксический эффект, это указывало на отсутствие неспецифической токсичности бс-scFv, не связанной со связыванием p53. Сами фрагменты Fv не были цитотоксическими, это указывало на то, что уничтожение происходило вследствие трансдукции p53. Одиночная мутация в CDR1 из PAb421 VH приводила к отмене связывания бс-scFv с p53 и устранению цитотоксичности в отношении клеток SW480, без изменения проникновения в клетки, это дополнительно свидетельствовало о необходимости связывания PAb421 с p53 для проявления цитотоксичности (Weisbart, et al., Int. J. Oncol. 2004 Oct; 25(4):1113-8; и Weisbart, et al., Int. J. Oncol. 2004 Dec; 25(6): 1867-73).

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой диатела. Диатела представляют собой функциональные биспецифические одноцепочечные антитела (боц-Ат). Эти двухвалентные антигенсвязывающие молекулы состоят из нековалентно связанных димеров scFv и могут быть получены в клетках млекопитающих рекомбинантными методами (смотри, например, Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 7021-7025, 1995). Несколько диател были доведены до стадии клинической разработки. Меченый йодом-123 вариант диатела анти-CEA химерного антитела cT84.66 прошел оценку в качестве средства для пред-хирургического иммуносцинтиграфического обнаружения колоректального рака в исследовании, спонсором которого выступал Исследовательский институт Бекмана из Города Надежды (Clinicaltrials.gov NCT00647153) (Nelson, A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

С использованием методов молекулярной генетики два scFv могут быть собраны в одном полипептиде, с разделением доменом линкера, в тандем, называемый "тандемный scFv" (та-scFv). Было установ-

лено, что та-scFv плохо растворимы и нуждаются в рефолдинге при продуцировании в бактериях, или они могут быть произведены в системах культур клеток млекопитающих, в случае чего устраняется необходимость в рефолдинге, но результатом может быть низкий выход продукта. Конструирование та-scFv с генами для двух разных scFv приводит к получению "биспецифических одноцепочечных вариабельных фрагментов" (бис-scFv). Лишь два та-scFv были клинически разработаны коммерческими компаниями; оба являются биспецифическими реагентами в активной ранней фазе разработки Micromet для лечения онкологических состояний, и описаны как "биспецифические рекрутеры Т-клеток (BiTE)". Блинатумомаб представляет собой анти-CD19/анти-CD3 биспецифический та-scFv, который потенцирует Т-клеточные ответы на В-клеточную неходжкинскую лимфому в исследованиях фазы 2. MT110 представляет собой анти-EP-CAM/анти-CD3 биспецифический та-scFv, который потенцирует Т-клеточные ответы на солидные опухоли в исследованиях фазы 1. Биспецифические тетравалентные "танд-Ат" также являются предметом исследований компании Affimed (Nelson, A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

Также охвачены максителa (двухвалентные scFV, слитые с амино-концом Fc (домены CH2-CH3) IgG.

Биспецифические антитела - рекрутеры Т-клеток (BiTE) сконструированы для временного привлечения цитотоксических Т-клеток для лизиса выбранных клеток-мишеней. Они, как правило, включают два scFv (один, связывающийся с CD3 на Т-клетках, и один, связывающийся с антигеном-мишенью на поверхности клетки, являющейся мишенью для разрушения). В некоторых вариантах осуществления два scFv соединены линкером. В других вариантах осуществления два scFv представляют собой разные области на антителе. Клиническая активность антител BiTE подтверждает тот факт, что размноженные ex vivo аутологичные Т-клетки, полученные из опухолевой ткани, или трансфицированные специфическими Т-клеточными рецепторами, обладают терапевтическим потенциалом при лечении солидных опухолей. Хотя эти персонализированные подходы подтверждают, что сами Т-клетки могут иметь значительную терапевтическую активность даже на поздних стадиях рака, они являются слишком неудобными для использования в широком масштабе. Иначе дело обстоит с антителами к антигену 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), которые облегчают получение опухоль-специфических Т-клеточных клонов, а также с би- и триспецифическими антителами, которые непосредственно привлекают большую часть Т-клеток пациентов для лизиса раковых клеток. Возможность глобального привлечения Т-клеток антителами-рекрутерами Т-клеток для терапии рака у человека активно изучается (Baeuerle PA, et al., Current Opinion in Molecular Therapeutics. 2009, 11(1):22-30 и Baeuerle PA and Reinhardt C, Cancer Res. 2009, 69(12): 4941-4, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Молекулы третьего поколения включают "миниатюризированные" антитела. В число лучших примеров миниатюризации мАт входят малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) от компании Trubion Pharmaceuticals. Эти молекулы, которые могут быть одновалентными или двухвалентными, представляют собой рекомбинантные одноцепочечные молекулы, содержащие один VL, один VH антигенсвязывающий домен, и один или два константных "эффекторных" домена, все соединенные доменами линкеров. Предположительно, такая молекула может иметь преимущества усиленного проникновения в ткань или в опухоль, свойственного для фрагментов, в то же время сохраняя иммунные эффекторные функции, обусловленные константными доменами. По меньшей мере три "миниатюризированных" SMIP были доведены до стадии клинической разработки. TRU-015, анти-CD20 SMIP, разработанное в сотрудничестве с Wyeth, является наиболее близким к завершению проектом, который доведен до фазы 2 испытаний для лечения ревматоидного артрита (РА). Более ранние попытки применительно к системной красной волчанке (СКВ) и В-клеточным лимфомам были в конечном счете прекращены. Trubion и Facet Biotechnology сотрудничают в разработке TRU-016, анти-CD37 SMIP, для лечения CLL и других лимфоидных новообразований, проект достиг фазы 2. Компания Wyeth лицензировала анти-CD20 SMIP SBI-087 для лечения аутоиммунных заболеваний, включая РА, СКВ и, возможно, рассеянный склероз, хотя эти проекты все еще остаются на самых ранних стадиях клинического тестирования. (Nelson, A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

В Genmab проводят исследования применения их технологии "унителa", в которой шарнирную область удаляют из молекул IgG4. Хотя молекулы IgG4 являются нестабильными и могут обмениваться друг с другом гетеродимерами легкая-тяжелая цепь, делеция шарнирной области полностью предотвращает спаривание между собой тяжелых цепей, оставляя высокоспецифические одновалентные гетеродимеры легкой/тяжелой цепей, при этом сохраняя область Fc для обеспечения стабильности и увеличения периода полувыведения in vivo. Данная конфигурация может сводить к минимуму риск иммунной активации или онкогенного роста, поскольку IgG4 слабо взаимодействует с FcR и одновалентные унителa не способны стимулировать образование внутриклеточного сигнального комплекса. Эти утверждения, однако, в большей степени подтверждаются лабораторными, чем клиническими, доказательствами. В Biotecnol также проводят разработку "миниатюризированного" мАт, CAB051, которое представляет собой "компактное" 100 кДа анти-HER2 антитело, изучаемое в доклинических исследованиях (Nelson, A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

Также разработаны рекомбинантные терапевтические средства, состоящие из одиночных антиген-

связывающих доменов, хотя в настоящее время они составляют лишь 4% ассортимента лекарственных средств в разработке. Эти молекулы чрезвычайно малы, с молекулярной массой, составляющей примерно одну десятую часть молекулярной массы полноразмерных мАт. Arana и Domantis создают молекулы, состоящие из антигенсвязывающих доменов легкой или тяжелой цепей человеческих иммуноглобулинов, хотя только Агапа имеет кандидата для клинического тестирования, ART-621, анти-TNFα молекулу в фазе 2 исследования для лечения псориаза и ревматоидного артрита. Ablynx производит "нанотела", полученные из антигенсвязывающих вариабельных областей тяжелых цепей (VHH) обнаруженных у верблюдов и лам антител, состоящих из тяжелых цепей и лишенных легких цепей. Два нанотела против фактора фон Виллебранда от компании Ablynx были доведены до стадии клинической разработки, включая ALX-0081, в фазе 2 разработки, в качестве внутривенной терапии для предотвращения тромбоза у пациентов, подвергаемых чрескожному вмешательству на коронарных сосудах при остром коронарном синдроме, и ALX-0681, в фазе 1, молекулу для подкожного введения, предназначенную как для пациентов с острым коронарным синдромом, так и для пациентов с тромботической тромбоцитопенической пурпурой (Nelson, A. L. MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

Получение полиспецифических антител.

В некоторых вариантах осуществления последовательности антитела по изобретению могут быть использованы для получения полиспецифических антител (например, биспецифических, триспецифических или с большей степень полиспецифичности). Полиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов антигена-мишени по настоящему изобретению, или могут быть специфичными как для антигена-мишени по настоящему изобретению, так и для гетерологичного эпитопа, такого как гетерологичный гликан, пептид или материал твердой подложки. (Смотри, например, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tub, A. et al., Trispecific F(ab)3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic Tcells. J. Immunol. 1991 Jul 1; 147(1):60-9; патенты США № 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; и Kostelny, S.A. et al., Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. Immunol. 1992 Mar 1; 148(5): 1547-53); патент США № 5932448.

В PCT публикации WO2014144573, права выданы Мемориальному онкологическому центру Слоана-Кеттеринга, описаны и заявлены технологии мультимеризации для создания димерных полиспецифических связывающих средств (например, слитых белков, содержащих компоненты антител) с усовершенствованными свойствами в сравнении с полиспецифическими связывающими средствами без способности к димеризации.

В PCT публикации WO2014144357, права выданы Merck Patent GMBH, описаны и заявлены тетравалентные биспецифические антитела (тетби-Ат), а также способы получения и способы применения тетби-Ат для диагностики и лечения рака или иммунных заболеваний. Тетби-Ат имеют вторую пару фрагментов Fab со второй антигенной специфичностью, присоединенные к С-концу антитела, вследствие чего образуется молекула, которая является бивалентной для каждой из двух антигенных специфичностей. Тетравалентное антитело получают методами генетической инженерии путем ковалентного связывания тяжелой цепи антитела с Fab легкой цепи, который связывается с соответствующим ему совместно экспрессируемым Fab тяжелой цепи.

В PCT публикации WO2014028560, права выданы IBC Pharmaceuticals, Inc., описаны и заявлены перенаправляющие Т-клетки биспецифические антитела (бс-Ат), с по меньшей мере одним сайтом связывания для Т-клеточного антигена и по меньшей мере одним сайтом связывания для антигена на пораженной болезнью клетке или патогене, для лечения заболевания. Предпочтительно, это бс-Ат представляет собой анти-CD3 х анти-CD19 биспецифическое антитело, хотя могут быть использованы и антитела против других Т-клеточных антигенов и/или связанных с заболеванием антигенов. Комплекс может быть направлен на эффекторные Т-клетки для индукции опосредованной Т-клетками цитотоксичности в отношении клеток, связанных с заболеванием, таким как рак, аутоиммунное заболевание или инфекционное заболевание. Цитотоксический иммунный ответ усиливают за счет совместного введения средств на основе интерферона, которые включают интерферон-а, интерферон-bgr; интерферон-λ1. интерферон-λ2 или интерферон-λ3.

В PCT публикации WO2013092001, права выданы Synimmune GMBH, описана и заявлена биспецифическая молекула антитела, способ ее получения, ее применения, а также молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифическую молекулу антитела. В частности, предложена молекула антитела, способная опосредовать ограниченную клетками-мишенями активацию иммунных клеток.

В PCT публикации WO2012007167 описано и заявлено полиспецифическое модульное антитело, специфически связывающее по меньшей мере гликоэпитоп и рецептор класса erbB на поверхности опухолевой клетки, за счет чего происходит перекрестное связывание гликоэпитопа и рецептора, данное антитело обладает апоптотической активностью, вызывая цитолиз, независимый от NK-клеток.

В PCT публикациях WO2012048332 и WO2013055404 описаны и заявлены медитопы, связывающие медитопы антитела, системы доставки медитопов, а также каркасная связывающая поверхность моноклонального антитела для медитопов, и способы их применения. В частности, показано, что два антите-

ло-связывающих пептида, C-QFDLSTRRLK-C ("cQFD"; последовательность номер 1 в указанных документах; SEQ ID NO: 17 в настоящем документе) и C-QYNLSSRALK-C ("cQYN"; последовательность номер 2 в указанных документах; SEQ ID NO: 18 в настоящем документе) обладают новыми свойствами связывания мАт. Показано, что cQFD и cQYN, также называемые "медитопами", связывают область каркаса Fab анти-EGFR мАт цетуксимаба и не связывают определяющие комплементарность области (CDR), связывающие антиген. Область связывания на каркасе Fab отличается от областей для других каркас-связывающих антигенов, таких как суперантигены белок A стафилококков (SpA) (Graille el al. 2000) и белок L Peptostreptococcus magnus (PpL) (Graille et al., 2001). Соответственно, один из раскрытых вариантов осуществления представляет собой поверхность соприкосновения при связывании каркаса, включающую каркасную область уникального мышиного-человеческого антитела, или ее функциональный фрагмент, который связывает циклический медитоп.

Иллюстративные патенты и патентные заявки, представляющие интерес, включают: патенты США № 5585089; 5693761 и 5693762, все поданы 7 июня 1995 г., и патент США № 6180370, права на все переуступлены Protein Design Labs, Inc., в документах описаны способы получения и композиции гуманизированных иммуноглобулинов, имеющих одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) и возможные дополнительные аминокислоты из иммуноглобулина-донора и каркасной области человеческого иммуноглобулина-акцептора. Указано, что каждая гуманизированная цепь иммуноглобулина, как правило, содержит, помимо CDR, аминокислоты из каркаса иммуноглобулина-донора, которые, например, способны взаимодействовать с CDR, влияя на аффинность связывания, например, одна или более аминокислот, расположенные в непосредственной близости к CDR в иммуноглобулине-доноре, или аминокислоты, расположенные в пределах примерно 3 Å, что предсказано методом молекулярного моделирования. Каждую из тяжелой и легкой цепей можно проектировать с использованием любого одного, или всех, из различных критериев положений. При объединении в интактное антитело гуманизированные иммуноглобулины по настоящему изобретению, как описано, являются практически не иммуногенными у человека и сохраняют практически ту же аффинность, что и иммуноглобулин-донор, для антигена, такого как белок или другое соединение, содержащее эпитоп.

В патенте США № 5951983, права на который переуступлены Католическому университету De Louvain и Bio Transplant, Inc., описано гуманизированное антитело против Т-лимфоцитов. В нем использованы каркасные области из гена каппа V человека, обозначенного HUM5400 (EMBL регистрационный № X55400) и из человеческого антитела клона Amu 5-3 (GenBank регистрационный номер U00562).

В патенте США № 5091513, выданном Creative Biomolecules, Inc., описано семейство синтетических белков, имеющих аффинность для предварительно выбранного антигена. Белки характеризуются одной или более последовательностями аминокислот, составляющими область, которая действует как биосинтетический сайт связывания антитела (BABS). Сайты включают 1) нековалентно связанные или связанные дисульфидными связями синтетические димеры VH и VL, 2) одиночные цепи VH-VL или VL-VH, где VH и VL связаны полипептидным линкером, или 3) индивидуальные домены VH или VL. Связывающие домены содержат связанные области CDR и FR, которые могут быть получены из отдельных иммуноглобулинов. Белки также могут включать другие полипептидные последовательности, которые действуют, например, в качестве фермента, токсина, сайта связывания или сайта присоединения к иммобилизованной среде или радиоактивному атому. Раскрыты способы получения белков для конструирования BABS, имеющих любую специфичность, которой можно добиться при in vivo получении антител, и способы получения их аналогов.

В патенте США № 8399625, выданном ESBATech, Alcon Biomedical Research Unit, LLC, описаны акцепторные каркасы антитела и способы прививания не принадлежащих человеку антител, например, антител кролика, с использованием особенно хорошо подходящих акцепторных каркасов антитела.

Интратела.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой интратела. Интратела представляют собой форму антитела, которая не секретируется из клетки, в которой она продуцируется, но вместо этого имеет в качестве мишени один или более внутриклеточных белков. Интратела экспрессируются и функционируют внутриклеточно, и могут быть использованы для оказания воздействия на многие клеточные процессы, включая, но без ограничения, внутриклеточную направленную миграцию, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, пролиферативную сигнализацию и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают терапию на основе интрател. В некоторых таких вариантах осуществления последовательности вариабельных доменов и/или последовательности CDR, раскрытые в настоящем документе, включены в один или более конструктов для терапии на основе интрател. Например, интратела могут быть направлены на один или более гликированных внутриклеточных белков или могут модулировать взаимодействие между одним или более гликированными внутриклеточными белками и альтернативным белком.

Внутриклеточные антитела против внутриклеточных мишеней впервые были описаны более двух десятилетий назад (Biocca, Neuberger and Cattaneo EMBO J. 9: 101-108, 1990). Внутриклеточная экспрессия интрател в разных компартментах клеток млекопитающих позволяет блокировать или модулировать

функцию эндогенных молекул (Biocca, et al., EMBO J. 9: 101-108, 1990; Colby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 17616-21,2004). Интратела могут изменять укладку белка, взаимодействия белок-белок, белок-ДНК, белок-РНК, а также модификацию белка. Они могут осуществлять фенотипический нокаут и работать в качестве нейтрализующих агентов путем прямого связывания с антигеном-мишенью, путем отклонения его внутриклеточной направленной миграции или путем ингибирования его связывания с партнерами по связыванию. Их уже использовали в качестве исследовательских инструментов и начинают использовать в качестве терапевтических молекул для лечения заболеваний человека, таких как вирусные патологии, рак и заболевания, вызываемые неправильно свернутыми белками. На быстро растущем биологическом рынке рекомбинантных антител появляются интратела с повышенной специфичностью связывания, стабильностью и растворимостью, наряду с пониженной иммуногенностью, с целью их применения в терапии (Biocca, реферат в: Antibody Expression and Production Cell Engineering Volume 7, 2011, pp. 179-195).

В некоторых вариантах осуществления интратела имеют преимущества перед интерферирующими РНК (иРНК); например, показано, что иРНК производят множество неспецифических эффектов, в то время как интратела имеют более высокую специфичность и аффинность для антигенов-мишеней. Более того, в качестве белков, интратела имеют гораздо более длительный активный периода полувыведения, чем иРНК. Так, если активный период полувыведения внутриклеточной молекулы-мишени является длительным, выключение гена посредством иРНК может быть медленным до проявления эффекта, в то время как эффекты экспрессии интратела могут быть почти немедленными. И наконец, можно спроектировать интратела для блокирования некоторых взаимодействий связывания конкретной молекулы-мишени, не затрагивая остальные.

Получение интрател.

Интратела часто представляют собой одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), экспрессируемые с рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты и спроектированные, чтобы оставаться внутри клетки (например, оставаться в цитоплазме, эндоплазматическом ретикулуме или периплазме). Интратела могут быть использованы, например, для выключения функции белка, с которым интрателo связывается. Экспрессию интратела также можно регулировать за счет использования индуцируемых промоторов в нуклеотидном экспрессионном векторе, содержащем последовательность для интратела. Интратела могут быть получены с использованием способов, известных в данной области, таких как те, которые описаны и обсуждаются в: (Marasco et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893; Chen et al., 1994, Hum. Gene Ther. 5:595-601; Chen et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5932-5936; Maciejewski et al., 1995, Nature Med., 1: 667-673; Marasco, 1995, Immunotech, 1: 1-19; Mhashilkar, et al., 1995, EMBO J. 14: 1542-51; Chen et al., 1996, Hum. Gene Therap., 7: 1515-1525; Marasco, Gene Ther. 4:11-15, 1997; Rondon and Marasco, 1997, Annu. Rev. Microbiol. 51:257-283; Cohen, et al., 1998, Oncogene 17:2445-56; Proba et al., 1998, J. Mol. Biol. 275:245-253; Cohen et al., 1998, Oncogene 17:2445-2456; Hassanzadeh, et al., 1998, FEBS Lett. 437:81-6; Richardson et al., 1998, Gene Ther. 5:635-44; Ohage and Steipe, 1999, J. Mol. Biol. 291:1119-1128; Ohage et al., 1999, J. Mol. Biol. 291:1129-1134; Wirtz and Steipe, 1999, Protein Sci. 8:2245-2250; Zhu et al., 1999, J. Immunol. Methods 231:207-222; Arafat et al., 2000, Cancer Gene Ther. 7:1250-6; der Maur et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:45075-85; Mhashilkar et al., 2002, Gene Ther. 9:307-19; и Wheeler et al., 2003, FASEB J. 17: 1733-5; а также в приведенных в них ссылках). В частности, получение интратела CCR5 описано в публикации Steinberger et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:805-810). Смотри, в основном, Marasco, WA, 1998, "Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications", Springer: New York; и для обзора scFv смотри Pluckthun в "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", 1994, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315.

В некоторых вариантах осуществления последовательности антител используют для конструирования интрател. Интратела часто рекомбинантно экспрессируются в виде однодоменных фрагментов, таких как изолированные домены VH и VL, или в виде одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) антитела в клетке. Например, интратела часто экспрессируются в виде одиночного полипептида, образующего одноцепочечное антитело, содержащее вариабельные домены тяжелой и легкой цепей, соединенные гибким полипептидом линкера. Интратела, как правило, не содержат дисульфидные связи и способны модулировать экспрессию или активность генов-мишеней за счет своей активности специфического связывания. Одноцепочечные антитела также могут экспрессироваться в виде одноцепочечного фрагмента вариабельной области, соединенной с константной областью легкой цепи.

Как известно в данной области, последовательность для интратела может быть введена в рекомбинантные полинуклеотидные векторы, с кодированием субклеточных сигналов направленной миграции на его N или С-конце, чтобы обеспечить экспрессию в высоких концентрациях в субклеточных компартментах, где расположен белок-мишень. Например, интратела, направленные на эндоплазматический ретикулум (ЭР), спроектированы для включения лидерного пептида и, необязательно, С-концевого сигнала удержания в ЭР, такого как аминокислотный мотив KDEL (SEQ ID NO: 23). Интратела, предназначенные для проявления активности в ядре, спроектированы для включения сигнала ядерной локализации. Липидные фрагменты соединяют с интрателами для привязывания интратела на цитозольной стороне плазматической мембраны. Интратела также могут быть направлены на выполнение функции в ци-

тозоле. Например, цитозольные интратела используют для секвестрирования факторов в цитозоле, тем самым предотвращая их транспортировку к их естественному пункту назначения в клетке.

Существуют некоторые технические трудности с экспрессией интратела. В частности, на конформационную укладку белка и структурную стабильность нового синтезированного интратела в клетке влияют восстанавливающие условия внутриклеточной среды. В клинической терапии людей существуют опасения по поводу безопасности применения трансфицированной рекомбинантной ДНК, которую используют для достижения экспрессии интратела в клетке. Особое беспокойство вызывают различные вирусные векторы, обычно используемые в генетических манипуляциях. Таким образом, одним подходом для избегания таких проблем является слияние доменов белковой трансдукции (PTD) с антителами scFv для создания "проникающего в клетку" антитела или "транстела". Транстела представляют собой проникающие в клетки антитела, в которых домен белковой трансдукции (PTD) слит с антителами в форме одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) (Heng and Cao, 2005, Med Hypotheses. 64:1105-8).

При взаимодействии с геном-мишенью интратело модулирует функцию белка-мишени и/или осуществляет фенотипический/функциональный нокаут по таким механизмам, как ускоренная деградация белка-мишени и секвестрирование белка-мишени в не физиологическом субклеточном компартменте. Другие механизмы опосредованной интрателом инактивации гена могут зависеть от эпитопа, на который направлено интратело, например, связывание каталитического сайта на белке-мишени или эпитопов, которые вовлечены в белок-белковые, белок-ДНК или белок-РНК взаимодействия.

В одном варианте осуществления интратела используют для захвата мишени в ядре, тем самым предотвращая ее активность в ядре. В такие интратела включают сигналы направления в ядро для достижения нужного таргетирования. Такие интратела спроектированы для специфического связывания с конкретным доменом-мишенью. В другом варианте осуществления цитозольные интратела, которые специфически связывают белок-мишень, используют для предотвращения мишени от получения доступа в ядро, тем самым предотвращая ее от проявления какой-либо биологической активности в ядре (например, предотвращая мишень от образования транскрипционных комплексов с другими факторами).

Для специфического направления экспрессии таких интрател в конкретные клетки, транскрипцию интратела помещают под регуляторный контроль соответствующего опухоль-специфического промотора и/или энхансера. Для направления экспрессии интратела конкретно в предстательную железу, например, можно использовать промотор и/или промотор/энхансер PSA (Смотри, например, патент США № 5919652, выпущенный 6 июля 1999 г.).

Домены белковой трансдукции (PTD) представляют собой короткие пептидные последовательности, которые позволяют белкам проходить через клеточную мембрану и быть интернализованными в цитозоле через нетипичные пути секреции и интернализации. Существует целый ряд конкретных преимуществ, которыми может обладать "транстело" в сравнении с обычными интрателами, экспрессируемыми в клетке. Для начала, "правильная" конформационная укладка и образование дисульфидных связей может происходить до введения в клетку-мишень. Важнее, что использование проникающих в клетку антител или "транстел" позволило бы избегать избыточных связанных с безопасностью или этических проблем, связанных с прямым применением в лечении людей технологии рекомбинантных ДНК, которая необходима для экспрессии интратела в клетке. "Транстела", введенные в клетку, будут обладать лишь коротким активным периодом полувыведения, не вызывая какого-либо постоянного генетического изменения. Это позволило бы уменьшить опасения, связанные с безопасностью, при их применении в лечении людей (Heng and Cao 2005, Med Hypotheses. 64:1105-8).

Интратела являются многообещающими лекарственными средствами для лечения заболеваний, связанных с неправильной укладкой белков, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и прионовую болезнь, благодаря их практически неограниченной способности специфически узнавать отличающиеся конформации белка, включая патологические изоформы, и потому, что они могут быть направлены в потенциальные зоны агрегации (как внутри-, так и внеклеточные зоны). Эти молекулы могут действовать в качестве нейтрализующих агентов против амилоидогенных белков за счет предотвращения их агрегации и/или в качестве молекулярных "стрелочников" во внутриклеточном транспорте за счет перенаправления белка из его потенциальной зоны агрегации (Cardinale and Biocca, Curr. Mol. Med. 2008, 8:2-11).

Иллюстративные патентные публикации, в которых описаны внутриклеточные антитела, или интратела, приведены ниже в настоящем документе, полное содержание всех из них включено в настоящий документ посредством ссылки.

В PCT публикации WO03014960 и патенте США 7608453, выданных Cattaneo, et al., описана технология захвата внутриклеточного антитела и способ идентификации по меньшей мере одной консенсусной последовательности внутриклеточного антитела (ICS), включающий этапы: создания базы данных, включающей последовательности валидированных внутриклеточных антител (базы данных VIDA) и выравнивания последовательностей валидированных внутриклеточных антител в соответствии с Kabat; определения частоты, с которой конкретная аминокислота присутствует в каждом из положений выровненных последовательностей антител; выбора порогового значения частоты (LP или консенсусного порога)

в диапазоне от 70% до 100%; идентификации положений в выровненных последовательностях, в которых частота встречаемости конкретной аминокислоты превышает или равна значению LP; и идентификации наиболее часто встречающейся аминокислоты в положении указанных выровненных последовательностей.

В PCT публикациях WO0054057; WO03077945; WO2004046185; WO2004046186; WO2004046187; WO2004046188; WO2004046189; публикациях патентных заявок США US2005272107; US2005276800; US2005288492; US2010143939; выданных патентах США 7569390 и 7897347 и выданных Европейских патентах EP1560853 и EP1166121, права на все из которых переуступлены Медицинскому исследовательскому совету, и авторский коллектив которых включает Cattaneo, el al., описаны внутриклеточные однодоменные иммуноглобулины и способ определения способности одиночного домена иммуноглобулина связывать мишень во внутриклеточной среде, а также способы получения внутриклеточных антител.

В PCT публикации WO0235237; публикации патентной заявки США 2003235850 и выданном Европейском патенте EP1328814, в которых перечислен в качестве автора изобретения Catteneo, и права на которые переуступлены S.I.S.S.A. Scuola Intemazionale Superiore, описан способ in vivo идентификации эпитопов внутриклеточного антигена.

В PCT публикации WO2004046192 и Европейском патенте EP1565558, права на которые переуступлены Lay Line Genomics SPA, и в которых перечислен в качестве автора изобретения Catteneo, описан способ выделения внутриклеточных антител, которые нарушают и нейтрализуют взаимодействие между белковым лигандом x и белковым лигандом y внутри клетки. Также раскрыт способ идентификации белкового лиганда x, способного связывать известный лиганд y с использованием внутриклеточных антител, способных осуществлять взаимодействие между x и y; а также способ выделения набора фрагментов антител против значительной части белок-белковых взаимодействий конкретной клетки (интерактом) или против белковых взаимодействий, составляющих внутриклеточные пути или сети.

В публикации патентной заявки США 2006034834 и PCT публикации WO9914353, озаглавленных "Intrabody-mediated control of immune reactions", права на которые переуступлены Dana Farber Cancer Institute, Inc., и в которых перечислены в качестве авторов изобретения Marasco и Mhashilkar, описаны способы изменения регуляции иммунной системы, например, путем избирательного таргетирования отдельных, или классов, иммуномодулирующих рецепторных молекул (IRM) на клетках, включающие трансдукцию клеток экспрессируемым внутри клетки антителом, или интрателом, против IRM. В предпочтительном варианте осуществления интрателo представляет собой одноцепочечное антитело против IRM, например, молекул MHC-1.

В PCT публикации WO2013033420, права на которую переуступлены Dana Farber Cancer Institute Inc. и Институту биомедицинских исследований имени Уайтхеда, и в которых перечислены в качестве авторов изобретения Bradner, Rahl и Young, описаны способы и композиции, полезные для ингибирования взаимодействия между содержащим бромдомен белком и иммуноглобулиновым (Ig) регуляторным элементом и для понижающей регуляции экспрессии онкогена, перемещенного с локусом Ig, а также для лечения рака (например, гематологических злокачественных новообразований), характеризующегося повышенной экспрессией онкогена, который перемешается с локусом Ig. В целом, приведено описание интрател.

В PCT публикации WO02086096 и публикации патентной заявки США 2003104402, озаглавленных "Methods of producing or identifying intrabodies in eukaryotic cells", права на которые переуступлены Университету медицинского центра Рочестера, и в которых перечислены в качестве авторов изобретения Zauderer, Wei и Smith, описан высокоэффективный способ экспрессии молекул внутриклеточных иммуноглобулинов и библиотеки внутриклеточных иммуноглобулинов в эукариотических клетках с использованием тримолекулярного метода рекомбинации. Также предложены способы селекции и скрининга на молекулы внутриклеточных иммуноглобулинов и их фрагменты, наборы для получения, скрининга и селекции молекул внутриклеточных иммуноглобулинов, а также молекулы внутриклеточных иммуноглобулинов и фрагменты, полученные с использованием данных способов.

В PCT публикации WO2013023251, права на которую переуступлены Affinity Biosciences PTY LTD, и в которой перечислены в качестве авторов изобретения Beasley, Niven и Kiefel, описаны полипептиды, такие как молекулы антител, и полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды, а также их библиотеки, в которых экспрессируются полипептиды, демонстрирующие высокую стабильность и растворимость. В частности, описаны полипептиды, содержащие спаренные домены VL и VH, которые экспрессируются в растворимом виде и сворачиваются в восстанавливающих или внутриклеточных условиях, при этом был проведен скрининг библиотеки человеческих scFv, который привел к выделению генов растворимых scFv, имеющих каркасные области, идентичные последовательностям зародышевой линии антител человека, а также замечательную термостабильность и толерантность к пересадке CDR3 на каркас scFv.

В Европейской патентной заявке EP2314622 и PCT публикациях WO03008451 и WO03097697, права на которые переуступлены Esbatech AG и Университету Цюриха, и в которых перечислены в качестве авторов изобретения Ewert, Huber, Honneger и Plueckthun, описана модификация человеческих вариа-

бельных доменов и предложены композиции, полезные в качестве каркасов для создания очень стабильных и растворимых одноцепочечных Fv (scFv) фрагментов антител. Эти каркасы были выбраны для внутриклеточного использования и, таким образом, идеально подходят для создания фрагментов scFv антител или библиотек scFv антител для вариантов применения, в которых стабильность и растворимость являются ограничивающими факторами при использовании фрагментов антител, например, в восстанавливающей среде клетки. Такие каркасы также могут быть использованы для идентификации высоко консервативных остатков и консенсусных последовательностей, демонстрирующих повышенную растворимость и стабильность.

В PCT публикации WO02067849 и публикации патентной заявки США 2004047891, озаглавленных "Systems devices and methods for intrabody targeted delivery and reloading of therapeutic agents" описаны системы, устройства и способы использования интрател для направленной доставки молекул. Более конкретно, некоторые варианты осуществления относятся к перезагружаемым системам доставки лекарственных средств, которые обеспечивают направленную доставку лекарственных средств в область ткани субъекта точным и своевременным образом.

В PCT публикации WO2005063817 и патенте США 7884054, права на которые переуступлены Amgen, Inc., и в которых перечислены в качестве авторов изобретения Zhou, Shen и Martin, описаны способы идентификации функциональных антител, включая интратела. В частности, описано гомодимерное интрателo, при этом каждая полипептидная цепь гомодимера содержит область Fc, scFv и последовательность внутриклеточной локализации. Последовательность внутриклеточной локализации может приводить к локализации интратела в ЭР или аппарате Гольджи. Необязательно, каждая полипептидная цепь содержит не более одного scFv.

В PCT публикации WO2013138795 авторов Vogan, et al., права на которую переуступлены Permeon Biologies Inc., описаны проникающие в клетку композиции для доставки внутриклеточных антител и антитело-подобных фрагментов, а также способы их доставки (используемое в настоящем документе название "фрагменты AAM" или "фрагмент AAM") в клетку. Без связи с конкретной теорией, настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на том открытии, что фрагмент AAM можно доставлять в клетку путем образования комплекса фрагмента AAM с проникающим в клетку полипептидом, имеющим положительный поверхностный заряд (в настоящем документе называемым "Surf+ проникающий полипептид"). Также приведены примеры некоторых вариантов применения технологии интрафилинов.

В PCT публикации WO2010004432, права на которую переуступлены Институту имени Пастера, описаны иммуноглобулины верблюдовых (одногорбых верблюдов, двугорбых верблюдов, лам и альпака), примерно 50% из которых представляют собой антитела, лишенные легких цепей. Эти состоящие из тяжелых цепей антитела взаимодействуют с антигеном за счет только одного вариабельного домена, называемого VHH, доменом(ами) VHH или антителом(ами) VHH. Несмотря на отсутствие легких цепей, эти гомодимерные антитела демонстрируют широкий антигенсвязывающий репертуар за счет увеличения их гипервариабельных областей, и могут действовать в качестве транстела и/или интратела in vitro, а также in vivo, когда домен VHH направлен против внутриклеточной мишени.

В PCT публикации WO2014106639 описан способ идентификации клеточной мишени, вовлеченной в фенотип клетки, путем идентификации интратела, которое способно модифицировать клеточный фенотип, и идентификации прямой или опосредованной клеточной мишени интратела. В частности, интратела 3H2-1, 3H2-VH и 5H4 способны ингибировать реакцию дегрануляции в тучных клетках, запускаемую аллергеном; более того, интратела 3H2-1 и 5H4 прямо или косвенно направлены на белки семейства ABCF1 и семейства C120RF4, соответственно. Сообщают, что эти ингибиторы ABCF1 и C120RF4 полезны в терапии, в частности, для лечения аллергических и/или воспалительных состояний.

В PCT публикации WO0140276, права на которую переуступлены Urogenesis, Inc., в целом, описана возможность ингибирования белков STEAP (простатический эпителиальный антиген с шестью трансмембранными доменами) с использованием внутриклеточных антител (интрател).

В PCT публикации WO02086505, права на которую переуступлены Университету Манчестера, и публикации патентной заявки США US2004115740, в которых перечислены в качестве авторов изобретения Simon и Benton, описан способ внутриклеточного анализа молекулы-мишени, для которого интратела являются предпочтительными. В одном варианте осуществления описан вектор (обозначенный pScFv-ECFP), способный экспрессировать анти-MUC1 интрателo, связанное с CFP.

В PCT публикациях WO03095641 и WO0143778, права на которые переуступлены Gene Therapy Systems, Inc., описаны композиции и способы для внутриклеточной доставки белка и, в целом, описаны интратела.

В PCT публикации WO03086276, права на которую переуступлены Selective Genetics, Inc., описана технология платформы для лечения внутриклеточной инфекции. Композиции и способы, описанные в указанном документе, включают не специфичные для мишени векторы, которые направлены на инфицируемые клетки за счет связанных лигандов, которые связываются и интернализуются через клеточные поверхностные рецепторы/фрагменты, связанные с инфекцией. Векторы содержат экзогенные нуклеотидные последовательности, которые экспрессируются после интернализации в клетку-мишень. Связан-

ные с вектором лиганды и молекулы нуклеиновой кислоты могут быть изменены для направления на другие инфекционные агенты. Кроме того, изобретение относится к способам идентификации эпитопов и лигандов, способных управлять интернализацией вектора и способных блокировать проникновение вирусов.

В PCT публикации WO03062415, права на которую переуступлены Университету имени Эразма Роттердамского, описан трансгенный организм, содержащий полинуклеотидный конструкт, кодирующий внутриклеточное антитело, которое нарушает каталитическую реакцию образования галактозного ксеноантигена α1,3-галактозы, и/или полинуклеотидный конструкт, кодирующий внутриклеточное антитело, которое специфически связывает ретровирусный белок, такой как белок частиц PERV. Клетки, ткани и органы трансгенного организма могут быть использованы для ксенотрансплантации.

В PCT публикации WO2004099775, озаглавленной "Means for detecting protein conformation and applications thereof", описано применение фрагментов scFv в качестве специфичных для конформации антител для специфического обнаружения конформационного состояния белка, с целью использования в качестве сенсоров в живых клетках для контролирования, после внутриклеточной экспрессии, поведения эндогенных белков.

В PCT публикации WO2008070363, права на которую переуступлены Imclone Systems, Inc., описано однодоменное интрателo, которое связывает внутриклеточный белок или внутриклеточный домен внутриклеточного белка, такого как Etk, эндотелиальная и эпителиальная тирозинкиназа, которая является представителем семейства Tec нерецепторных тирозинкиназ. Также предложен способ ингибирования внутриклеточного фермента и лечения опухоли у пациента путем введения интратела или нуклеиновой кислоты, экспрессирующей интрателo.

В PCT публикации WO2009018438, права на которую переуступлены Cornell Research Foundation, Inc., описан способ идентификации белка, который связывает молекулу-мишень и имеет внутриклеточную функциональность, путем использования конструкта, содержащего молекулу ДНК, кодирующую белок, который связывает молекулу-мишень, с молекулой ДНК, соединенной с последовательностью остановки. Клетку-хозяина трансформируют конструктом, а затем культивируют в условиях, эффективных для образования внутри клетки-хозяина комплекса белка, трансляция которого остановлена, мРНК, кодирующей белок, и рибосом. Белок в комплексе находится в правильно свернутой активной форме, и комплекс извлекают из клетки. Этот способ можно осуществлять с препаратом бесклеточного экстракта, содержащим рибосомы вместо клетки-хозяина. Настоящее изобретение также относится к конструкту, включающему молекулу ДНК, кодирующую белок, который связывает молекулу-мишень, и останавливающую последовательность SecM, связанную с молекулой ДНК. Молекула ДНК и останавливающая последовательность SecM связаны с достаточным расстоянием между ними, чтобы допустить экспрессию в клетке кодируемого ими белка в правильно свернутой активной форме. В целом, приведено описание интрател.

В PCT публикации WO2014030780, права на которую переуступлены Биотехнологическому исследовательскому институту Mogam, описан способ, называемый инженерией с использованием Tat-ассоциированного белка (TAPE), для скрининга белка-мишени, имеющего повышенную растворимость и прекрасную термостабильность, в частности, вариабельного домена (VH или VL) иммуноглобулина, полученного из зародышевых клеток человека, путем создания генного конструкта, в котором белок-мишень и устойчивый к антибиотику белок связаны с сигнальной последовательностью Tat, с последующей экспрессией конструкта в E. coli. Также описаны человеческие или рекомбинантные VH и VL доменные антитела, и каркасы человеческих или рекомбинантных VH и VL доменных антител, имеющих прекрасную растворимость и термостабильность, которые подвергают скринингу методом TAPE. Также предложена библиотека, включающая случайные последовательности CDR в каркасе человеческого или рекомбинантного VH или VL доменного антитела, подвергаемая скринингу методом TAPE, способ ее получения, VH или VL доменное антитело, обладающее способностью к связыванию белка-мишени, скринируемого с использованием библиотеки, и фармацевтическая композиция, содержащая доменное антитело.

В Европейской патентной заявке EP2422811 описано антитело, которое связывает внутриклеточный эпитоп; такие интратела содержат по меньшей мере часть антитела, которая способна специфически связывать антиген и, предпочтительно, не содержит функциональные последовательности, обусловливающие ее секрецию, и, таким образом, остается в клетке. В одном варианте осуществления интрателo представляет собой scFv. Полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать нужную структуру для связывания антигена. Также описан конкретный вариант осуществления, в котором интрателo связывает цитоплазматический домен рецептора Eph и предотвращает его сигнализацию (например, аутофосфорилирование). В другом конкретном варианте осуществления интрателo связывает цитоплазматический домен эфрина типа B (например, эфрина B1, эфрина B2 или эфрина B3).

В PCT публикации WO2011003896 и европейской патентной заявке EP2275442 описаны внутриклеточные функциональные хромотела к PCNA, полученные с использованием молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, специфически связывающий ядерный антиген пролиферирующих кле-

ток (PCNA). Примеры таких полипептидов, имеющих консервативные замены одной или более аминокислот в одной или двух каркасных областях, включают MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSS QGTQVTVSS (SEQ ID NO: 19) и MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEI SPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSS QGTQVTVSS (SEQ ID NO: 20), включающие каркасные области полипептидов. В примерах определены каркасные области, а также области CDR, вовлеченные в связывание PCNA.

В Европейской патентной заявке EP2703485 описан способ селекции плазматических клеток, или плазмабластов, а также способ получения специфичных для антигена-мишени антител и новые моноклональные антитела. В одном варианте осуществления описаны клетки, экспрессирующие внутриклеточный иммуноглобулин.

Покрытые антителом средства.

В некоторых вариантах осуществления антитела, или фрагменты антител, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения композиции, включающей покрытое антителом средство. Используемый в настоящем документе термин "покрытое антителом средство" означает любую частицу, наночастицу, молекулу, белок, слитый белок, липид, липосому, клеточную мембрану, клетку или другую структуру, которые содержат одно или более связанных с их поверхностью антител или фрагментов антител. Покрытые антителом средства могут быть направлены на один или более гликанов, белков, клеток, тканей, и/или органов в зависимости от специфичности антитела или фрагментов антитела, используемых для покрытия.

Покрытые антителом средства могут включать связанную, инкапсулированную или внедренную нагрузку. Нагрузка может представлять собой детектируемую метку. Некоторые нагрузки могут включать одно или более терапевтических средств. Такие терапевтические средства могут включать, но без ограничения, лекарственные средства, химиотерапевтические средства и цитотоксические средства. Цитотоксические средства могут быть использованы для уничтожения или иной дезактивации клетки. Цитотоксические средства могут включать, но без ограничения, ингибиторы цитоскелетной системы [например, ингибиторы полимеризации тубулина, такие как майтанзины или ауристатины (например, монометилауристатин E [MMAE] и монометилауристатин F [MMAF]), и ингибиторы важного для веретена деления белка кинезина (KSP)], повреждающие ДНК средства (например, калихеамицины, дуокармицины и димеры пирролобензодиазепина, такие как талирин и тезирин), ингибиторы топоизомеразы [например, соединения или производные камптотецина, такие как 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38), и производное экзатекана DXd], ингибиторы транскрипции (например, ингибиторы РНК-полимеразы, такие как аманитин) и ингибиторы киназы [например, ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) или ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы ((MEK)].

В некоторых вариантах осуществления покрытые антителом средства могут включать наночастицы, покрытые одним или более антителами или фрагментами антител, описанными в настоящем документе. Такие покрытые антителом средства могут быть направлены на один или более гликанов, включая, но без ограничения, связанные с клетками гликаны. Некоторые такие покрытые антителом средства включают одно или более цитотоксических средств.

Белки и варианты.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут существовать в виде целого полипептида, нескольких полипептидов или фрагментов полипептидов, которые независимо могут быть закодированы одной или более нуклеиновыми кислотами, множеством нуклеиновых кислот, фрагментами нуклеиновых кислот или вариантами любых из вышеперечисленного. Используемый в настоящем документе термин "полипептид" означает полимер из аминокислотных остатков (природных или неприродных), связанных вместе, чаще всего, пептидными связями. Используемый в настоящем документе термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, с любой структурой или функцией. В некоторых случаях закодированный полипептид имеет размер менее примерно 50 аминокислот, тогда полипептид называют пептидом. Если полипептид представляет собой пептид, он будет иметь длину по меньшей мере примерно 2, 3, 4, или по меньшей мере 5 аминокислотных остатков. Таким образом, полипептиды включают продукты генов, природные полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой одиночную молекулу или может представлять собой мультимолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут включать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды, и могут быть ассоциированными или связанными. Термин "полипептид" также может относиться к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические аналоги соответствующих природных аминокислот.

Термин "вариант полипептида" относится к молекулам, которые отличаются по своей аминокислотной последовательности от природной или эталонной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в некоторых положениях аминокис-

лотной последовательности в сравнении с природной или эталонной последовательностью. Обычно варианты имеют по меньшей мере примерно 50% идентичности (гомологии) с природной или эталонной последовательностью и, предпочтительно, они будут по меньшей мере на примерно 80%, более предпочтительно, по меньшей мере примерно на 90% идентичны (гомологичны) природной или эталонной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления предложены "варианты-имитаторы". Используемый в настоящем документе термин "вариант-имитатор" означает вариант, содержащий одну или более аминокислот, которые имитируют активированную последовательность. Например, глутамат может служить в качестве имитатора для фосфоро-треонина и/или фосфоро-серина. Альтернативно, варианты-имитаторы могут приводить к дезактивации или к инактивированному продукту, содержащему имитатор, например, фенилаланин может действовать в качестве инактивирующей замены для тирозина; или аланин может действовать в качестве инактивирующей замены для серина. Аминокислотные последовательности взаимодействующих с гликанами антител по изобретению могут содержать природные аминокислоты и, вследствие этого, могут считаться белками, пептидами, полипептидами или их фрагментами.

Альтернативно, взаимодействующие с гликанами антитела могут содержать как природные, так и неприродные аминокислоты.

Термин "вариант аминокислотной последовательности" относится к молекулам, имеющим некоторые отличия в их аминокислотных последовательностях в сравнении с природной или исходной последовательностью. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в некоторых положениях аминокислотной последовательности. "Природную" или "исходную" последовательность не следует путать с последовательностью дикого типа. При использовании в настоящем документе, "природная" или "исходная" последовательность является относительным термином, обозначающим оригинальную молекулу, с которой проводят сравнение. "Природные" или "исходные" последовательности или молекулы могут представлять собой последовательности дикого типа (встречающиеся в природе последовательности), но не обязательно должны быть последовательностями дикого типа.

Как правило, варианты имеют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% по меньшей мере 99,8% или по меньшей мере 99,9% идентичности последовательности в сравнении с природной последовательностью.

Термин "идентичность последовательности" применительно к аминокислотным последовательностям или нуклеотидным последовательностям определяют как процентную долю остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам во второй последовательности после выравнивания последовательностей с учетом пропусков и фрагментов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Расчет процента идентичности двух полимерных последовательностей, например, можно производить путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, можно вносить пропуски в одну или обе из первой и второй полимерных последовательностей для оптимального выравнивания, и не идентичные последовательности можно не рассматривать для целей сравнения). В конкретных вариантах осуществления длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают остатки в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято таким же остатком, что и в соответствующем положении во второй последовательности, молекулы являются идентичными в данном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для двух последовательностей, с учетом числа пропусков и длины каждого пропуска, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнять с использованием математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием таких способов, которые описаны в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Маерса-Миллера (CABIOS, 1989, 4:11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за внесение пропуска 4. Альтернативно, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием программы GAP в пакете

программ GCG с использованием матрицы NWSgapdna.CMP. Способы, обычно используемые для определения процента идентичности между последовательностями, включают, но без ограничения, те, которые описаны в публикации Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988); содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Способы определения идентичности включены в общедоступные компьютерные программы. Иллюстративные компьютерные программы для определения гомологии между двумя последовательностями включают, но без ограничения, пакет программ GCG, Devereux, J., el al., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

Термин "гомолог" применительно к аминокислотным последовательностям означает соответствующую последовательность у одного биологического вида, имеющую существенную идентичность со второй последовательностью второго биологического вида.

Термин "аналоги" должен включать варианты полипептида, которые отличаются одним или более аминокислотными изменениями, например, заменами, добавлениями или делециями аминокислотных остатков, но все еще сохраняют свойства исходного полипептида.

Настоящее изобретение охватывает взаимодействующие с гликанами антитела нескольких типов с аминокислотными отличиями, включая варианты и производные. К их числу относятся варианты с заменами, вставками, делециями и ковалентными модификациями. В силу этого, в объем настоящего изобретения включены молекулы взаимодействующих с гликанами антител, содержащие замены, вставки и/или добавления, делеции и ковалентные модификации. Например, последовательности меток или аминокислоты, например, один или более остатков лизина, могут быть добавлены к пептидным последовательностям по изобретению (например, на N-конце или C-конце). Последовательности меток могут быть использованы для очистки или локализации пептида. Остатки лизина могут быть использованы для увеличения растворимости пептида или для создания возможности биотинилирования. Альтернативно, аминокислотные остатки, расположенные в карбокси- и амино-концевых областях аминокислотной последовательности пептида или белка, могут быть, необязательно, удалены, с получением укороченных последовательностей. Альтернативно, некоторые аминокислоты (например, C-концевые или N-концевые остатки) могут быть удалены в зависимости от использования последовательности, например, для экспрессии последовательности в виде части большей по размеру последовательности, которая является растворимой или связанной с твердой подложкой.

Термин "варианты с заменами" применительно к белкам означает варианты, полученные в результате удаления по меньшей мере одного аминокислотного остатка в природной или исходной последовательности и вставки на его место в том же положении другой аминокислоты. Замены могут быть одиночными, когда заменена лишь одна аминокислота в молекуле, или они могут быть множественными, когда в одной и той же молекуле заменены две или более аминокислот.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену аминокислоты, обычно присутствующей в последовательности, другой аминокислотой с аналогичным размером, зарядом или полярностью. Примеры консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин и лейцин, другим неполярным остатком. Аналогично, примеры консервативных замен включают замену одного полярного (гидрофильного) остатка другим, например, взаимные обмены между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином, и между глицином и серином. Кроме того, замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, другим, или замена одного кислого остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, другим кислым остатком являются дополнительными примерами консервативных замен. Примеры не консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, аланин, метионин, полярным (гидрофильным) остатком, таким как цистеин, глутамин, глутаминовая кислота или лизин, и/или замену полярного остатка неполярным остатком.

Термин "варианты со вставками" применительно к белкам означает варианты, в которых одна или более аминокислот вставлены непосредственно рядом с аминокислотой в конкретном положении в природной или исходной последовательности. "Непосредственно рядом" с аминокислотой означает с образованием связи либо с альфа-карбокси, либо с альфа-амино функциональной группой аминокислоты.

Термин "варианты с делециями" применительно к белкам означает варианты, в которых одна или более аминокислот в природной или исходной аминокислотной последовательности удалены. Как правило, у вариантов с делециями одна или более аминокислот будут удалены в конкретной области молекулы.

Используемый в настоящем документе термин "производное" является синонимом с термином "вариант" и означает молекулу, которая была модифицирована или изменена любым образом относительно эталонной молекулы или исходной молекулы. В некоторых вариантах осуществления производные включают природные или исходные белки, которые были модифицированы за счет органического белкового или небелкового дериватизирующего средства и посттрансляционных модификаций. Ковалентные модификации, как правило, вводят за счет реакции аминокислотных остатков-мишеней белка с органическим дериватизирующим средством, которое способно вступать в реакцию с избранными боковыми

цепями или концевыми остатками, или за счет использования механизмов посттрансляционной модификации, которые действуют в выбранных рекомбинантных клетках-хозяевах. Полученные ковалентные производные полезны в программах, направленных на идентификацию остатков, важных для биологической активности, для иммуноанализов или для получения антител против белка с целью иммунноаффинной очистки рекомбинантного гликопротеина. Такие модификации находятся в пределах компетенции рядового специалиста в данной области и их осуществляют без излишнего экспериментирования.

Некоторые посттрансляционные модификации являются результатом действия рекомбинантных клеток-хозяев на экспрессированный полипептид. Остатки глутаминила и аспарагинила часто посттрансляционно дезамидируются до соответствующих остатков глутамила и аспартила. Альтернативно, эти остатки дезамидируются в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков может присутствовать в белках, используемых по настоящему изобретению.

Другие посттрансляционные модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)).

Ковалентные производные, в частности, включают слитые молекулы, в которых белки по изобретению ковалентно связаны с небелковым полимером. Небелковый полимер, как правило, представляет собой гидрофильный синтетический полимер, то есть полимер, не встречающийся в природе. Однако также полезны полимеры, которые существуют в природе и производятся рекомбинантными или in vitro способами, как и полимеры, которые выделены из природного источника. Гидрофильные поливиниловые полимеры входят в объем настоящего изобретения, например, поливиниловый спирт и поливинилпирролидон. Особенно полезными являются поливинилалкиленовые эфиры, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль. Белки могут быть связаны с различными небелковыми полимерами, такими как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, способом, описанным в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Термин "признаки" применительно к белкам означает конкретные компоненты молекулы, основанные на аминокислотной последовательности. Признаки белков по настоящему изобретению включают поверхностные элементы, локальную комформационную форму, укладку, петли, полупетли, домены, полудомены, сайты, концы молекулы или любое их сочетание.

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "поверхностный элемент" означает полипептидный компонент белка, появляющийся на внешней поверхности.

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "локальная конформационная форма" означает полипептидный структурный элемент белка, расположенный в конкретном пространстве белка.

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "укладка" означает конформацию аминокислотной последовательности, полученную при минимизации энергии. Укладка может иметь место на вторичном или третичном уровне процесса укладки. Примеры укладок вторичного уровня включают бета-листы и альфа-спирали. Примеры укладок третичного уровня включают домены и области, образовавшиеся вследствие агрегации или разделения энергетических сил. Области, образовавшиеся таким образом, включают гидрофобные и гидрофильные карманы, и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин "поворот" применительно к конформации белка означает изгиб, который изменяет направление каркаса пептида или полипептида и может включать один, два, три или более аминокислотных остатков.

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "петля" означает структурный признак пептида или полипептида, который изменяет на обратное направление каркаса пептида или полипептида и включает четыре или более аминокислотных остатков. Oliva et al. идентифицировали по меньшей мере 5 классов белковых петель (J. Mol Biol 266 (4): 814-830; 1997).

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "полупетля" означает часть определенной петли, содержащую по меньшей мере половину количества аминокислотных остатков петли, из которой она происходит. Понятно, что петли не всегда могут содержать четное число аминокислотных остатков. Вследствие этого, в тех случаях, когда петля содержит или, как определено, включает нечетное число аминокислот, полупетля петли с нечетным числом остатков будет включать часть с целым числом или часть с ближайшим целым числом остатков петли (число аминокислот петли/2+/-0,5 аминокислоты). Например, из петли, определенной, как имеющая 7 аминокислот, могут получиться полупетли с 3 аминокислотами или 4 аминокислотами (7/2=3,5+/-0,5 составляет 3 или 4).

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "домен" означает фрагмент полипептида, имеющий одну или более легкоразличимых структурных или функциональных характеристик, или свойств (например, имеющий способность к связыванию, служащий в качестве сайта белок-белковых взаимодействий).

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "полудомен" означает часть определенного домена, имеющую по меньшей мере половину количества аминокислотных остатков домена, из которого она происходит. Понятно, что домены не всегда могут содержать четное число

аминокислотных остатков. Вследствие этого, в тех случаях, когда домен содержит или, как определено, включает нечетное число аминокислот, полудомен домена с нечетным числом остатков будет включать часть с целым числом или часть с ближайшим целым числом остатков домена (число аминокислот домена/2+/-0,5 аминокислоты). Например, из домена, определенного, как имеющий 7 аминокислот, могут получиться полудомены с 3 аминокислотами или 4 аминокислотами (7/2=3,5+/-0,5 составляет 3 или 4). Также понятно, что в доменах или полудоменах могут быть идентифицированы субдомены, эти субдомены обладают менее чем всеми, структурными или функциональными свойствами, идентифицированными в доменах или полудоменах, из которых они происходят. Также понятно, что аминокислоты доменов любых типов, описанных в настоящем документе, не обязательно должны располагаться непрерывно вдоль каркаса полипептида (то есть не соседние аминокислоты могут укладываться структурно, с образованием домена, полудомена или субдомена).

Используемый в настоящем документе применительно к белкам термин "сайт", когда он относится к вариантам осуществления на основе аминокислот, является синонимом терминов "аминокислотный остаток" и "боковая цепь аминокислоты". Сайт представляет собой положение в пептиде или полипептиде, которое может быть модифицировано, подвергнуто манипуляциям, изменено, дериватизировано или заменено в полипептидных молекулах по настоящему изобретению.

Используемые в настоящем документе термины "концы" или "конец" применительно к белкам означают крайние точки пептида или полипептида. Такие крайние точки не ограничены только первым и последним сайтом пептида или полипептида, но также могут включать дополнительные аминокислоты в концевых областях. Полипептидные молекулы по настоящему изобретению могут быть охарактеризованы, как имеющие и N-конец (заканчивающийся на аминокислоту со свободной аминогруппой (NH_2)), и С-конец (заканчивающийся на аминокислоту со свободной карбоксильной группой (COOH)). В некоторых случаях белки по изобретению состоят из нескольких полипептидных цепей, связанных между собой дисульфидными связями или нековалентными связями (мультимеры, олигомеры). Белки такого типа будут иметь несколько N- и С-концов. Альтернативно, концы полипептидов могут быть модифицированы так, что они начинаются или заканчиваются, в зависимости от конкретного случая, не полипептидным фрагментом, таким как органический конъюгат.

После того, как любые признаки были идентифицированы или определены в качестве компонентов молекулы по изобретению, различные манипуляции и/или модификации с этими признаками могут быть произведены путем перемещения, обмена, инвертирования, удаления, рандомизации или дупликации. Более того, понятно, что манипуляции с признаками могут приводить к таким же результатам, что и модификация молекул по изобретению. Например, манипуляция, включающая удаление домена, привела бы к изменению длины молекулы точно так же, как привела бы модификация нуклеиновой кислоты для кодирования менее чем полноразмерной молекулы.

Модификации и манипуляции можно осуществлять методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез. Полученные модифицированные молекулы затем могут быть протестированы на активность с использованием in vitro или in vivo анализов, таких как те, которые описаны в настоящем документе, или любых других подходящих скрининговых анализов, известных в данной области.

Изотопные варианты.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут содержать один или более атомов, которые представляют собой изотопы. Используемый в настоящем документе термин "изотоп" означает химический элемент, который имеет один или более дополнительных нейтронов. В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению могут быть дейтерированными. Используемый в настоящем документе термин "дейтерированное" относится к веществу, в котором один или более атомов водорода заменены изотопом дейтерием. Изотоп дейтерий представляет собой изотоп водорода. Ядро водорода содержит один протон, в то время как ядро дейтерия содержит как протон, так и нейтрон. Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть дейтерированы для изменения физического свойства соединения, такого как стабильность, или для получения возможности использования соединений в диагностических или экспериментальных вариантах применения.

Конъюгаты и сочетания.

По настоящему изобретению предусмотрено, что взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут находиться в комплексе, быть конъюгированы или объединены с одной или более гомологичными или гетерологичными молекулами. Используемый в настоящем документе термин "гомологичная молекула" означает молекулу, которая является сходной, по меньшей мере одним из структуры или функции, с исходной молекулой, в то время как "гетерологичная молекула" представляет собой молекулу, которая отличается, по меньшей мере одним из структуры или функции, от исходной молекулы. Таким образом, структурные гомологи представляют собой молекулы, которые имеют в значительной степени аналогичные структуры. Они могут быть идентичными. Функциональные гомологи представляют собой молекулы, которые имеют в значительной степени аналогичные функции. Они могут быть идентичными.

Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут включать конъюгаты. Такие

конъюгаты по изобретению могут содержать природное вещество или лиганд, такой как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полимеров включают полиаминокислоты, такие как полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновая кислота, поли-L-глутаминовая кислота, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактид-со-гликолид), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламид (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид полиамин, пептидомиметик полиамин, дендример полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Конъюгаты также могут включать направляющие группы, например, направляющие на клетку или ткань средство или группу, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с клетками конкретного типа, например, клетками почки. Направляющая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактант белок A, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин, пептид RGD, пептидомиметик RGD или аптамер.

Направляющие группы могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфической аффинностью для ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывает клетки конкретного типа, такие как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Направляющие группы также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать не пептидные молекулы, такие как, липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры.

Направляющая группа может представлять собой любой лиганд, способный направлять к конкретному рецептору. Примеры включают, без ограничения, фолат, GalNAc, галактозу, маннозу, маннозу-6P, аптамеры, лиганды рецепторов интегрина, лиганды рецепторов хемокина, трансферрин, биотин, лиганды рецепторов серотонина, лиганды рецепторов PSMA, эндотелина, GCPII, соматостатина, LDL и HDL. В конкретных вариантах осуществления направляющая группа представляет собой аптамер. Аптамер может быть не модифицированным или может иметь любое сочетание модификаций, раскрытых в настоящем документе.

В других вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела ковалентно конъюгированы с проникающим в клетку полипептидом. Проникающий в клетку пептид также может содержать сигнальную последовательность. Конъюгаты по изобретению могут быть спроектированы, чтобы иметь повышенную стабильность; повышенную способность к трансфекции клеток; и/или измененный характер биораспределения (например, быть направлены на ткани или клетки конкретных типов).

К взаимодействующим с гликанами антителам могут быть добавлены такие конъюгированные фрагменты, которые позволяют производить мечение или помечать мишени для клиренса. Такие маркирующие/помечающие молекулы включают, но без ограничения, убиквитин, флуоресцентные молекулы, гемагглютинин вируса гриппа человека (HA), c-myc [сегмент человеческого протоонкогена myc из 10 аминокислот с последовательностью EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 21)], гистидин (His), FLAG-маркер [короткий пептид с последовательностью DYKDDDDK (SEQ ID NO: 22)], глутатион-S-трансферазу (GST), V5 (эпитоп парамиксовируса обезьян 5), биотин, авидин, стрептавидин, пероксидазу хрена (HRP) и дигоксигенин.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела могут быть объединены друг с другом или с другой молекулой при лечении заболевания или состояния.

Нуклеиновые кислоты.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты кодируют антитела по изобретению (включая, но без ограничения, антитела, фрагменты антител, интратела и химерные антигенные рецепторы). Такие молекулы нуклеиновой кислоты включают, без ограничения, молекулы ДНК, молекулы РНК, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, молекулы мРНК, векторы, плазмиды и другие конструкты. Используемый в настоящем документе термин "конструкт" означает любую рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, включая, но без ограничения, плазмиды, космиды, автономно реплицируемые полинуклеотидные молекулы, либо линейные или кольцевые одноцепочечные или двухцепочечные полинуклеотидные молекулы ДНК или РНК. Настоящее изобретение также относится к клеткам, программируемым или созданным для экспрессии молекул нуклеиновых кислот, кодирующих взаимодействующие с гликанами антитела. Такие клетки

могут быть получены с использованием трансфекции, электропорации, вирусной доставки и тому подобного. Рекомбинантные вирусы с конструктами по изобретению могут включать, но без ограничения, лентивирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и фаги. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты по изобретению включают кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты. Способы получения кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот известны в данной области и могут включать, но без ограничения, те, которые описаны в патентах США № 5786464 и 6114148, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована для улучшения экспрессии белка или для удаления скрытых участков сплайсинга.

II. Способы и варианты применения.

Терапевтические варианты применения.

Способы по настоящему изобретению включают, но без ограничения, способы использования одного или более взаимодействующих с гликанами антител для терапевтических, диагностических целей, количественного определения, биологического процессинга, а также экспериментальных и/или исследовательских целей. Такие взаимодействующие с гликанами антитела могут включать анти-STn антитела.

Варианты применения, относящиеся к лечению рака.

Аберрантное гликозилирование является отличительным признаком злокачественной трансформации клеток. Множество аберрантных форм гликозилирования были описаны при разных формах рака у человека, что позволяет идентифицировать определенные опухоль-ассоциированные углеводные антигены (TACA) как класс молекул клеточной поверхности, подходящих для специфического нацеливания препаратов на опухоли (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). Экспрессия TACA-антигенов была обнаружена при эпителиальных формах рака, включая, но без ограничения, рак молочной железы, толстой кишки, легкого, мочевого пузыря, шейки матки, яичника, желудка, предстательной железы и печени. Экспрессия TACA-антигенов была обнаружена при эмбриональных формах рака, включая, но без ограничения, опухоли желточного мешка и семиномы. Кроме того, экспрессия TACA-антигенов была обнаружена при многих формах меланомы, карциномы и лейкозов различных тканей (Heimburg-Molinaro et al., Vaccine. 2011 Nov 8: 29(48): 8802-8826). Антитела по настоящему изобретению, направленные на один или более TACA, в настоящем документе называют "анти-TACA антитела".

По оценкам, клетки примерно 80% всех карцином экспрессируют укороченный гликан, антиген Tn. С некоторыми исключениями, Tn и сиалированная форма, сиалил-Tn (STn), не экспрессируются в нормальных здоровых тканях. Кроме того, отсутствующая у человека иммуногенная сиаловая кислота, N-гликолилнейраминовая кислота (Neu5Gc), судя по всему, дифференциально экспрессируется на карциномах, таких как рак молочной железы, в форме Neu5Gc-STn (GcSTn).

Множество аберрантных форм гликозилирования были описаны при разных формах рака у человека, что позволяет идентифицировать определенные гликаны как класс молекул клеточной поверхности, подходящих для специфического нацеливания препаратов на опухоли (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15(17):5323-37). Например, при различных видах рака человека (таких как рак мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легкого и яичника, среди прочих) наблюдется высокая экспрессия антигена STn, который редко встречается в нормальных человеческих тканях (Karlen, P. et al., Gastroenterology. 1998 Dec; 11 5(6): 1395-404; Ohno, S. et al., Anticancer Res. 2006 Nov-Dec; 26(6A):4047-53). Кроме того, присутствие STn на связанных с опухолями муцинах связано с неблагоприятным прогнозом болезни и, вследствие этого, он считается многообещающим эпитопом для обнаружения и таргетной терапии рака (Cao, Y. et al., Virchows Arch. 1997 Sep; 431(3): 159-66; Julien, S. et al., Br J Cancer. 2009 Jun 2; 100(11): 1746-54; Itzkowitz, S.H. et al., Cancer. 1990 Nov 1; 66(9): 1960-6; Motoo, Y. et al., Oncology. 1991; 48(4):321-6; Kobayashi, H. et al., J Clin Oncol. 1992 Jan; 10(1):95-101). Образование Tn и STn связано с соматическими мутациями в гене Cosmc, который кодирует молекулярный шаперон, необходимый для образования активной T-синтазы (Ju, T. et al., Nature. 2005 Oct 27; 437(7063):1252; Ju, T. et al., Cancer Res. 2008 Mar 15; 68(6): 1636-46). Оно также может являться результатом повышенной экспрессии сиалил-трансферазы, ST6GalNAc I (Ikehara, Y. et al., Glycobiology. 1999 Nov; 9(11): 1213-24; Brockhausen, I. et al., Biol Chem. 2001 Feb; 382(2):219-32). De novo экспрессия STn способна приводить к модуляции клеток карциномы, изменениям злокачественного фенотипа и приводить к более агрессивному поведению клеток (Pinho, S. et al., Cancer Lett. 2007 May 8; 249(2): 157-70). Хотя STn экспрессируется на высоком уровне в злокачественных тканях, экспрессия на низких уровнях также обнаружена на здоровых клетках человека (Jass, J.R. et al., J Pathol. 1995 Jun; 176(2): 143-9; Kirkeby, S. et al., Arch Oral Biol. 2010 Nov; 55(11):830-41). Сам по себе STn привлекает внимание в качестве мишени для обнаружения и терапии рака (Cheever, M.A. et al., Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15(17):5323-37).

Помимо присутствия STn, и другие изменения гликозилирования были отмечены при раке. Одно из них включает Neu5Gc. N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac) и Neu5Gc являются двумя основными сиаловыми кислотами на поверхностях клеток млекопитающих. Neu5Ac и Neu5Gc отличаются лишь тем, что Neu5Gc содержит дополнительный атом кислорода, связанный с химической группой, присоединенной к углероду 5. Вследствие утраты функционального гена, сиаловая кислота в организме человека мо-

жет синтезироваться лишь в форме Neu5Ac, но не Neu5Gc. Однако Neu5Gc может метаболически попадать в организм человека из продуктов питания животного происхождения, таких как красное мясо (Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Oct 14; 100(21): 12045-50; Nguyen, D.H. et al., J Immunol. 2005 Jul 1; 175(1):228-36; US7682794, US8084219, US2012/0142903, WO2010030666 и WO2010030666, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Neu5Gc присутствует в значительном избытке в опухолях человека (Higashi, H. et al., Cancer Res. 1985 Aug; 45(8):3796-802; Miyoshi I. et al., Mol Immunol. 1986. 23: 631-638; Hirabayashi, Y. et al., Jpn J Cancer Res. 1987. 78: 614-620; Kawachi. S, et al., Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988. 85: 381-383; Devine, P.L. et al., Cancer Res. 1991. 51: 5826-5836; Malykh, Y.N. et al., Biochimie. 2001. 83: 623-634 и Inoue, S. et al., 2010. Glycobiology. 20(6): 752-762) и находится на очень низком уровне в нормальных тканях человека, что упускалось из виду в течение нескольких десятилетий (Diaz, S.L. et al., PLoS One. 2009. 4: e4241; Tangvoranuntakul, P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100: 12045-12050; Varki, A. et al., Glycoconj J. 2009. 26: 231-245). Повышенное метаболическое накопление поступающей из продуктов питания Neu5Gc в раковых тканях в сравнении со здоровыми человеческими тканями, скорее всего, может быть объяснено по меньшей мере тремя факторами: быстрым ростом с недостаточным продуцированием конкурирующей эндогенной Neu5Ac, усиленным макропиноцитозом, вызванным факторами роста (Dharmawardhane, S. et al., Mol Biol Cell. 2000 Oct; 11(10):3341-52; Simonsen, A. et al., Curr Opin Cell Biol. 2001 Aug; 13(4):485-92; Johannes, L. et al., Traffic. 2002 Jul; 3(7):443-51; Amyere, M. et al., Int J Med Microbiol. 2002 Feb; 291(6-7):487-94), и стимуляцией экспрессии гена лизосомного переносчика сиаловой кислоты сиалина в результате гипоксии (Yin, J. et al., Cancer Res. 2006 Mar 15; 66(6):2937-45). Кроме того, все люди, протестированные до настоящего времени, имеют резервуар поликлональных антител против не принадлежащей человеку Neu5Gc, что делает ее первым примером ксено-аутоантигена (Padler-Karavani, V. et al., Glycobiology. 2008 Oct; 18(10):818-30; Varki, N.M. et al., Annu Rev Pathol. 2011; 6:365-93). Показано, что накопление пищевой Neu5Gc в злокачественных опухолях, несмотря на анти-Neu5Gc ответ, способствует прогрессированию опухолей за счет индукции слабого хронического воспаления (Hedlund, M. et al., Proc Natl Acad Sci US A. 2008 Dec 2; 105(48):18936-41). Таким образом, Neu5Gc, содержащая гликановые эпитопы, на человеческих опухолях предоставляет ценную возможность таргетирования лекарственных средств. В недавнем исследовании у пациентов с раком было обнаружено наличие антител против Neu5Gc-содержащего STn (GcSTn), но не Neu5Ac-STn (AcSTn), и был изучен их потенциал в качестве специфического биомаркера для обнаружения рака (Padler-Karavani, V. et al., Cancer Res. 2011 May 1; 71(9):3352-63).

MUC1 представляет собой ключевой гликопротеин клеточной поверхности, который обычно является сильно гликозилированным, но недостаточно гликозилированным в опухолевых клетках. Слабое гликозилирование MUC1 приводит к экспонированию иммуногенных антигенов. Они могут находиться на последовательности корового пептида MUC1 или на коровых углеводных остатках. Эти TACA включают, но без ограничения, N-ацетилгалактозамин (Tn), сиалил(α2,6)N-ацетилгалактозамин (STn) и галактоза((31-3)N-ацетилгалактозамин (также известный как антиген Томсона-Фриденрайха или TF). По оценкам, клетки примерно 80% всех карцином экспрессируют Tn среди коровых углеводов MUC1, при этом STn обильно экспрессируется на клетках карциномы человека и связан с прогрессированием и метастазированием рака. С некоторыми исключениями, Tn и STn не экспрессируются в нормальных здоровых тканях. Сиаловая кислота образует выступающий эпитоп на STn. В изобретении использован тот факт, что аберрантная экспрессия гликана Neu5Gc-STn (GcSTn), по всей видимости, является высоко специфической для различных карцином.

В случае MUC1, включение Neu5Gc в STn приводит к образованию опухоль-специфической мишени, сайта, который является многообещающей мишенью для основанной на антителах терапии опухолевых тканей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействующие с гликанами антитела направлены на MUC1-экспрессирующие раковые клетки, содержащие Neu5Gc. До настоящего времени Neu5Gc была обнаружена в гликоконъюгатах из целого ряда тканей раковых опухолей человека, включая, но без ограничения, рак толстого кишечника, ткань ретинобластомы, меланому, рак молочной железы и ткань опухоли желточного мешка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения взаимодействующими с гликанами антителами этих форм рака, а также других форм рака, конкретно не упомянутых в настоящем документе, которые характеризуются наличием раковых клеток, содержащих Neu5Gc.

Были идентифицированы дополнительные антигены, включающие гликаны, экспрессия которых коррелирует с раком (Heimburg-Molinaro, J. et al., Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8; 29(48):8802-26). Эти опухоль-ассоциированные углеводные антигены включают, но без ограничения, связанные с группой крови Льюиса антигены [включая, но без ограничения, Lewis^Y (Le^Y), Lewis^x (Le^x), сиалил-Lewis^x (SLe^x) и сиалил-Lewis^A (SLe^A)], гликосфинголипид-связанные антигены [включая, но без ограничения, Globo H, стадиеспецифический эмбриональный антиген 3 (SSEA-3) и гликосфинголипиды, которые включают сиаловую кислоту], ганглиозид-связанные антигены [включая, но без ограничения, ганглиозиды GD2, GD3, GM2, фукозил GM1 и Neu5GcGM3] и связанные с полисиаловой кислотой антигены.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против связанных с группой крови Льюиса антигенов. Связанные с группой крови Льюиса антигены содержат остаток фукозы, связанный с GlcNAc α1-3 связью или α1-4 связью. Они могут находиться как на гликолипидах, так и на гликопротеинах. Связанные с группой крови Льюиса антигены можно обнаружить в жидкостях организма индивидуумов, которые секретируют эти антигены. Их нахождение на красных клетках крови является следствием абсорбции антигенов Льюиса из сыворотки красными клетками крови.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против Le^Y. Le^Y (также известный как CD174) состоит из Galβ1,4GlcNAC, имеющего α1,2-, а также α1,3-связанные остатки фукозы, с образованием эпитопа Fucα(1,2)Galβ(1,4)Fucα(1,3)GlcNAc. Он синтезируется из H-антигена при помощи α1,3-фукозилтрансфераз, которые присоединяют α1,3-фукозу к остатку GlcNAc родительской цепи. Le может экспрессироваться при разных видах рака, включая, но без ограничения, рак яичника, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, легкого и эпителия. Из-за его низкого уровня экспрессии в нормальных тканях и повышенного уровня экспрессии при многих видах рака антиген Le^Y является многообещающей мишенью для терапевтических антител.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против Le^x. Le^x включает эпитоп Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R. Он также известен как CD15 и стадиеспецифический эмбриональный антиген 1 (SSEA-1). Этот антиген сначала был идентифицирован, как иммунореактивный с сывороткой, полученной от мыши, которую иммунизировали клетками тератокарциномы F9. Также было установлена корреляция Le^x с эмбриональным развитием на определенных стадиях. Он также экспрессируется в различных тканях, как при наличии, так и в отсутствие рака, но также может быть обнаружен в клетках рака молочной железы и рака яичника, где он экспрессируется только злокачественными клетками.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против SLe^A и/или SLe^x. SLe^A и SLe^x содержат структуры Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-R и Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R, соответственно. Их экспрессия повышена в раковых клетках. Присутствие этих антигенов в сыворотке коррелирует со злокачественностью и неблагоприятным прогнозом. SLe^x в основном встречается в виде концевого эпитопа муцина. Он экспрессируется при целом ряде различных видов рака, включая рак молочной железы, яичника, меланому, рак толстой кишки, печени, легкого и предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мишени SLe^A и SLe^x содержат Neu5Gc (в настоящем документе их называют $GcSLe^A$ и $GcSLe^x$, соответственно).

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против гликолипидов и/или эпитопов, находящихся на гликолипидах, включая, но без ограничения, гликосфинголипиды. Гликосфинголипиды содержат липид церамид, связанный с гликаном гидроксильной группой церамида. На клеточной мембране гликосфинголипиды образуют кластеры, называемые "липидными рафтами".

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против Globo H. Globo H представляет собой связанный с раком гликосфинголипид, впервые идентифицированный в клетках рака молочной железы. Гликановая часть Globo H включает Fucα(1-2)Galβ(1-3)GalNAcβ(1-3)Galα(1-4)Galβ(1-4)Glcβ(1). Хотя его можно обнаружить в целом ряде нормальных эпителиальных тканей, была обнаружена связь Globo H с тканями многих опухолей, включая, но без ограничения, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, предстательной железы, легкого, поджелудочной железы, желудка, яичника и опухолей эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства по настоящему изобретению могут быть направлены против ганглиозидов. Ганглиозиды представляют собой гликосфинголипиды, содержащие одну или более сиаловых кислот. Согласно номенклатуре ганглиозидов, G используют в качестве аббревиатуры для ганглиозида. За этой аббревиатурой следуют буквы M, D или T, указывающие на число присоединенных остатков сиаловой кислоты (1, 2 или 3 соответственно). И наконец, цифры 1, 2 или 3 используют для обозначения порядка расстояния, которое каждый из них проходит при анализе методом тонкослойной хроматографии (при этом 3 проходит наибольшее расстояние, за ним следует 2, а затем 1). Известно, что ганглиозиды вовлечены в рост и метастазирование рака и могут экспрессироваться на клеточной поверхности опухолевых клеток. Ганглиозиды, экспрессируемые на опухолевых клетках, могут включать, но без ограничения, GD2, GD3, GM2 и фукозил-GM1 (в настоящем документе также называемый Fuc-GM1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействующие с гликанами антитела направлены против GD3. GD3 является регулятором роста клеток. В некоторых вариантах осуществления направленные на GD3 антитела используют для модулирования роста клеток и/или ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления направленные на GD3 антитела используют для модулирования прикрепления клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействующие с гликанами антитела направлены против GM2. В некоторых вариантах

осуществления направленные на GM2 антитела используют для модулирования межклеточных контактов. В некоторых вариантах осуществления ганглиозидные мишени по настоящему изобретению содержат Neu5Gc. В некоторых вариантах осуществления такие мишени могут включать вариант GM3, содержащий Neu5Gc (в настоящем документе называемый GcGM3). Гликановый компонент GcGM3 представляет собой Neu5Gcα2-3Galβ1-4Glc. GcGM3 является известным компонентом опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления TACA, являющиеся мишенью для анти-TACA антител по настоящему изобретению, могут включать, но без ограничения, любые из тех, которые перечислены в патентных публикациях США № US2013/0236486A1, US2013/0108624A1, US2010/0178292A1, US2010/0104572A1, US2012/0039984A1, US2009/0196916A1 и US2009/0041836A1, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Способ по настоящему изобретению включает способы лечения рака при помощи одного или более антител, описанных в настоящем документе. Такие антитела могут содержать один или более вариабельных доменов, приведенных в табл. 2. Антитела также могут содержать один или более константных доменов IgG, приведенных в табл. 3. Антитела могут представлять собой гуманизированные антитела. Антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые содержат лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из средств, перечисленных в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из средств, перечисленных в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой MMAE. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом через линкер.

STn при раке.

Иммунная система имеет множество механизмов для стимуляции иммунной активности против опухолевых клеток, включая как врожденный, так и адаптивный иммунитет. Используемый в настоящем документе термин "иммунная активность против опухолевых клеток" означает любую активность иммунной системы, которая приводит к гибели или предотвращению роста и/или пролиферации опухолевых клеток. В некоторых случаях противоопухолевая иммунная активность включает узнавание и уничтожение опухолевых клеток клетками - естественными киллерами (NK) и фагоцитоз макрофагами. Адаптивные противоопухолевые иммунные ответы включают поглощение и представление опухолевого антигена антигенпредставляющими клетками (APC), такими как дендритные клетки (DC), что приводит к модуляции противоопухолевой активности Т-клеток и/или экспансии В-клеток с секрецией опухоль-специфических антител. Связывание опухоль-специфических антител с опухолями может приводить к гибели опухолевых клеток по механизму антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Используемый в настоящем документе термин "иммунорезистентная опухолевая клетка" означает опухолевую клетку, которая способна ослаблять, или избегать, иммунную активность против опухолевых клеток. Некоторые исследования указывают на то, что экспрессия STn (известного TACA) на поверхности опухолевых клеток или секреция в микроокружение опухолевых клеток может способствовать избеганию опухолевой клеткой противоопухолевой иммунной активности. Используемый в настоящем документе термин "микроокружение опухолевой клетки" означает любую область, находящуюся вблизи, или вокруг, опухолевой клетки. Такие области включают, но без ограничения, области между опухолевыми клетками, между опухолевыми и не опухолевыми клетками, окружающие жидкости и окружающие компоненты внеклеточного матрикса.

Сталированные муцины, содержащие STn, как показано Ogata et al., уменьшают направленное действие NK-клеток на опухолевые клетки (Ogata, S. et al., 1992. Cane. Res. 52:4741-6, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В данном исследовании установлено, что присутствие овечьего, бычьего или свиного муцина подчелюстных желез (OSM, BSM и PSM, соответственно) приводит к почти стопроцентному ингибированию цитотоксичности (смотри табл. 2 в публикации Ogata et al.). Дальнейшие исследования Jandus et al. продемонстрировали, что некоторые опухолевые клетки могут избегать уничтожения за счет NK благодаря экспрессии сиалогликановых лигандов, которые могут взаимодействовать с SIGLEC-рецепторами NK-клеток, что приводит к ингибированию NK (Jandus, C. et al., 2014, JCI. pii: 65899, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В исследованиях Toda et al. было показано, что STn может связываться с рецепторами CD22 на В-клетках, что приводит к уменьшению передачи сигналов и снижению В-клеточной активации (Toda, M. et al., 2008. Biochem Biophys Res Commun. 372(1):45-50, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Дендритные клетки (DC) могут влиять на адаптивную иммунную активность путем модуляции Т-клеточной активности. Исследования Carrascal с соавторами показали, что экспрессия STn клетками рака мочевого пузыря приводила к толерантности DC, снижая их способность индуцировать иммунную активность против опухолевых клеток у Т-клеток (Carrascal, MA et al., 2014. Mol Oncol, pii: S1574-7891(14)00047-7, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Результаты данных исследований показали, что DC, вступающие в контакт с STn-положительными клетками рака мочевого пузыря, демонстрировали толероген-

ный профиль экспрессии с низкой экспрессией CD80, CD86, IL-12 и TNF-α. Кроме того, установлено, что DC модулируют регуляторные Т-клетки таким образом, что Т-клетки имеют низкую экспрессию IFNγ и высокую экспрессию FoxP3. Другие исследования, проведенные van Vliet с соавторами, указывают на то, что экспрессия на поверхности DC макрофагального лектина галактозного типа (MGL) может приводить к направлению этих клеток на опухолевые ткани (van Vliet, SJ., 2007. Amsterdam: Vrije Universiteit. P1-232 и van Vliet, SJ. et al., 2008. J Immunol. 181(5):3148-55, Nollau, P. et al., 2013. J Histochem Cytochem. 61(3): 199-205, содержание каждой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). DC, прибывающие в ткани вследствие взаимодействий MGL, могут влиять на Т-хелперы (Th) одним из трех способов. DC могут индуцировать Т-клеточную толерантность, Т-клеточную иммунную активность или подавление эффекторных Т-клеток. Показано, что MGL связывает как AcSTn, так и GcSTn, и аффинность была проанализирована подробно (Mortezai, N. et al., 2013. Glycobiology. 23(7): 844-52, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Интересно, что экспрессия MUC1 на опухолях, как показано, приводит к Т-клеточной толерантности, защищая опухолевые клетки от уничтожения иммунной системой.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела (включая, но без ограничения, анти-STn антитела) по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения субъектов, имеющих одну или более опухолевых клеток, экспрессирующих один или более TACA. В некоторых случаях взаимодействующие с гликанами антитела (включая, но без ограничения, анти-STn антитела) по изобретению могут быть использованы для повышения иммунной противоопухолевой активности в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих STn. Такие антитела могут приводить к усилению адаптивного иммунного ответа и/или врожденного иммунного ответа в отношении иммунорезистентных опухолевых клеток. Некоторые взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы для повышения противоопухолевой активности NK-клеток. В некоторых случаях такие взаимодействующие с гликанами антитела могут блокировать взаимодействие между гликановыми рецепторами, экспрессированными на NK-клетках, и STn-гликанами на раковых клетках или в окружающих тканях.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела (включая, но без ограничения, анти-STn антитела) по изобретению могут быть использованы для увеличения противоопухолевой активности В-клеток. Такие антитела могут уменьшать взаимодействие между рецепторами CD22 на В-клетках и STn-гликанами на раковых клетках или в окружающих тканях. В исследовании, проведенном Sjoberg с соавторами, показано, что 9-O-ацетилирование α2,6-связанных сиаловых кислот на гликопротеинах также приводит к уменьшению взаимодействия между В-клеточными рецепторами CD22 и такими гликопротеинами (Sjoberg, E.R. et al. 1994. JCB. 126(2): 549-562). В другом исследовании, проведенном Shi с соавторами, было установлено, что более высокое содержание 9-O-ацетилированных остатков сиаловой кислоты на мышиных эритролейкозных клетках делает эти клетки более подверженными опосредованному комплементом лизису (Shi, W-X. et al., 1996. J of Biol Chem. 271(49): 31526-32, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела по изобретению способны к избирательному связыванию не 9-O-ацетилированного STn, что уменьшает общее связывание STn, однако приводит к уменьшению роста и/или пролиферации опухолевых клеток (например, за счет увеличения В-клеточной противоопухолевой активности и увеличения опосредованного комплементом уничтожения опухолевых клеток). В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела (включая, но без ограничения, анти-STn антитела) по изобретению могут быть использованы для увеличения противоопухолевой активности DC. Такие антитела могут быть использованы для уменьшения толерантности DC для опухолевых клеток. Уменьшение толерантности DC может включать увеличение в DC экспрессии CD80, CD86, IL-12 и/или TNF-α. В некоторых случаях противоопухолевая активность DC может включать стимуляцию Т-клеточной противоопухолевой активности. Такие антитела могут предотвращать связывание между DC MGL и гликанами, экспрессированными на раковых клетках или рядом с ними.

Результаты исследования, проведенного Ibrahim с соавторами, свидетельствуют о том, что высокие уровни анти-STn антител наряду с эндокринной терапией могут увеличивать общую выживаемость и время до прогрессирования болезни (TTP) у женщин с метастатическим раком молочной железы (Ibrahim, N.K. et al., 2013. 4(7): 577-584, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В этом исследовании уровни анти-STn антител были повышены после вакцинации STn, связанным с гемоцианином лимфы улитки (KLH). В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела по изобретению могут быть использованы в сочетании с эндокринной терапией (например, введением тамоксифена и/или ингибитора ароматазы).

Экспрессия STn предположительно вносит вклад в метастатический потенциал клеток опухоли яичника. В соответствии с некоторыми способами по изобретению, анти-STn антитела могут быть использованы для уменьшения метастазирования клеток опухоли яичника. Такие способы могут приводить к уменьшению метастазирования на величину от примерно 1% до примерно 15%, от примерно 5% до

примерно 25%, от примерно 10% до примерно 50%, от примерно 20% до примерно 60%, от примерно 30% до примерно 70%, от примерно 40% до примерно 80%, от примерно 50% до примерно 90%, от примерно 75% до примерно 95% или по меньшей мере 95%.

Некоторые способы по настоящему изобретению включают способы лечения рака у субъекта одним или более из антител, описанных в настоящем документе, при этом субъект имеет по меньшей мере одну раковую клетку, экспрессирующую STn. Антитела могут связывать STn. Такие антитела могут содержать один или более вариабельных доменов, приведенных в табл. 2. Некоторые антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, могут содержать разные сочетания последовательностей антител, описанных в настоящем документе. Такие антитела также могут содержать один или более константных доменов IgG, приведенных в табл. 3. Антитела могут представлять собой гуманизированные антитела. Антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые содержат лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из средств, перечисленных в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из средств, перечисленных в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой MMAE. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом через линкер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рака у субъекта, при этом субъект имеет по меньшей мере одну раковую клетку, экспрессирующую STn, и при этом субъект имеет заболевание, резистентное к лечению соединениями платины. Заболевание, резистентное к лечению соединениями платины, имеет устойчивость к лечению соединениями платины, которая наблюдается у определенного процента всей популяции субъектов, получающих лечение от рака. Субъект может получать лечение путем введения анти-STn антитела субъекту. По меньшей мере одна раковая клетка может представлять собой клетку рака яичника. По меньшей мере одна раковая клетка может быть резистентной к цисплатину. По меньшей мере одна раковая клетка может быть частью опухоли.

Анти-STn антитела, используемые для лечения рака у субъектов с резистентным к соединениям платины заболеванием, могут представлять собой ADC. ADC могут представлять собой конъюгаты с цитотоксическим средством, включающие любые из форматов, описанных в настоящем документе. Анти-STn антитела можно вводить в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 25 мг/кг. Введение можно осуществлять путем внутривенной инъекции. Введение может включать, но не ограничивается ими, ежедневное введение, еженедельное введение или ежемесячное введение.

В некоторых вариантах осуществления лечение при помощи анти-STn антител может приводить к уменьшению поддающихся обнаружению уровней STn в жидкостях организма и/или тканях субъекта. STn может быть связан с белками или другими носителями. В некоторых случаях снижаются уровни STn в сыворотке.

Раковые стволовые клетки в качестве терапевтических мишеней.

Раковые стволовые клетки или CSC (также называемые опухоль-инициирующими клетками) представляют собой подгруппу клеток в гетерогенной раковой ткани или популяции опухолевых клеток, которые управляют инициацией, ростом, рассеиванием и рецидивами первичных и метастатических опухолей (Karsten and Goletz, SpringerPlus, 2013, 2, 301), и могут находиться в разных пропорциях от общей популяции в зависимости от типа опухоли. CSC отличаются от окончательно дифференцированных клеток своей способностью к самообновлению и способностью производить не-CSC, дифференцированное потомство (Gupta et al., Nature medicine, 2009, 15, 1010-1012). Эти свойства аналогичны свойствам нормальных стволовых клеток. Такие отличия между нормальными стволовыми клетками и CSC имеют важное значение для терапии.

Идентифицировано все возрастающее число биомаркеров клеточной поверхности, которые, согласно заявлениям, позволяют отличать CSC от их не-CSC аналогов (Medema et al., Nature cell biology, 2013, 15, 338-344; Zoller, Cancer, 2011, 11, 254-267). Они могут включать, но без ограничения, CD44, CD133, CD117 и изоформу 1 альдегиддегидрогеназы (ALDH1). При том, что некоторые из них определены в исследованиях мышиных опухолей и человеческих линий клеток, другие были подтверждены с использованием образцов первичных человеческих опухолей. Один из них, проходящий через мембрану гликопротеин CD44, или гиалуронановый рецептор, который является хорошо известным компонентом опухолей разных видов, также был недавно принят в качестве надежного маркера CSC при формах рака человека и, действительно, встречается наиболее часто (Lobo et al., 2007, 23, 675-699).

CD44 существует в нескольких вариантных изоформах, возникающих вследствие событий альтернативного сплайсинга, происходящих среди 20 экзонов и 19 интронов полноразмерного гена CD44 (Williams et al., Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338). Растущее количество данных свидетельствует в пользу роли CD44 и его вариантов в формировании фенотипа CSC с характерным метастатическим потенциалом и резистентностью к лекарственным средствам (Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573), частично вследствие модуляции внутриклеточных путей передачи сигналов (Williams et al., Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338). Кроме того, известно, что для пациентов с трижды негативным раком молочной железы, а также с некоторыми другими видами рака, у которых обнаруживают большое количество клеток с CD44, характерен неблагоприятный прогноз и высокий

уровень смертности (Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573). Эти наблюдения свидетельствуют в пользу того факта, что таргетирование CD44 является способом лечения рака за счет ингибирования или элиминации CSC, в дополнение к зрелым раковым клеткам. Действительно, было опробовано множество экспериментальных подходов к таргетированию CD44 с разной степенью успеха. Был использован широкий диапазон технологий, включающих использование конъюгированных и не конъюгированных антител, систем наноносителей лекарственного средства и гиалуронан-конъюгированные лекарственные средства (Negi et al., Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573). Однако в нескольких случаях в in vivo исследованиях наблюдались токсические эффекты; эти неблагоприятные побочные эффекты могли быть объяснены широким распространением CD44 и его вариантов на мембранах большинства клеток позвоночных (Naor et al., Seminars in cancer biology, 2008, 18, 260-267), помимо его присутствия на поверхности являющихся мишенью CSC и зрелых опухолевых клеток. Таргетирование белка CD44, который также является компонентом нормальных стволовых клеток человека (Williams et al., Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338), также может вредить функции нормальных стволовых клеток (Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). Хотя результаты большого количества исследований указывают на желательность таргетирования белка CD44 на CSC, а также на зрелых опухолевых клетках, присущей данному подходу проблемой в настоящее время остается сложность разработки ингибиторов, которые не будут затрагивать нормальные ткани, а также нормальные стволовые клетки.

Другим хорошо известным опухолевым антигеном, связанным с биологией CSC, является эпителиальный муцин MUC1, связанный с мембраной гликопротеин, который дифференциально экспрессируется на высоком уровне на большинстве аденокарцином, но на низком уровне, или совсем не экспрессируется, на нормальных эпителиальных клетках. MUC1 недавно был идентифицирован как биомаркер CSC на различных новообразованиях, включая рак молочной железы (Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426) и поджелудочной железы, где его экспрессия коррелирует с высоким уровнем метастазирования и неблагоприятным прогнозом. Показано, что в качестве компонента CSC MUC1 принимает участие в клеточной адгезии, пролиферации, выживании и сигнализации (Engelmann et al., Cancer research, 2008, 68, 2419-2426) и также может совместно экспрессироваться с CD44 (Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). Иммунотерапевтические подходы к таргетированию MUC1 при раке включают использование вакцины, а также другие подходы, однако в основном в контексте терапии против зрелых раковых клеток (Julien et al., Biomolecules, 2012, 2, 435-466; Acres et al., Expert review of vaccines, 2005, 4, 493-502).

Существует гипотеза, что раковые стволовые клетки образуются путем эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) (Gupta et al., Nature medicine, 2009, 15, 1010-1012) и/или наоборот, путем мезенхимально-эпителиального перехода (MET), происходящего в зоне метастаза (Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121) (также используют термин "пластичность CSC", когда не-CSC дают начало CSC). Это открытие дополнительно подчеркивает необходимость в элиминации как CSC, так и не-CSC, в раковой ткани или популяции опухолевых клеток.

Недавние исследования с обогащенными популяциями CSC показали, что эти клетки, в отличие от большей части опухоли, являются относительно неактивными и преимущественно резистентными к многим видам современной терапии, включая химиотерапию и облучение (Leth-Larsen et al., Molecular medicine, 2012, 18, 1109-1121). Таким образом, современные терапевтические стратегии направлены на не-CSC компоненты опухоли, оставляя CSC почти незатронутыми, так что они могут вновь пробуждаться после соответствующих стимулов, вызывая рецидивы первичных опухолей в исходном участке или распространение в отдаленные участки, колонизацию и метастазирование, основную причину смертности от рака.

Современное понимание свойств раковых стволовых клеток четко указывает на необходимость не только направленно воздействовать на основную массу клеток опухолей, как это происходит в настоящее время, но также и на компартмент CSC с целью достижения потенциально полного излечения.

Как описано выше, стратегии, разработанные на основе ассоциированных с опухолью (включая CSC) биомаркеров, сталкиваются с проблемами, заключающимися в том, что большинство биомаркеров рака также присутствуют на нормальных клетках, включая нормальные стволовые клетки. Терапия, направленная на белковый биомаркер для элиминации CSC, также может быть направлена на нормальные стволовые клетки, вызывая элиминацию нормальных клеток.

Опухоль-специфические гликаны в CSC.

Аберрантные формы гликозилирования, включая появление антигена Thomsen-nouveau (Tn) (GalNAc-O-Ser/Thr), были описаны при разных формах рака у человека, что позволяет идентифицировать гликаны как совершенно новый класс опухоль-ассоциированных углеводных антигенов, подходящих для специфического таргетирования опухолей (Rabu et al., Future oncology, 2012, 8, 943-960). Образование сиалильного производного Tn (STn) опосредовано сиалил-трансферазой ST6GalNAc I, которая добавляет сиаловую кислоту, связанную α2,6-связью, к антигену Tn. Сиалирование Tn предотвращает дальнейшее добавление сахаров, таким образом, сокращая дальнейшее удлинение гликана (Schultz et al., Cancer metastasis reviews, 2012, 31, 501-518).

Хотя присутствие STn в нормальных тканях взрослых людей наблюдается редко, STn присутствует

в клетках различных видов рака человека, включая рак яичника, мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки и легкого, в числе прочих (Ferreira et al., Molecular oncology, 2013, 7, 719-731; Kinney et al., Cancer, 1997, 80, 2240-2249). Кроме того, присутствие STn в опухолях связано с метастазированием заболевания, неблагоприятным прогнозом и пониженной общей выживаемостью (Ferreira et al., Molecular oncology, 2013, 7, 719-731; Kinney et al., Cancer, 1997, 80, 2240-2249); таким образом, STn считают очень привлекательной мишенью для обнаружения и терапии рака. Существуют две разные формы сиаловой кислоты - Neu5Ac и Neu5Gc -расположенные на конце STn. Neu5Ac-сиалированная форма является преобладающей у человека, поскольку в организме человека не может синтезироваться Neu5Gc вследствие неактивного гена CMP-Neu5Ac гидроксилазы (CMAH). Однако потребление богатой Neu5Gc пищи приводит к включению инородной Neu5Gc в клетки человека, в частности, в клетки карцином. В предыдущих исследованиях было показано, что солидные опухоли поглощают и экспрессируют Neu5Gc-форму сиаловой кислоты (Inoue et al., Glycobiology, 2010, 20, 752-762; Malykh et al., Biochimie, 2001, 83, 623-634; Padler-Karavani et al., Cancer research, 2011, 71, 3352-3363). Мат, связывающие обе гликоизоформы STn [Neu5Ac-STn (AcSTn) и Neu5Gc-STn (GcSTn)], которые потенциально являются мишенями при раке, были разработаны в качестве пан-STn антител.

Накопление STn связано с определенными соматическими мутациями, регулярно наблюдаемыми в солидных опухолях, и с инактивацией гена, кодирующего молекулярный шаперон, специфический для кор 1 бета3-галактозилтрансферазы (COSMC), который необходим для образования активной T-синтазы (Ju et al., Nature,2005, 437, 125). T-синтаза конкурирует с ST6GalNAc I за субстрат GalNAc и, таким образом, ее инактивация за счет мутации приводит к увеличению синтеза STn. Кроме того, накопление STn может являться следствием повышенной экспрессии ST6GalNAc I, что наблюдается довольно часто (Brockhausen et al., Biological chemistry, 2001, 382, 219-232; Ikehara et al., Glycobiology, 1999, 9, 1213-1224). De novo экспрессия STn может модулировать клетки карциномы, изменять злокачественный фенотип и приводить к более агрессивному поведению клеток (Pinho et al., Cancer letters, 2007, 249, 157-170). Следовательно, STn не только является интересным биомаркером рака и терапевтической мишенью, но также создание препятствий функционированию STn потенциально способно обеспечивать значительные функциональные антиметастатические терапевтические преимущества.

Хотя хорошо известно, что гликозилирование клеточных гликопротеинов изменено при раке, аберрантное гликозилирование, судя по всему, является селективным в отношении как рассматриваемых гликопротеинов, так и гликанов. Фактически, в человеческих опухолевых CSC лишь CD44 и MUC1 являются основными носителями антигена STn (Cazet et al., Breast cancer research: BCR, 2010, 12, 204; Julien et al., Glycobiology, 2006, 16, 54-64), что сразу предполагает селективный подход к таргетированию не только зрелых опухолевых клеток, но также и CSC. При том, что MUC1 является нормальным поверхностным компонентом некоторых эпителиальных клеток, где он выполняет барьерную функцию, опухоль-ассоциированный MUC1 характеризуется гипогликозилированием и повышенным сиалированием на CSC таким же образом, как это наблюдается в зрелых раковых клетках, при этом STn, очевидно, является специфическим маркером как CSC, так и зрелых опухолевых клеток (Curry et al., Journal of surgical oncology, 2013, 107, 713-722). Аберрантный олигосахаридный профиль MUC1 приводит к экспрессии неомаркеров, таких как сиалил-Le^a (используемый в тесте для CA19-9), сиалил-Le^x и сиалил-Tn (TAG-72), а также скрытых эпитопов, таких как Tn, в раковых клетках (например, CSC). Кроме того, из-за недостаточного гликозилирования пептидное ядро муцина становится экспонированным, так что эпитопы в ядре (не доступные в ядре MUC1 в нормальных тканях) могут служить в качестве потенциальных антигенов.

Клинические подходы к таргетированию STn до настоящего времени заключались исключительно в получении вакцин против STn. Наиболее перспективным кандидатом для клинического применения является тератоп, терапевтическая вакцина, состоящая из STn, связанного с гемоцианином лимфы улитки. В in vivo исследованиях на мышах иммунизация тератопом вызывала сильный ответ в виде выработки антител, который, как было показано, опосредовал задержку роста инъецированных клеток карциномы молочной железы, экспрессирующих STn (Julien et al., British journal of cancer, 2009, 100, 1746-1751). Однако тератоп не смог обеспечить основной показатель эффективности лечения в фазе III клинического испытания с метастатическим раком молочной железы. Основная гипотеза, объясняющая, почему испытания тератопа не увенчались успехом в отношении основного показателя эффективности лечения, заключается в том, что популяцию пациентов не оценивали в отношении экспрессии STn перед включением в исследование. Поскольку наблюдается сильная неоднородность в экспрессии STn при раке молочной железы среди пациентов, с диапазоном 25%-80% в зависимости от исследования и метода определения, неспособность установить корреляцию экспрессии STn с ответом могла замаскировать любую пользу, приносимую тератопом. Важно отметить, что в подгруппе пациентов, получающих гормональную терапию, наблюдалось значительное 7,5-месячное увеличение среднего срока общей выживаемости при лечении тератопом в сравнении с применением одной только гормональной терапии (Ibrahim et al., Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004, 22, 2547; и Miles et al., The oncologist, 2011, 16, 1092-1100), Это подтверждает терапевтический потенциал таргетирования STn в определенных популяциях пациентов. Кроме того, поскольку иммунный ответ часто значительно варьируется среди вакцинированных пациентов, подходы с использованием вакцины не позволяют кон-

тролировать или модулировать титр антител, следствием чего является широкий разброс экспозиции терапевтических антител у пациентов. Тем не менее, тератоп отличался хорошей переносимостью с минимальной токсичностью, что свидетельствует о безопасности таргетирования STn при терапии рака.

Растущая степень понимания молекулярных основ экспрессии STn в раковых клетках убедительно свидетельствует в пользу того, что клетки, экспрессирующие STn на каком-либо белке клеточной поверхности, также будут экспрессировать STn на многих (если не на всех) других О-гликозилированных белках клеточной поверхности, делая его отличной широко распространенной связанной с раком терапевтической мишенью. Таким образом, STn-положительные популяции раковых клеток могут быть обогащены по CSC. Кроме того, последние данные указывают на то, что исчезновение экспрессии STn делает рак менее агрессивным со значительно меньшим метастазированием (Gill et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013, 110, E3152-3161).

Анти-STn антитела, направленные на CSC, в качестве противораковой терапии.

В данной области описаны несколько анти-STn антител, однако некоторые из них проявляют низкую специфичность в отношении антигена STn или сталированных изоформ. Например, показано, что коммерческое анти-STn антитело B72.3 связывается не только с STn, но также и с антигеном Tn (Bapat, S. A. (2010) Human ovarian cancer stem cells. Reproduction 140, 33-41). Доступность моноклональных антител (мАт), направленных на STn, сконструированных для вызывания антителозависимосй клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), либо конъюгированных с цитотоксической полезной нагрузкой [например, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)], обеспечивает возможность получения значительной терапевтической пользы для онкологических пациентов с STn-экспрессирующими опухолями. Кроме того, такие антитела также позволили бы разработать сопроводительную диагностику для предварительного отбора пациентов, которые с наибольшей вероятностью будут отвечать на терапию.

STn часто присутствует на одном или более из поверхностных антигенов CSC, и они совместно обеспечивают свойства стволовости и резистентности к химиотерапии, характерные для CSC. Таким образом, анти-STn антитела являются средством таргетирования раковых клеток, направленным на CSC, с потенциалом не только непосредственно уничтожать CSC за счет прямого взаимодействия и/или ADCC, но также с уникальной возможностью связывать широкую панель белков клеточной поверхности и препятствовать их функциям, важным для жизнеспособности, самообновления и репликации CSC.

Как описано в настоящем документе, логическое обоснование и преимущества таргетирования STn на CSC могут включать следующее: (1) многие опухоль-специфические укороченные гликопротеины несут STn при раке; (2) STn является уникальной гликановой мишенью, экспрессируемой преимущественно на CD44, MUC1 и потенциально других важных маркерах клеточной поверхности, как на CSC, так и на зрелых опухолевых клетках, независимо от пролиферативного статуса, что позволяет таргетировать оба из этих опухолевых компонентов с помощью одного лекарственного средства; (3) STn также является компонентом CA-125, биомаркера рака яичника и других видов рака; (4) STn является компонентом маркера CD44 CSC рака яичника. Таким образом, применение мышиных анти-пан-STn мАт, направленных на эпитоп, охватывающий как Neu5Ac, так и Neu5Gc, формы сиаловой кислоты, связанные с Tn, будет приводить к связыванию и уничтожению или нарушению функции CSC и, в силу наличия общего эпитопа, не-CSC опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-пан-STn мАт для специфической элиминации человеческих CSC, а также зрелых опухолевых клеток. В одном аспекте настоящего изобретения анти-STn антитело будет направлено на сам валидированный STn-гликан - не на конкретный гликопептид или белок-носитель, что открывает широкую возможность для связывания CD44, MUC1 или других STn-гликозилированных маркеров как на CSC, так и на не-CSC популяциях опухолевых клеток.

Учитывая превосходную специфичность таргетирования опухоль-ассоциированных STn, настоящее изобретение позволяет избегать повреждения нормальных тканей, включая нормальные стволовые клетки взрослых, что обеспечивает прекрасное терапевтическое окно.

В настоящем документе предложен уникальный иммунотерапевтический раствор, предназначенный для уничтожения новообразований у человека за счет элиминации как раковых стволовых клеток (CSC), так и зрелых раковых клеток, содержащихся в раковых тканях и/или популяциях опухолевых клеток. Элиминация специфически происходит за счет таргетирования структур сиалированного антигена Tn (STn) на клеточной поверхности, которые уникальным образом присутствуют в раковых тканях и/или популяциях раковых клеток, включая такие структуры, связанные с раковыми стволовыми клетками.

Колоректальный рак.

Колоректальный рак (CRC) занимает 4-е место по частоте случаев заболевания и в настоящее время является третьей по счету причиной смерти от рака в США. В настоящее время у 20% пациентов диагностировано метастатическое заболевание и примерно у 50% пациентов с CRC в конечном итоге разовьются метастазы. Для людей, у которых диагностировано метастатическое заболевание, показатель 5-летней выживаемости составляет 13,1%. У пациентов с метастатическим раком толстой кишки (mCRC) существует прецедент использования терапевтических антител (например, моноклональных антител), таких как

моноклональные антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, цетуксимаб и панитумумаб) и моноклональные антитела против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, бевацизумаб и рамуцирумаб).

По сообщениям, экспрессия STn имеет место в 83,4% образцов от пациентов с CRC и коррелирует с повышенной злокачественностью и неблагоприятным прогнозом. Антиген STn присутствует в нормальных клетках толстой кишки у взрослых, однако поддается обнаружению лишь после удаления O-ацетильных групп методом сапонификации, процесса, который естественным образом не имеет место in vivo (Juben et al., Biomolecules, 2012, 2, 435-466). Таким образом, STn может быть использован в качестве терапевтической мишени при лечении CRC.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения CRC и/или mCRC. В некоторых случаях такие взаимодействующие с гликанами антитела представляют собой анти-STn антитела, включая, но без ограничения, любые из тех, которые описаны в настоящем документе. Взаимодействующие с гликанами антитела, используемые для лечения CRC и/или mCRC, могут быть конъюгированы с цитотоксическим средством (например, MMAE и MMAF). Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы в сочетании с другими методами терапии, такими как терапия химиотерапевтическими средствами (например, фторпиримидином, оксалиплатином и/или иринотеканом), и/или с терапевтическим антителом (например, цетуксимабом, панитумумабом, бевацизумабом и/или рамуцирумабом). В некоторых случаях взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы для лечения форм колоректального рака, которые устойчивы к одному или более другим терапевтическим методам лечения.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела, используемые для лечения колоректального рака, можно вводить в дозе от примерно 0,5 мг/кг до примерно 20 мг/кг. Например, антитела можно вводить в дозах от примерно 0,5 мг/кг до примерно 2 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 2,5 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 5 мг/кг до примерно 20 мг/кг.

Рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают способы лечения рака яичника. Рак яичника является основным видом рака женской половой системы, от которого страдают женщины в США. По оценкам, в 2013 г. 22240 женщин будут диагностированы и 14030 умрут от этого заболевания, что делает его пятой по счету причиной смерти женщин от рака и наиболее летальным гинекологическим злокачественным заболеванием в США (Siegel et al., Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians 63, 11-30). Такая высокая смертность может быть объяснена бессимптомным началом заболевания, первоначальным диагностированием на поздней стадии, агрессивностью этого вида рака и, в целом, отсутствием генетических изменений, способных служить мишенью для терапии. Современным стандартом лечения является уменьшение массы опухоли, с последующей химиотерапией таксанами и соединениями платины. При том, что данное начальное лечение приводит к тому, что у ~70% пациентов наблюдается первоначальный полный клинический ответ, у большинства из этих пациентов, к сожалению, будет происходить рецидив в виде устойчивого к химиотерапии заболевания (Foster et al., Cancer letters, 2013, 338, 147-157; и McCann et al., PloS one, 2011,6, e28077). Частично, рецидив заболевания объясним, как и в случае других видов рака, присутствием CSC в общей популяции опухолевых клеток. Действительно, CSC рака яичника были идентифицированы и показана их устойчивость к химио- и лучевой терапии (Burgos-Ojeda et al., Cancer letters, 2012, 322, 1-7). Таким образом, опять-таки, как и при других формах рака, элиминация CSC наряду со зрелыми клетками в раковых тканях и/или популяции опухолевых клеток является лучшим шансом для контролирования рецидива заболевания и, в идеале, излечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения рака яичника с использованием анти-STn антител. Способы включают введение анти-STn антител субъектам, имеющим рак яичника или предположительно имеющим рак яичника. В некоторых вариантах осуществления для лечения рака яичника могут быть таргетированы CSC рака яичника, включая, но без ограничения, те, которые присутствуют в раковых тканях и/или популяциях опухолевых клеток. Хотя CD133 наиболее полно изучен из предполагаемых маркеров CSC рака яичника, признано, что CD44, известный носитель STn, описанный выше, связан с раком яичника и включен в набор маркеров, позволяющих идентифицировать CSC рака яичника (Zhang et al., Cancer research, 2008, 68, 4311-4320; Foster et al., Cancer letters, 2013, 338, 147-157; и Zoller, Cancer, 2011, 11, 254-267). Кроме того, STn экспрессируется на хорошо известном биомаркере рака яичника CA-125 (MUC16), а также на MUC1, причем уровни этих STn-ассоциированных муцинов в сыворотке недавно были использованы в качестве дополнительных признаков, отличающих злокачественное заболевание яичников от доброкачественного. Повышенные сывороточные уровни STn имеют место у ~50% пациентов с раком яичника и коррелируют с низким показателем 5-летней выживаемостие (Kobayashi et al., Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1991, 9, 983-987; Kobayashi et al., Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1992, 10, 95-101; и Chen et al., Journal of proteome research, 2013, 12, 1408-1418). И наконец, Vathipadiekal с соавторами в исследовании дифференциальной экспрессии

генов в CSC первичной карциномы яичника человека и не-CSC популяциях клеток установили, что экспрессия STn-создающей сиалил-трансферазы ST6GalNAc I не отличается у клеток этих двух групп.

В некоторых вариантах осуществления введение анти-STn антител субъекту, имеющему рак яичника или предположительно имеющему рак яичника, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, приводит к уменьшению количества STn-положительных клеток у таких субъектов и/или уменьшению количества STn-положительных клеток в одной или более тканях рака яичника или популяциях опухолевых клеток, имеющихся у таких субъектов. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества может включать уменьшение STn-положительных клеток на величину от примерно 10% до примерно более 90% (например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам для таргетирования CSC с целью предотвращения, контролирования или исцеления рака, связанного с CSC. Такие антитела могут включать анти-STn антитела, включая, но без ограничения, любые из антител, описанных в настоящем документе. Кроме того, анти-STn антитела могут включать антитело 3F1 (SBH Sciences, Natick, MA) или его производные, в том числе рекомбинантные антитела с областями CDR из 3F1 и/или гуманизированные производные.

В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела по изобретению могут быть использованы для таргетирования стволовых клеток рака яичника, которые устойчивы к другим методам лечения. Такие методы лечения могут включать химиотерапию. Используемый в настоящем документе термин "химиотерапия" означает метод лечения с использованием химических веществ. Такие химические вещества в настоящем документе называют "химиотерапевтическими средствами". При лечении рака химиотерапевтические средства являются средствами, которые замедляют или останавливают пролиферацию раковых клеток. Используемые в настоящем документе термины "устойчивые к химиотерапии" или "химиорезистентные" относятся к клеткам, которые не поддаются, или имеют ограниченную восприимчивость к, химиотерапевтическим методам лечения. Такие химиотерапевтические методы лечения могут включать лечение олапарибом, карбоплатином и/или паклитакселом. Способы таргетирования устойчивых к химиотерапии стволовых клеток рака яичника могут иметь преимущества от изменения экспрессии STn в стволовых клетках рака яичника, происходящего после химиотерапевтического лечения. В некоторых случаях устойчивые к химиотерапии стволовые клетки рака яичника экспрессируют STn до и/или после химиотерапевтического лечения. В некоторых случаях клеточная поверхностная экспрессия STn в устойчивых к химиотерапии стволовых клеток рака яичника может быть повышена после химиотерапевтического лечения. После химиотерапевтического лечения олапарибом, карбоплатином и/или паклитакселом некоторые стволовые клетки рака яичника могут пролиферировать, результатом чего является популяция STn-экспрессирующих раковых клеток, устойчивых к олапарибу, карбоплатину и/или паклитакселу. В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела могут быть использованы для таргетирования устойчивых к олапарибу, карбоплатину и/или паклитакселу клеток. В некоторых случаях эти устойчивые клетки представляют собой раковые стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления лечение субъекта анти-STn антителами можно производить после лечения субъекта олапарибом, карбоплатином и/или паклитакселом.

Соответственно, способы по изобретению могут включать способы лечения рака путем введения анти-STn антитела субъекту с раком яичника. Анти-STn антитела могут быть введены до, в процессе или после лечения химиотерапевтическими средствами (например, олапарибом, карбоплатином и/или паклитакселом). Анти-STn антитела могут быть направлены на экспрессирующие STn стволовые клетки рака яичника, присутствующие до, в процессе или после введения химиотерапевтических средств (например, олапариба, карбоплатина и/или паклитаксела). Анти-STn антитела могут содержать вариабельный домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из одной или более из SEQ ID NO: 1-12. В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитела представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство. Такие конъюгаты антитело-лекарственное средство могут содержать цитотоксическое средство (например, монометилауристатин E). В раковых тканях у субъектов, получавших лечение анти-STn антителами, может происходить уменьшение количества STn-положительных клеток. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества клеток может включать уменьшение количества STn-положительных клеток на величину от примерно 10% до примерно более 90% (например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%). Антитела могут быть направлены на CSC.

В некоторых вариантах осуществления субъекты, имеющие одну или более устойчивых к химиотерапии стволовых клеток рака яичника, могут получать лечение анти-STn антителами по изобретению после лечения одним или более химиотерапевтическим средствами (например, олапарибом, карбоплатином и/или паклитакселом). Лечение анти-STn антителами после лечения химиотерапевтическим средствами может предотвращать возрождение опухоли. Возрождение опухоли представляет собой развитие одной или более опухолевых клеток или опухолей после сокращения количества одной или более опухо-

левых клеток или опухолей (например, вследствие предшествующей или текущей терапии).

В некоторых способах лечения рака яичника анти-STn антитела по настоящему изобретению вводят в сочетании с модуляторами клеточной сигнализации, связанной со стволовостью и/или дифференциацией. Такие модуляторы могут включать модуляторы передачи сигналов Notch и/или Hedgehog.

Способы по настоящему изобретению включают способы лечения рака яичника путем получения образца от субъекта, имеющего или предположительно имеющего рак яичника, и обнаружения STn в образце, при этом в случае обнаружения STn субъекту вводят анти-STn антитело. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой клеточный образец (например, образец раковой ткани или образец опухоли). Клеточные образцы могут включать мутантные по BRCA1 клетки или не мутантные по BRCA1 клетки.

Обнаружение STn в образцах субъекта можно проводить любыми методами, известными в данной области для обнаружения молекулярных соединений. Такие методы могут включать использование одного или более обнаруживающих STn антител. Обнаруживающие STn антитела могут включать любое антитело, способное связывать STn. Некоторые методы обнаружения STn могут включать, но без ограничения, масс-спектрометрию, вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, иммунопреципитацию и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). В некоторых вариантах осуществления обнаруживают связанный с белком STn.

В некоторых вариантах осуществления обнаруженный STn может быть ассоциирован с белками, связанными со стволовыми клетками рака яичника. Используемый в настоящем документе термин "белок, связанный со стволовыми клетками рака яичника" относится к любому белку, который связан с одной или более стволовыми клетками рака яичника. Такие белки могут включать, но без ограничения, белки клеточной поверхности, маркеры, внутриклеточные белки, факторы транскрипции и белки, вовлеченные в клеточную сигнализацию, которая влияет на выживание, рост, репликацию и/или поддержание стволовых клеток рака яичника. Белки, связанные со стволовыми клетками рака яичника, могут включать, но без ограничения, Notch, Hedgehog, MUC1, CD44, CD117, CD133 и интегрин.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рака яичника, включающим проведение комбинированного лечения олапарибом и анти-STn антителом. Такие способы могут включать лечение субъекта олапарибом, с последующим лечением субъекта анти-STn антителом. В некоторых случаях способы лечения рака яичника включают идентификацию субъекта, как не отвечающего полностью на лечение олапарибом, и введение субъекту анти-STn антитела.

Способы по настоящему изобретению могут включать способы консолидированного противоракового лечения. Консолидированное лечение представляет собой лечение, которое проводят после химиотерапии для достижения устойчивой ремиссии. Как правило, консолидированное лечение включает использование более низких доз химиотерапевтических средств для предотвращения возрождения опухоли с сохранением низких уровней токсичности. Способы по настоящему изобретению для консолидированного лечения рака могут включать уменьшение количества раковых клеток у субъекта путем введения по меньшей мере одного химиотерапевтического средства и поддержание уменьшенного количества (или дальнейшее уменьшение количества) раковых клеток у субъекта, или в одной или более раковых тканях субъекта, путем введения анти-STn антитела. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника. Химиотерапевтическое средство может представлять собой олапариб, карбоплатин и/или паклитаксел. В некоторых вариантах осуществления анти-STn антитело представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). ADC может содержать монометилауристатин E (MMAE).

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают полное уничтожение опухолевых клеток яичника для вызывания устойчивой начальной ремиссии путем введения одного или более анти-STn антител. Другие способы включают ингибирование возрождения опухоли яичника в течение некоторого периода времени путем введения одного или более анти-STn антител, в некоторых случаях без вызывания избыточной токсичности. Такие периоды времени могут составлять от примерно 1 месяца до примерно 18 месяцев, от примерно 1 года до примерно 5 лет, от примерно 2 лет до примерно 10 лет, или более 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рака, включающим получение одной или более клеток опухоли яичника от субъекта, образование ксенотрансплантированной опухоли у хозяина (например, мыши, крысы, кролика, свиньи или примата) из одной или более клеток опухоли яичника, введение одного или более анти-STn антител хозяину и выбор по меньшей мере одного из этих одного или более протестированных анти-STn антител для использования в качестве терапевтического антитела для лечения субъекта. Анти-STn антитело может быть выбрано на основании способности этого антитела уменьшать объем опухоли у хозяина.

Иммунологические мишени.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут представлять собой иммуномодулирующие антитела. Используемый в настоящем документе термин "иммуномодулирующее антитело" означает антитело, которое повышает или подавляет одну или более иммунных функций или путей.

Известно, что многие бактериальные гликаны содержат сиаловую кислоту. В некоторых случаях

такие гликаны позволяют бактериям избегать действия врожденной иммунной системы хозяев, включая, но без ограничения, людей. В одном примере бактериальные гликаны ингибируют альтернативный путь активации комплемента за счет узнавания фактора H. В другом примере бактериальные гликаны маскируют лежащие в глубине остатки, которые могут быть антигенными. Некоторые бактериальные гликаны участвуют в событиях клеточной сигнализации путем активации связывания ингибирующей сиаловой кислоты с Ig-подобными лектинами (Siglec), что приводит к уменьшению иммунного ответа на элементы, содержащие некоторые сталированные фрагменты (Chen, X. et al., Advances in the biology and chemistry of sialic acids. ACS Chem Biol. 2010 Feb 19; 5(2): 163-76). В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения иммунных осложнений, связанных с бактериальными гликанами.

Вследствие инородного характера Neu5Gc, как описано в настоящем документе, некоторые Neu5Gc-гликаны являются иммуногенными, что приводит к связанному с иммунитетом разрушению клеток и других элементов, на которых эти гликаны могут быть экспрессированы. Такое аутоиммунное разрушение может быть патогенным. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы для лечения пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний, связанных с Neu5Gc-гликанами.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие антитела по изобретению могут быть использованы для стимуляции или подавления опосредованного Т-клетками иммунитета. Такие антитела могут взаимодействовать с одним или более гликанами, присутствующими на Т-клетках, связанных с Т-клетками белках и/или клетках одного или более других типов, которые взаимодействуют с Т-клетками. Иммуномодулирующие антитела, которые повышают опосредованный Т-клетками иммунитет, могут быть использованы для стимуляции опосредованного Т-клетками таргетирования раковых клеток.

В некоторых опухолях инфильтрация опухоль-ассоциированными макрофагами (TAM) может приводить к иммуносупрессии, стимулируя выживаемость и рост опухолевых клеток. Считается, что это происходит вследствие иммуносупрессивной клеточной сигнализации, которая происходит путем взаимодействий между миелоидными лектиновыми рецепторами С-типа (CLR), присутствующими на TAM, и опухоль-ассоциированными муцинами (Allavena, P. et al., Clin Dev Immunol. 2010; 2010:547179). В некоторых вариантах осуществления связывание иммуномодулирующих антител по изобретению с одним или более опухоль-ассоциированными муцинами или TACA предотвращает иммуносупрессивную клеточную сигнализацию в TAM.

Применение в ветеринарии.

Предусмотрено, что взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению найдут применение в области ветеринарии, включая содержание и лечение не являющихся людьми позвоночных животных. Используемый в настоящем документе термин "не являющееся человеком позвоночное животное" охватывает всех позвоночных, за исключением Homo sapiens, в том числе диких и одомашненных животных, таких как животные-компаньоны и домашний скот. Не являющиеся людьми позвоночные животные включают млекопитающих, таких как альпака, бантенг, бизон, верблюд, кошка, крупный рогатый скот, олень, собака, осел, гайал, коза, морская свинка, лошадь, лама, мул, свинья, кролик, северный олень, овца, буйвол и як. Домашний скот включает домашних животных, выращенных на сельскохозяйственных фермах для получения таких материалов, как продукты питания, тягловой силы и производных продуктов, таких как волокна и химические реагенты. В целом, домашний скот включает всех млекопитающих, птиц и рыб, потенциально имеющих сельскохозяйственное значение. В частности, четвероногие животные для забоя включают волов, телок, коров, телят, быков, крупный рогатый скот, свиней и овец.

Биопроцессинг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены способы получения биологических продуктов в клетках-хозяевах путем создания контакта клеток с одним или более взаимодействующими с гликанами антителами (такими как антитело или слитый белок), способными модулировать экспрессию гена или изменять уровни и/или типы продуцируемых гликанов, при этом такое моделирование или изменение приводит к повышению продуцирования биологических продуктов. Способы биопроцессинга по настоящему изобретению могут быть усовершенствованы за счет использования одного или более взаимодействующих с гликанами антител по настоящему изобретению. Они также могут быть усовершенствованы за счет предоставления, замены или добавления одного или более взаимодействующих с гликанами антител.

Диагностика.

В некоторых вариантах осуществления соединения и композиции по изобретению могут быть использованы в качестве диагностических препаратов. В некоторых случаях антитела по изобретению могут быть использованы для идентификации, мечения или окрашивания клеток, тканей, органов, и так далее, экспрессирующих антигены-мишени. В следующих вариантах осуществления антитела по изобретению могут быть использованы для идентификации STn, присутствующего в срезах тканей (то есть гистологических срезах тканей), включая ткани, содержащие или предположительно содержащие злокачественные клетки. Такие способы использования антител по изобретению в некоторых случаях могут

быть использованы для идентификации злокачественных клеток или опухолей на срезах тканей. Срезы тканей могут быть получены из любой ткани или органа, включая, но без ограничения, молочную железу, толстую кишку, поджелудочную железу, яичник, головной мозг, печень, почку, селезенку, легкое, кожу, желудок, кишечник, пищевод или кость.

В некоторых вариантах осуществления диагностические способы по изобретению могут включать анализ одной или более клеток, или тканей, с использованием иммуногистохимических методов. Такие методы могут включать использование одного или более из любых взаимодействующих с гликанами антител, описанных в настоящем документе. Иммуногистохимические методы по изобретению могут включать окрашивание срезов тканей для определения присутствия и/или уровня одного или более гликозилированных белков или других маркеров. Срезы тканей могут быть получены из опухолей субъектов (например, опухолей пациентов и опухолей животных, таких как модельные опухоли животных). Срезы тканей могут быть получены из зафиксированных в формалине или незафиксированных свежих замороженных тканей. В некоторых случаях срезы тканей получены из зафиксированных в формалине залитых парафином (FFPE) тканей. Взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве первичных антител. Первичные антитела используют для непосредственного контакта со срезами тканей и для связывания с целью таргетирования эпитопов. Первичные антитела могут быть напрямую конъюгированы с детектируемой меткой или могут быть обнаружены за счет использования обнаруживающего средства, такого как вторичное антитело. В некоторых вариантах осуществления первичные антитела или обнаруживающие средства включают фермент, который может быть использован в реакции с субстратом для получения видимого продукта (например, преципитата). Такие ферменты могут включать, но без ограничения, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и каталазу.

Анти-STn антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в иммуногистохимических методах по настоящему изобретению для обнаружения STn-гликозилированных белков в тканях или клетках. В некоторых случаях эти антитела используют для обнаружения и/или определения уровня STn в опухолевых тканях. Такие опухолевые ткани могут включать опухолевые ткани, включенные в микропанели опухолей. Подходящие виды опухолей включают, но без ограничения, опухоли молочной железы, толстой кишки, яичника, поджелудочной железы, кожи, кишечника, легкого, и мозга. Уровни анти-STn антител, используемых в иммуногистохимических методах окрашивания, можно варьировать для увеличения видимого окрашивания или для снижения фоновых уровней окрашивания. В некоторых вариантах осуществления используют концентрации антител от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 50 мкг/мл. Например, могут быть использованы концентрации антител от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 1 мкг/мл, от примерно 0,05 мкг/мл до примерно 5 мкг/мл, от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 3 мкг/мл, от примерно 1 мкг/мл до примерно 10 мкг/мл, от примерно 2 мкг/мл до примерно 20 мкг/мл, от примерно 3 мкг/мл до примерно 25 мкг/мл, от примерно 4 мкг/мл до примерно 30 мкг/мл или от примерно 5 мкг/мл до примерно 50 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления диагностические способы по изобретению включают способы получения профиля STn-связанных гликопротеинов. Используемый в настоящем документе термин "профиль STn-связанных гликопротеинов" означает совокупность информации, указывающей на уровень и/или конкретный вид STn-связанных гликопротеинов в образце или организме субъекта. Способы получения профиля STn-связанных гликопротеинов можно осуществлять в образце, полученном от субъекта. Такие образцы могут представлять собой биологические образцы, включая, но без ограничения, любые из тех, которые описаны в настоящем документе. Биологические образцы могут представлять собой клеточные образцы. В некоторых случаях клеточные образцы могут включать по меньшей мере одну опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления образцы опухолевых клеток могут включать мутантные по BRCA1 или не мутантные по BRCA1 опухолевые клетки.

Гликопротеины, входящие в профили STn-связанных гликопротеинов, могут включать, но без ограничения, маркеры раковых клеток, маркеры стволовых клеток, маркеры раковых стволовых клеток и связанные со стволовыми клетками белки. В некоторых вариантах осуществления гликопротеины, идентифицированные и/или количественно определенные в виде части профиля STn-связанных гликопротеинов, могут включать, но без ограничения, CD44, CD133, CD117, интегрин, Notch и Hedgehog.

Уровни и/или конкретные виды STn-связанных гликопротеинов в профилях STn-связанных гликопротеинов можно определять любыми способами, известными в данной области для идентификации белков и/или количественного определения белковых уровней. В некоторых вариантах осуществления такие способы могут включать, но без ограничения, масс-спектрометрию, анализ на матрице (например, матрице антител или матрице белков), вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, иммунопреципитацию и ELISA. В некоторых случаях STn-связанные гликопротеины могут быть иммунопреципитированы из образца перед проведением анализа. Такую иммунопреципитацию можно проводить с использованием анти-STn антитела. Анти-STn антитела, используемые для иммунопреципитации STn-связанных гликопротеинов, могут включать любые из известных в данной области или описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления STn-гликопротеины иммунопреципитируют из биологических образцов с использованием анти-STn антитела, а затем идентифицируют и/или количественно определя-

ют методом масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах осуществления при лечении рака используют информацию, полученную при определении профилей STn-связанных гликопротеинов. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам лечения рака, включающим получение образца от субъекта, который нуждается в лечении рака, определение профиля STn-связанных гликопротеинов в образце, выбор взаимодействующего с гликанами антитела, которое связывает STn-гликозилированный белок из профиля STn-связанных гликопротеинов, и введение взаимодействующего с гликанами антитела субъекту. Взаимодействующие с гликанами антитела, введенные в соответствии с такими способами, могут содержать одну или более областей CDR или вариабельных доменов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут быть использованы для сопроводительной диагностики. Используемый в настоящем документе термин "сопроводительная диагностика" означает анализ, результаты которого оказывают помощь в диагностировании или лечении субъектов. Сопроводительная диагностика может быть полезной для стратификации степеней тяжести заболевания, нарушения или состояния пациента, помогая регулировать режим и дозы лечения для уменьшения стоимости, сокращения продолжительности клинического испытания, повышения безопасности и/или повышения эффективности. Сопроводительная диагностика может быть использована для прогнозирования развития заболевания, нарушения или состояния и для оказания помощи при назначении превентивной терапии. Некоторые варианты сопроводительной диагностики могут быть использованы для выбора субъектов для одного или более клинических испытаний. В некоторых случаях анализы сопроводительной диагностики могут быть использованы параллельно с конкретным лечением с целью оптимизации лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут быть полезны для сопроводительной диагностики заболеваний, нарушений и/или состояний, связанных с раком. Некоторые варианты сопроводительной диагностики по настоящему изобретению могут быть полезны для прогнозирования и/или определения степени тяжести одной или более форм рака. Некоторые варианты сопроводительной диагностики по настоящему изобретению могут быть использованы для стратификации субъектов по степени риска развития одной или более форм рака. Некоторые варианты сопроводительной диагностики по настоящему изобретению могут быть использованы для облегчения и ускорения разработки лекарственного средства для противораковой терапии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам обнаружения и/или количественного определения STn в образце путем использования захватывающего антитела и обнаруживающего антитела. Используемый в настоящем документе термин "захватывающее антитело" означает антитело, которое связывает аналит таким образом, что он может быть обнаружен. Захватывающие антитела могут быть связаны с поверхностями или другими носителями. Обнаруживающие антитела представляют собой антитела, которые способствуют определению присутствия или отсутствия аналита. В некоторых вариантах осуществления как захватывающее антитело, так и обнаруживающее антитело, связывают STn. В таких вариантах осуществления захватывающее антитело и обнаруживающее антитело могут быть получены от разных биологических видов. Это позволяет использовать вторичные антитела, которые узнают только обнаруживающее антитело, и на которые не влияет присутствие захватывающего антитела. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело может связывать STn, и обнаруживающее антитело может связывать белок или носитель связанного STn. Захватывающие антитела и обнаруживающие антитела, используемые для обнаружения STn в образцах, можно выбирать из коммерчески доступных анти-STn антител, а также из любых анти-STn антител, предложенных в настоящем документе.

Клетки с модифицированной экспрессией STn.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам, имеющим измененные уровни STn. Такие клетки могут быть использованы для различных целей (например, экспериментальных, терапевтических, тестирования антител и так далее). В некоторых случаях способы по настоящему изобретению включают способы повышения экспрессии ST6GalNAc I в одной или более клетках или тканях. Это может приводить к получению одной или более клеток, имеющих повышенную экспрессию клеточного STn (например, экспрессированного на поверхности STn). Экспрессия ST6GalNAc I может быть повышена, например, путем введения одного или более векторов, несущих экспрессионный конструкт ST6GalNAc I. Такие экспрессионные конструкты могут быть сконструированы с естественным промотором ST6GalNAc I или с промотором, предназначенным для повышения экспрессии гена. Промоторы, спроектированные для повышения экспрессии гена, могут включать конститутивно, или чрезмерно, активные промоторные элементы. В некоторых случаях промоторы могут быть спроектированы для индуцируемой экспрессии гена. Такие промоторы могут становиться активными, или иметь повышенную активность, при контакте с факторами, которые активируют индуцируемые промоторные элементы. Экспрессионные конструкты STn могут включать hST6GalNAc I pRc-CMV, описанный в публикации Julien, S. et al., 2001. Glycoconj J, 18: 883-93, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления экспрессионные конструкты могут кодировать другие факторы, вовлеченные в синтез и/или экспрессию

STn. Такие факторы могут включать, но без ограничения, Т-синтазу и специфичный для кор 1 бета3-галактозилтрансферазы молекулярный шаперон (COSMC). В некоторых вариантах осуществления клетки с минимальной экспрессией STn превращают в экспрессирующие STn клетки. Такие клетки могут включать, но без ограничения, клетки SKOV3, мутантные по BRCA1 клетки и не мутантные по BRCA1 клетки.

Также предложены модифицированные клетки, имеющие пониженную экспрессию STn в сравнении с не модифицированными клетками. Соответственно, способы по настоящему изобретению включают способы подавления экспрессии STn. Такие способы могут включать уменьшение экспрессии ST6GalNAc I. В некоторых вариантах осуществления такие способы могут включать введение одной или более молекул нуклеиновой кислоты, которые подавляют экспрессию ST6GalNAc I. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут включать, но без ограничения, ингибирующую РНК (например, РНКи или киРНК-сайленсеры). В некоторых вариантах осуществления может быть уменьшено количество других факторов, вовлеченных в синтез и/или экспрессию STn. Такие факторы могут включать, но без ограничения, Т-синтазу и COSMC. В некоторых вариантах осуществления клетки, естественным образом экспрессирующие STn, превращают в клетки, дефицитные по STn. Такие клетки могут включать, но без ограничения, клетки OVCAR3 и клетки OVCAR4.

III. Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям. Такие фармацевтические композиции могут содержать антитела по настоящему изобретению и/или фрагменты, пептиды или белки, полученные из таких антител. Фармацевтические композиции могут быть охарактеризованы одним или более из: биодоступности, терапевтического окна и/или объема распределения.

Биодоступность.

Взаимодействующие с гликанами антитела при формулировании в композиции со средством доставки/формулирования или носителем, описанным в настоящем документе, могут демонстрировать увеличение биодоступности в сравнении с композицией, не содержащей средство доставки, описанное в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "биодоступность" означает системную доступность конкретного количества взаимодействующих с гликанами антител, введенных млекопитающему. Биодоступность можно оценивать путем измерения площади под кривой (AUC) или максимальной концентрации в плазме или сыворотке (C_{max}) не измененной формы соединения после введения соединения млекопитающему. AUC определяют как площадь под кривой зависимости концентрации соединения в сыворотке или плазме, отложенной по ординате (оси Y), от времени, отложенного по абсциссе (оси X). В целом, AUC для конкретного соединения может быть рассчитана способами, известными специалистам в данной области и описанными в публикации G. S. Banker, Modem Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления AUC рассчитывают с использованием линейного метода трапеций с линейной/линейной интерполяцией. AUC можно выражать в единицах времени, умноженных на концентрацию (то есть единица времени*единица массы/единица объема). Например, AUC может быть выражена в таких единицах, как дни*мкг/мл. Конечную элиминационную фазу каждой кривой зависимости концентрации от времени можно определять с использованием одного или более наблюдаемых значений конечной концентрации. Наклон кривой для конечной элиминационной фазы можно определять с использованием логарифмической регрессии на невзвешенных данных по концентрации.

Величина C_{max} представляет собой максимальную концентрацию соединения, достигаемую в сыворотке или плазме субъекта после введения. Величину C_{max} конкретного соединения можно измерять с использованием способов, известных специалистам в данной области. Используемые в настоящем документе выражения "увеличенная биодоступность" или "улучшение фармакокинетики" означают, что системная доступность взаимодействующего с гликанами антитела, измеренная в виде AUC, C_{max} или C_{min} у млекопитающего, является больше при совместном введении со средством доставки, описанным в настоящем документе, чем в отсутствие такого совместного введения. В некоторых вариантах осуществления биодоступность взаимодействующего с гликанами антитела может быть увеличена на по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или примерно 100%.

В некоторых вариантах осуществления биодоступность анти-STn антител можно определять после введения фармацевтической композиции. Анти-STn антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой

цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой ММАЕ. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом при помощи линкера. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для доставки анти-STn антител субъекту, при этом анти-STn антитела имеют C_{max} от примерно 1 мкг/мл до примерно 5 мкг/мл, от примерно 2 мкг/мл до примерно 10 мкг/мл, от примерно 3 мкг/мл до примерно 15 мкг/мл, от примерно 4 мкг/мл до примерно 20 мкг/мл, от примерно 5 мкг/мл до примерно 50 мкг/мл, от примерно 20 мкг/мл до примерно 100 мкг/мл, от примерно 50 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл, от примерно 75 мкг/мл до примерно 150 мкг/мл или от примерно 100 мкг/мл до примерно 500 мкг/мл. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для доставки анти-STn антител субъекту, при этом анти-STn антитела имеют AUC (от начала введения до последней наблюдаемой поддающейся количественному определению концентрации) от примерно 1 суток*мкг/мл до примерно 5 суток*мкг/мл, от примерно 2 суток*мкг/мл до примерно 10 суток*мкг/мл, от примерно 5 суток*мкг/мл до примерно 50 суток* мкг/мл, от примерно 20 суток* мкг/мл до примерно 200 суток* мкг/мл, от примерно 100 суток*мкг/мл до примерно 500 суток*мкг/мл или от примерно 250 суток*мкг/мл до примерно 1000 суток*мкг/мл.

Терапевтическое окно.

Взаимодействующие с гликанами антитела при формулировании в композиции со средством доставки, описанным в настоящем документе, могут демонстрировать увеличение терапевтического окна введенной композиции взаимодействующего с гликанами антитела в сравнении с терапевтическим окном введенной композиции взаимодействующего с гликанами антитела, не содержащей средство доставки, описанное в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "терапевтическое окно" означает диапазон концентраций в плазме или диапазон уровней терапевтически активного вещества в зоне действия, с высокой вероятностью вызывания терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое окно взаимодействующего с гликанами антитела при совместном введении со средством доставки, описанным в настоящем документе, может увеличиваться на по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или примерно 100%.

В некоторых вариантах осуществления период полувыведения соединения и/или скорость клиренса можно контролировать в качестве показателя терапевтического окна.

Используемый в настоящем документе термин "период полувыведения", или "$t_{1/2}$", означает период времени, необходимый для достижения конкретным процессом или концентрацией соединения половины конечного значения. Термин "конечный элиминационный период полувыведения", или "конечный период полувыведения", означает период времени, необходимый для достижения уменьшения концентрации фактора в плазме вполовину после того, как концентрация фактора достигла псевдоравновесия. Когда на уменьшение концентрации могут влиять один или более факторов, независимых от элиминации (например, скорость абсорбции или скорость распределения), наблюдаемый период полувыведения называют "кажущимся" периодом полувыведения. Используемый в настоящем документе термин "скорость клиренса" означает скорость, с которой конкретное соединение выводится из биологической системы или жидкости. Когда на скорость могут влиять один или более факторов, независимых от клиренса, скорость клиренса называют "кажущейся" скоростью клиренса.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое окно анти-STn антител можно определять после введения фармацевтической композиции. Анти-STn антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой ММАЕ. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом при помощи линкера. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для доставки анти-STn антитела субъекту, при этом анти-STn антитела имеют кажущийся конечный период полувыведения от примерно 1 часа до примерно 10 часов, от примерно 2 часов до примерно 12 часов, от примерно 4 часов до примерно 24 часов, от примерно 20 часов до примерно 30 часов, от примерно 1 дня до примерно 5 дней, от примерно 2 дней до примерно 14 дней, от примерно 4 дней до примерно 21 дня, от примерно 8 дней до примерно 28 дней, или более 28 дней. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для доставки анти-STn антител субъекту, при этом анти-STn антитела имеют кажущуюся скорость клиренса от примерно 1 мл/кг/сутки до примерно 10 мл/кг/сутки, от примерно 5 мл/кг/сутки до примерно 20 мл/кг/сутки, от примерно 15 мл/кг/сутки до примерно 50 мл/кг/сутки, или более 50 мл/кг/сутки.

Объем распределения.

Взаимодействующие с гликанами антитела при формулировании в композиции со средством доставки, описанным в настоящем документе, могут иметь улучшенный объем распределения (V_{dist}), например, уменьшенный или целенаправленный, в сравнении с композицией, не содержащей средство доставки, описанное в настоящем документе. Объем распределения (V_{dist}) соотносит количество лекарственного средства в организме и концентрацию лекарственного средства в крови или плазме. Используемый в настоящем документе термин "объем распределения" означает объем жидкости, который бы потребовался для содержания общего количества лекарственного средства в организме в той же концентрации, что и в крови или плазме: V_{dist} равно количеству лекарственного средства в организме/концентрацию лекарственного средства в крови или плазме. Например, для дозы 10 мг и концентрации в плазме 10 мг/л объем распределения составил бы 1 литр. Объем распределения отражает степень присутствия лекарственного средства во внесосудистой ткани. Больший объем распределения отражает тенденцию соединения к большему связыванию с компонентами ткани, чем с белком плазмы. В клинических условиях V_{dist} можно использовать для определения нагрузочной дозы для достижения равновесной концентрации. V_{ss} означает кажущийся объем распределения в равновесном состоянии. В некоторых вариантах осуществления объем распределения взаимодействующего с гликанами антитела при совместном введении со средством доставки, описанным в настоящем документе, может уменьшаться на по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%.

В некоторых вариантах осуществления объем распределения анти-STn антител в организме субъекта можно определять после введения фармацевтической композиции. Анти-STn антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой ММАЕ. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом при помощи линкера. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для доставки анти-STn антител субъекту, при этом анти-STn антитела имеют кажущуюся V_{ss} от примерно 1 мл/кг до примерно 10 мл/кг, от примерно 5 мл/кг до примерно 50 мл/кг, от примерно 20 мл/кг до примерно 100 мл/кг, от примерно 75 мл/кг до примерно 150 мл/кг, или более 150 мл/кг.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела находятся в композициях и/или комплексах в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Фармацевтические композиции могут, необязательно, содержать одно или более дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активных веществ. Общую информацию по формулированию и/или производству фармацевтических средств можно найти, например, в сборнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления композиции вводят людям, пациентам или субъектам. Для целей настоящего изобретения термин "активный ингредиент", как правило, означает взаимодействующие с гликанами антитела, доставляемые, как описано в настоящем документе.

Хотя описание фармацевтических композиций, приведенное в настоящем документе, в основном посвящено фармацевтическим композициям, которые подходят для введения людям, специалисты в данной области понимают, что такие композиции, как правило, подходят для введения любому другому животному, например, не являющимся людьми животным, например, не являющимся людьми млекопитающим. Модификации фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, с целью приспособления их для введения различным животным, хорошо известны, и квалифицированный ветеринар-фармаколог сможет планировать и/или осуществлять такие модификации с использованием обычного экспериментирования, в случае необходимости. Субъекты, которым предусмотрено введение фармацевтических композиций, включают, но без ограничения, людей и/или других приматов; млекопитающих, включая имеющих коммерческую ценность млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птицы, включая имеющих коммерческую ценность птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индейки.

Препараты фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут быть изготовлены любым способом, известным, или разработанным в будущем, в области фармакологии. Как правило, такие способы изготовления включают этап объединения активного ингредиента с эксципиентом и/или одним или более другими вспомогательными ингредиентами, с последующими, в случае необходимости и/или желательности, разделением, приданием формы и/или упаковкой препарата в желательную одно- или многодозовую форму.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть изготовлена, упакована и/или продана

нефасованной, в виде единичной стандартной дозы и/или в виде множества единичных стандартных доз. Используемый в настоящем документе термин "стандартная доза" означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащее заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, как правило, равно дозе активного ингредиента, которая будет введена субъекту, и/или удобной части такой дозы, например, половине или одной трети такой дозы.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого эксципиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции по изобретению будут варьироваться в зависимости от особенностей, массы тела и/или состояния здоровья субъекта, получающего лечение, и также в зависимости от пути введения композиции. В качестве примера, композиция может содержать от 0,1% до 100%, например, от 0,5 до 50%, 1-30%, 5-80%, или по меньшей мере 80% (по массе) активного ингредиента. В одном варианте осуществления активные ингредиенты представляют собой антитела, направленные против раковых клеток.

Препарат.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть сформулированы с использованием одного или более эксципиентов для: (1) увеличения стабильности; (2) увеличения способности проникать в клетки; (3) обеспечения замедленного или отсроченного высвобождения (например, из препарата взаимодействующего с гликанами антитела); и/или (4) изменения биораспределения (например, направления взаимодействующего с гликанами антитела к конкретным тканям или типам клеток). В дополнение к традиционным эксципиентам, таким как любые, и все, растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, средства, способствующие диспергированию или супендированию, поверхностно-активные вещества, изотонические средства, загустители или эмульгаторы и консерванты, препараты по настоящему изобретению могут содержать, без ограничения, липосомы, жидкие наночастицы, полимеры, липоплексы, наночастицы типа ядро/оболочка, пептиды, белки, клетки, трансфицированные взаимодействующими с гликанами антителами (например, для трансплантации субъекту), а также их сочетания.

Эксципиенты.

Используемый в настоящем документе термин "эксципиент" означает любое вещество, объединенное с соединением и/или композицией по изобретению перед использованием. В некоторых вариантах осуществления эксципиенты являются неактивными и используются в основном в качестве носителя, разбавителя или среды для соединения и/или композиции по настоящему изобретению. Различные эксципиенты для формулирования фармацевтических композиций и методы получения композиций известны в данной области (смотри сборник Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Использование общепринятых эксципиентов предусмотрено в объеме настоящего изобретения, за исключением случаев, когда какой-либо общепринятый эксципиент может быть несовместим с веществом или его производными, например, может производить какой-либо нежелательный биологический эффект или иным образом неблагоприятно взаимодействовать с любым другим компонентом(ами) фармацевтической композиции.

Препараты фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут быть изготовлены любым способом, известным, или разработанным в будущем, в области фармакологии. Как правило, такие способы изготовления включают этап объединения активного ингредиента с эксципиентом и/или одним или более другими вспомогательными ингредиентами.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена, упакована и/или продана нефасованной, в виде единичной стандартной дозы и/или в виде множества единичных стандартных доз.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого эксципиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут варьироваться в зависимости от особенностей, массы тела и/или состояния здоровья субъекта, получающего лечение, и также в зависимости от пути введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент имеет чистоту по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления эксципиент одобрен для использования в медицине и для использования в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления эксципиент одобрен Управлением по контролю качества продовольствия и медикаментов США. В некоторых вариантах осуществления эксципиент имеет категорию "для фармацевтического применения". В некоторых вариантах осуществления эксципиент соответствует стандартам Фармакопеи США (USP), Европейской фармакопеи (EP), Фармакопеи Великобритании и/или Международной фармакопеи.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, используемые в производстве фармацевтических композиций, включают, но без ограничения, инертные разбавители, диспергирующие и/или гранулирующие средства, поверхностно-активные вещества и/или эмульгаторы, дезинтегрирующие средства, связывающие вещества, консерванты, буферные средства, смазывающие средства и/или масла. Такие эксципиенты

могут, необязательно, быть включены в фармацевтические композиции.

Иллюстративные разбавители включают, но без ограничения, карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат кальция, фосфат дикальция, сульфат кальция, гидрофосфат кальция, фосфат натрия, лактозу, сахарозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, сорбит, инозитол, хлорид натрия, сухой крахмал, кукурузный крахмал, порошковый сахар и так далее, и/или их сочетания.

Иллюстративные гранулирующие и/или диспергирующие средства включают, но без ограничения, картофельный крахмал, кукурузный крахмал, тапиоковый крахмал, натриевую соль гликолята крахмала, глины, альгиновую кислоту, гуаровую камедь, мякоть цитрусовых, агар, бентонит, целлюлозу и продукты переработки древесины, природные губки, катионообменные смолы, карбонат кальция, силикаты, карбонат натрия, сшитый поли(винилпирролидон) (кросповидон), натрий-карбоксиметилкрахмал (натриевую соль гликолята крахмала), карбоксиметилцеллюлозу, сшитую натрий-карбоксиметилцеллюлозу (кроскармеллозу), метилцеллюлозу, прежелатинизированный крахмал (крахмал 1500), микрокристаллический крахмал, нерастворимый в воде крахмал, кальций-карбоксиметилцеллюлозу, алюмосиликат магния (Veegum®), лаурилсульфат натрия, четвертичные соединения аммония и так далее, и/или их сочетания.

Иллюстративные поверхностно-активные вещества и/или эмульгаторы включают, но без ограничения, природные эмульгаторы (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, альгинат натрия, трагакант, хондрукс, холестерин, ксантан, пектин, желатин, желток яйца, казеин, ланолин, холестерин, воск и лецитин), коллоидные глины (например, бентонит [силикат алюминия] и Veegum® [алюмосиликат магния]), длинноцепочечные аминокислотные производные, высокомолекулярные спирты (например, стеариловый спирт, цетиловый спирт, олеиловый спирт, триацетинмоностеарат, этиленгликольдистеарат, глицерилмоностеарат и пропиленгликольмоностеарат, поливиниловый спирт), карбомеры (например, карбоксиполиметилен, полиакриловую кислоту, полимер акриловой кислоты и карбоксивиниловый полимер), каррагинан, производные целлюлозы (например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, порошковую целлюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу), сорбитановые сложные эфиры жирных кислот (например, полиоксиэтилен сорбитан монолаурат [TWEEN® 20], полиоксиэтилен сорбитан [TWEEN® 60], полиоксиэтиленсорбитан моноолеат [TWEEN® 80], сорбитан монопальмитат [Span® 40], сорбитан моностеарат [Span® 60], сорбитан тристеарат [Span® 65], глицерил моноолеат, сорбитан моноолеат [Span® 80]), полиоксиэтиленовые сложные эфиры (например, полиоксиэтилен моностеарат [MYRJ® 45], полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло, полиэтоксилированное касторовое масло, полиоксиметиленстеарат и SOLUTOL®), сложные эфиры сахарозы и жирных кислот, сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, CREMOPHOR®), полиоксиэтиленовые эфиры (например, полиоксиэтилен лаурил эфир [BRIJ® 30]), поли(винилпирролидон), диэтиленгликоль монолаурат, триэтаноламин олеат, олеат натрия, олеат калия, этилолеат, олеиновую кислоту, этиллаурат, лаурилсульфат натрия, PLUORINC® F 68, POLOXAMER® 188, бромид цетримония, хлорид цетилпиридиния, хлорид бензалкония, докузат натрия и так далее, и/или их сочетания.

Иллюстративные связывающие вещества включают, но без ограничения, крахмал (например, кукурузный крахмал и крахмальный клейстер); желатин; сахара (например, сахарозу, глюкозу, декстрозу, декстрин, мелассу, лактозу, лактит, маннит); природные и синтетические камеди (например, гуммиарабик, альгинат натрия, экстракт ирландского мха, панваровую камедь, камедь гхатти, клейкое вещество шелухи подорожника блошиного, карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, ацетат целлюлозы, поливинилпирролидон), алюмосиликат магния (Veegum®) и арабогалактан лиственницы); альгинаты; полиэтиленоксид; полиэтиленгликоль; неорганические соли кальция; кремниевую кислоту; полиметакрилаты; воски; воду; спирт и так далее; а также их сочетания.

Иллюстративные консерванты могут включать, но без ограничения, антиоксиданты, хелатирующие агенты, противомикробные консерванты, противогрибковые консерванты, спиртовые консерванты, кислотные консерванты и/или другие консерванты. Иллюстративные антиоксиданты включают, но без ограничения, альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, монотиоглицерин, метабисульфит калия, пропионовую кислоту, пропилгаллат, аскорбат натрия, бисульфит натрия, метабисульфит натрия и/или сульфит натрия. Иллюстративные хелатирующие агенты включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), лимонную кислоту моногидрат, эдетат динатрия, эдетат дикалия, эдетовую кислоту, фумаровую кислоту, яблочную кислоту, фосфорную кислоту, эдетат натрия, виннокаменную кислоту и/или эдетат тринатрия. Иллюстративные противомикробные консерванты включают, но без ограничения, хлорид бензалкония, хлорид бензэтония, бензиловый спирт, бронопол, цетримид, хлорид цетилпиридиния, хлоргексидин, хлорбутанол, хлоркрезол, хлорксиленол, крезол, этиловый спирт, глицерин, гексетидин, имидомочевину, фенол, феноксиэтанол, фенилэтиловый спирт, фенилмеркурат нитрат, пропиленгликоль и/или тимеросал. Иллюстративные противогрибковые консерванты включают, но без ограничения, бутилпарабен, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бензойную кислоту, гидроксибензойную кислоту, бензоат калия, сор-

бат калия, бензоат натрия, пропионат натрия и/или сорбиновую кислоту. Иллюстративные спиртовые консерванты включают, но без ограничения, этанол, полиэтиленгликоль, фенол, фенольные соединения, бисфенол, хлорбутанол, гидроксибензоат, и/или фенилэтиловый спирт. Иллюстративные кислотные консерванты включают, но без ограничения, витамин А, витамин С, витамин Е, бета-каротин, лимонную кислоту, уксусную кислоту, дегидроуксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, сорбиновую кислоту и/или фитиновую кислоту. Другие консерванты включают, но без ограничения, токоферол, токоферол ацетат, детероксим мезилат, цетримид, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BEIT), этилендиамин, лаурилсульфат натрия (SLS), лаурил эфир сульфат натрия (SLES), бисульфит натрия, метабисульфит натрия, сульфит калия, метабисульфит калия, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, метилпарабен, GERMALL® 115, GERMATEN® II, NEOLONE™, KATHON™ и/или EUXYL®.

Иллюстративные буферные средства включают, но без ограничения, растворы цитратного буфера, растворы ацетатного буфера, растворы фосфатного буфера, хлорид аммония, карбонат кальция, хлорид кальция, цитрат кальция, глубионат кальция, глуцептат кальция, глюконат кальция, D-глюконовую кислоту, глицерофосфат кальция, лактат кальция, пропионовую кислоту, левулинат кальция, пентановую кислоту, двухосновный фосфат кальция, фосфорную кислоту, трехосновный фосфат кальция, гидроксид-фосфат кальция, ацетат калия, хлорид калия, глюконат калия, калиевые смеси, двухосновный фосфат калия, одноосновный фосфат калия, смеси фосфатов калия, ацетат натрия, бикарбонат натрия, хлорид натрия, цитрат натрия, лактат натрия, двухосновный фосфат натрия, одноосновный фосфат натрия, смеси фосфатов натрия, трометамин, гидроксид магния, гидроксид алюминия, альгиновую кислоту, апирогенную воду, изотонический солевой раствор, раствор Рингера, этиловый спирт и так далее, и/или их сочетания.

Иллюстративные смазывающие средства включают, но без ограничения, стеарат магния, стеарат кальция, стеариновую кислоту, диоксид кремния, тальк, солод, глицерил бегенат, гидрогенизированные растительные масла, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, лейцин, лаурилсульфат магния, лаурилсульфат натрия и так далее, а также их сочетания.

Иллюстративные масла включают, но без ограничения, масло миндаля, абрикосовых косточек, авокадо, бабассу, бергамота, семян черной смородины, бурачника, можжевельника, ромашки, канолы, тмина, карнаубское масло, касторовое масло, коричное масло, масло какао, кокоса, печени трески, кофе, кукурузное масло, хлопковое масло, жир эму, масло эвкалипта, энотеры, рыбий жир, льняное масло, гераноил, масло тыквы, виноградных косточек, лесного ореха, иссопа, изопропилмиристат, масло жожоба, свечного дерева, лавандин, масло лаванды, лимона, лицеа кубеба, ореха макадамии, мальвы, косточек манго, пенника лугового, норковый жир, масло мускатного ореха, оливковое масло, апельсиновое масло, жир большеголова атлантического, пальмовое масло, масло ядра кокосового ореха, персиковых косточек, арахиса, семян мака, тыквенных семян, рапса, рисовых отрубей, розмарина, сафлора, сандала, камелии масличной, пикантное масло, масло облепихи, кунжута, масло ши, силикон, масло сои, подсолнечника, чайного дерева, чертополоха, камелии, ветивера, грецкого ореха и зародышей пшеницы. Иллюстративные масла включают, но без ограничения, бутилстеарат, каприловый триглицерид, каприновый триглицерид, циклометикон, диэтилсебакат, диметикон 360, изопропилмиристат, минеральное масло, октилдодеканоил, олеиловый спирт, силиконовое масло и/или их сочетания.

В композиции могут присутствовать такие эксципиенты, как масло какао и суппозиторные воски, красители, глазировочные средства, подсластители, ароматизаторы и/или ароматизирующие добавки, в зависимости от решения разработчика рецептур.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению сформулированы с по меньшей мере одним эксципиентом. Антитела могут представлять собой анти-STn антитела. Антитела могут представлять собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие лекарственное средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Лекарственное средство может представлять собой цитотоксическое средство, включая, но без ограничения, любое из тех, которые приведены в настоящем документе. Цитотоксическое средство может представлять собой MMAE. Цитотоксическое средство может быть связано с антителом при помощи линкера.

Носители.

Липосомы, липоплексы и липидные наночастицы.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть сформулированы с использованием одной или более липосом, липоплексов или липидных наночастиц. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие взаимодействующие с гликанами антитела, также содержат липосомы.

Липосомы представляют собой искусственно полученные везикулы, которые преимущественно могут содержать один или более липидных бислоев и могут быть использованы в качестве средства доставки при введении пищевых добавок и фармацевтических препаратов. Липосомы могут иметь разные размеры, например, но без ограничения, могут представлять собой многослойные везикулы (MLV), которые могут иметь сотни нанометров в диаметре и могут содержать серию концентрических бислоев, разделенных узкими водными компартментами; мелкие однослойные везикулы (SUV), которые могут иметь диаметр менее 50 нм; и крупные однослойные везикулы (LUV), которые могут иметь диаметр от 50 до 500

нм. Липосомные конструкции могут включать, но не ограничиваются ими, опсонины или лиганды для усиления прикрепления липосом к нездоровой ткани или для активации событий, таких как, но без ограничения, эндоцитоз. Липосомы могут иметь низкое или высокое значение pH для улучшения доставки фармацевтических препаратов.

Образование липосом может зависеть от физико-химических характеристик, таких как, но без ограничения, заключенный внутри фармацевтический препарат и липосомные ингредиенты, природа среды, в которой диспергированы липидные везикулы, эффективная концентрация заключенного внутри вещества и его потенциальная токсичность, любые дополнительные процессы, происходящие во время применения и/или доставки везикул, оптимизация размера, полидисперсности и срока хранения везикул для запланированного применения, а также воспроизводимость характеристик продукции от серии к серии и возможность крупномасштабного производства безопасных и эффективных липосомных препаратов.

В одном варианте осуществления такие препараты также могут быть сконструированы, или композиции изменены, таким образом, что они пассивно или активно направляются к различным типам клеток in vivo.

Препараты также могут быть избирательно направлены на цель за счет экспрессии разных лигандов на их поверхности, таких как, но без ограничения, фолат, трансферрин, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), а также за счет подходов с направляющими антителами.

Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы могут быть использованы для повышения эффективности функционирования взаимодействующих с гликанами антител, поскольку эти препараты могут быть способны повышать степень трансфекции клеток взаимодействующими с гликанами антителами. Липосомы, липоплексы или липидные наночастицы также могу быть использованы для повышения стабильности взаимодействующих с гликанами антител.

Липосомы, которые специально сформулированы для нагружения антителами, получают методами, известными в данной области, такими как методы, описанные в публикациях Eppstein et al. (Eppstein, D.A. et al., Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 Jun; 82(11):3688-92); Hwang et al. (Hwang, K.J. et al., Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. Proc Natl Acad Sci USA. 1980 Jul; 77(7):4030-4); US 4485045 и US 4544545. Получение липосом с продленным периодом циркуляции также описано в US 5013556.

Липосомы, содержащие взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению, могут быть получены методом обращенно-фазового выпаривания, с использованием таких липидов, как фосфатидилхолин, холестерин, а также фосфатидилэтаноламин, который был дериватизирован полиэтиленгликолем. Для экструдирования липосом нужного диаметра используют фильтры с определенным размером пор. В другом варианте осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с внешней поверхностью липосом за счет реакции дисульфидного обмена, описанной в публикации Martin et al. (Martin, F.J. et al., Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. J Biol Chem. 1982 Jan 10; 257(1):286-8).

Полимеры и наночастицы.

Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут быть сформулированы с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть использованы для доставки, включают, но без ограничения, DMRI/DOPE, полоксамер, хитозан, циклодекстрин и полимеры поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (PLGA). Они могут быть биоразлагаемыми.

Полимерный препарат может обеспечивать замедленное или отсроченное высвобождение взаимодействующих с гликанами антител (например, после внутримышечной или подкожной инъекции). Измененный профиль высвобождения взаимодействующих с гликанами антител может приводить, например, к высвобождению взаимодействующих с гликанами антител в течение более длительного периода времени. Полимерный препарат также может быть использован для повышения стабильности взаимодействующих с гликанами антител.

Полимерные препараты также могут быть избирательно направлены на цель за счет экспрессии разных лигандов, таких как, но без ограничения, фолат, трансферрин, N-ацетилгалактозамин (GalNAc) (Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070; полное содержание публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки).

Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению также могут быть сформулированы в виде наночастиц с использованием сочетания полимеров, липидов и/или других биоразлагаемых соединений, таких как, но без ограничения, фосфат кальция. Компоненты могут быть объединены в структуре типа ядро/оболочка, гибридной и/или послойной структуре, допускающей точную регулировку наночастиц для увеличения эффективности доставки взаимодействующих с гликанами антител. Для взаимодействующих с гликанами антител можно использовать системы на основе поли(2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолин)-блок-(2-(диизопропиламино)этилметакрилата), (PMPC-PDPA),

pH-чувствительного диблоксополимера, который в процессе самосборки образует везикулы нанометрового размера, также известные как полимеросомы, при физиологических значениях pH. Показано, что такие полимеросомы успешно доставляют относительно высокие полезные нагрузки антител в живые клетки. (Massignani, et al., Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool. Nature Proceedings, May, 2010).

В одном варианте осуществления можно использовать PEG-полимер с изменяющимся зарядом (Pitella et al., Biomaterials. 2011 32:3106-3114) для получения наночастиц, доставляющих взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению. PEG-полимер с изменяющимся зарядом является более совершенным в сравнении с полианионными блок-сополимерами PEG в том, что он превращается в поликатионный полимер при кислых значениях pH, что увеличивает эндосомальное высвобождение.

В области применения наночастиц типа ядро/оболочка в центре внимания находится метод с высокой пропускной способностью для синтезирования катионных ядер из сшитого наногеля и различных оболочек (Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108:12996-13001). Комплексообразование, доставку и интернализацию полимерных наночастиц можно точно контролировать, изменяя химический состав компонентов как ядра, так и оболочки, наночастицы.

В одном варианте осуществления используют матрицы из поли(этилен-со-винилацетата), для доставки взаимодействующих с гликанами антител по изобретению. Такие матрицы описаны в Nature Biotechnology 10, 1446-1449 (1992).

Препараты антител.

Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут быть сформулированы для внутривенного введения или внесосудистого введения (Daugherty, et al., Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Aug 7; 58(5-6):686-706, публикация патента США номер 2011/0135570, все из которых включены в настоящий документ в полном объеме). Способы внесосудистого введения могут включать, но без ограничения, подкожное введение, внутрибрюшинное введение, интрацеребральное введение, внутриглазное введение, внутриочаговое введение, топическое введение и внутримышечное введение.

Структуры антител могут быть модифицированы для повышения их эффективности в качестве терапевтических средств. Усовершенствования могут включать, но без ограничения, повышенную термодинамическую стабильность, ослабленные свойства связывания с Fc-рецептором и повышенную эффективность укладки. Модификации могут включать, но без ограничения, аминокислотные замены, гликозилирование, пальмитоилирование и конъюгацию с белком.

Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть сформулированы с антиоксидантами для уменьшения окисления антител. Взаимодействующие с гликанами антитела также могут быть сформулированы с добавками для уменьшения агрегации белка. Такие добавки могут включать, но без ограничения, альбумин, аминокислоты, сахара, мочевину, гуанидиний хлорид, многоатомные спирты, полимеры (такие как полиэтиленгликоль и декстраны), сурфактанты (включая, но без ограничения, полисорбат 20 и полисорбат 80) или даже другие антитела.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть сформулированы для уменьшения воздействия воды на структуру и функцию антител. Антитела в таких препаратах могут быть лиофилизированными. Препараты, подлежащие лиофилизации, могут включать углеводные или полиоловые соединения для защиты и стабилизации структуры антитела. Такие соединения включают, но без ограничения, сахарозу, трегалозу и маннит.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть сформулированы с полимерами. В одном варианте осуществления полимерные препараты могут включать гидрофобные полимеры. Такие полимеры могут представлять собой микросферы, сформулированные с полилактид-со-гликолидом методом инкапсуляции типа твердое вещество в системе масло-в-воде. Микросферы, содержащие этилен-винилацетатный сополимер, также предусмотрены для доставки антител и могут быть использованы для продления времени высвобождения антитела в зоне доставки. В другом варианте осуществления полимеры могут представлять собой водные гели. Такие гели могут, например, содержать карбоксиметилцеллюлозу. Водные гели также могут содержать гидрогель гиалуроновой кислоты. Антитела могут быть ковалентно связаны с такими гелями гидразоновой связью, которая делает возможной замедленную доставку в ткани, включая, но без ограничения, ткани центральной нервной системы.

Пептидные и белковые препараты.

Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут быть сформулированы с пептидами и/или белками. В одном варианте осуществления могут быть использованы пептиды, такие как, но без ограничения, проникающие в клетку пептиды, а также белки и пептиды, обеспечивающие внутриклеточную доставку фармацевтических препаратов. Неограничивающие примеры проникающих в клетку пептидов, которые могут быть использованы с фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению, включают последовательность проникающего в клетку пептида, присоединенную к поликатионам, которые облегчают доставку во внутриклеточное пространство, например, пептид TAT из ВИЧ, пенетратины, транспортаны или полученные из hCT проникающие в клетку пептиды (смотри, например, Caron et al., Mol. Ther. 3(3):310-8 (2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC

Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi et al., Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611 (2003); и Deshayes et al., Cell. Mol. Life Sci. 62(16): 1839-49 (2005), содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Композиции также могут быть сформулированы для включения проникающего в клетку средства, например, липосом, которые увеличивают доставку композиций во внутриклеточное пространство. Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут находиться в комплексе с пептидами и/или белками, такими как, но без ограничения, пептиды и/или белки от компаний Aileron Therapeutics (Cambridge, MA) и Permeon Biologies (Cambridge, MA), для осуществления внутриклеточной доставки (Cronican et al., ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6; Verdine and Hilinski, Methods Enzymol. 2012; 503:3-33; все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В одном варианте осуществления проникающий в клетку полипептид может содержать первый домен и второй домен. Первый домен может содержать сверхзаряженный полипептид. Второй домен может содержать связывающий белок партнер. В настоящем документе "связывающий белок партнер" включает, но не ограничивается ими, антитела и их функциональные фрагменты, каркасные белки или пептиды. Проникающий в клетку полипептид также может содержать внутриклеточный партнер по связыванию для связывающего белок партнера. Проникающий в клетку полипептид может секретироваться из клетки, куда могут быть введены взаимодействующие с гликанами антитела.

В препараты по настоящему изобретению могут быть включены пептиды или белки для повышения эффективности трансфекции клеток взаимодействующими с гликанами антителами или изменения биораспределения взаимодействующих с гликанами антител (например, за счет направления на конкретные ткани или типы клеток).

Клеточные препараты.

Клеточные препараты композиций взаимодействующих с гликанами антител по изобретению могут быть использованы для обеспечения трансфекции клеток (например, в клеточном носителе) или изменения биораспределения композиций (например, за счет направления клеточного носителя на конкретные ткани или типы клеток).

Способы переноса в клетки.

Различные способы известны в данной области и подходят для введения нуклеиновых кислот или белков, таких как взаимодействующие с гликанами антитела, в клетку, включая вирусные и не вирусные методы. Примеры типичных не вирусных методов включают, но без ограничения, электропорацию, опосредованный фосфатом кальция перенос, нуклеофекцию, сонопорацию, тепловой шок, магнитофекцию, опосредованный липосомами перенос, микроинъекцию, перенос, опосредованный бомбардировкой микрочастицами (наночастицами), перенос, опосредованный катионным полимером (DEAE-декстраном, полиэтиленимином, полиэтиленгликолем (PEG) и тому подобным) или слияние клеток.

Метод сонопорации, или обработки клеток ультразвуком, заключается в использовании звука (например, ультразвуковых частот) для изменения проницаемости клеточной плазматической мембраны. Методы сонопорации известны специалистам в данной области и используются для доставки нуклеиновых кислот in vivo (Yoon and Park, Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:321-330; Postema and Gilja, Curr Pharm Biotechnol. 2007 8:355-361; Newman and Bettinger, Gene Ther. 2007 14:465-475; все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Методы сонопорации известны в данной области и также описаны, например, применительно к бактериям, в публикации патента США 20100196983, и применительно к клеткам других типов, например, в публикации патента США 20100009424, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Методы электропорации хорошо известны в данной области и используются для доставки нуклеиновых кислот in vivo и в клинических условиях (Andre et al., Curr Gene Ther. 2010 10:267-280; Chiarella et al., Curr Gene Ther. 2010 10:281-286; Hojman, Curr Gene Ther. 2010 10:128-138; все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления взаимодействующие с гликанами антитела могут быть доставлены методом электропорации.

Введение и доставка.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить любым из стандартных способов или путей введения, известных в данной области.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению можно вводить любым путем введения, который приводит к терапевтически эффективному результату. Они включают, но без ограничения, энтеральный, энтерогастральный, эпидуральный, пероральный, чрескожный, эпидуральный (перидуральный), интрацеребральный (в полушария головного мозга), интрацереброventрикулярный (в желудочки мозга), накожный (нанесение на кожу), внутрикожный (собственно в кожу), подкожный (под кожу), назальный (через нос), внутривенный (в вену), внутриартериальный (в артерию), внутримышечный (в мышцу), внутрисердечный (в сердце), внутрикостную инфузию (в костный мозг), интратекальный (в спинно-мозговой канал), внутрибрюшинный (инфузию или инъекцию в брюшную полость), внутрипузырную инфузию, интравитреальный (через глаз), интракавернозную инъекцию (в основание пениса), интравагинальный, внутриматочный, экстраамниотический, чрескожный (диффузией через интактную

кожу для системного распределения), трансмукозальный (диффузией через слизистую оболочку), инсуфляцию (вдыхание), подъязычный, сублабиальный, при помощи спринцовки, глазных капель (на конъюнктиву) или ушных капель. В конкретных вариантах осуществления композиции можно вводить таким путем, который позволяет им пересекать гематоэнцефалический барьер, сосудистый барьер или другой эпителиальный барьер. Неограничивающие пути введения взаимодействующих с гликанами антител по настоящему изобретению описаны ниже.

Парентеральное и инъекционное введение.

Жидкие лекарственные формы для перорального и парентерального введения включают, но без ограничения, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. Помимо активных ингредиентов, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло семян, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли, сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут включать адъюванты, такие как увлажняющие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, вкусо-ароматические добавки и/или ароматизаторы. В конкретных вариантах осуществления композиции для парентерального введения смешивают с солюбилизирующими средствами, такими как CREMOPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их сочетания. В других вариантах осуществления включают сурфактанты, такие как гидроксипропилцеллюлоза.

Инъекционные препараты, например, стерильные инъекционные водные или масляные суспензии, могут быть сформулированы, как известно в данной области, с использованием соответствующих диспергирующих средств, увлажняющих средств и/или суспендирующих средств. Стерильные инъекционные препараты могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксичных парентерально приемлемых разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В число приемлемых сред и растворителей, которые могут быть использованы, входят вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. В качестве растворителя или суспензионной среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этих целей можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Для изготовления инъекционных препаратов можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Инъекционные препараты можно стерилизовать, например, путем фильтрования через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде перед использованием.

Для продления эффекта активного ингредиента часто бывает желательно замедлять абсорбцию активного ингредиента из участка подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществлять путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость абсорбции лекарственного средства в этом случае будет зависеть от скорости его растворения, которое, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, замедленной абсорбции введенной парентерально лекарственной формы добиваются путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляной среде. Формы депо инъекционного препарата создают путем формирования микроинкапсулированных матриц лекарственного средства в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, а также от природы конкретного используемого полимера, скорость высвобождения лекарственного средства можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Депо инъекционного препарата получают путем заключения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно вводить внутривенно. Введение можно осуществлять внутривенной болюсной инъекцией.

Ректальное и вагинальное введение.

Композиции для ректального или вагинального введения, как правило, представляют собой суппозитории, которые могут быть изготовлены путем смешивания композиций с соответствующими нераздражающими эксципиентами, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела и, вследствие этого, плавятся в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активный ингредиент.

Пероральное введение.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активный ингредиент смешивают с по меньшей мере одним инертным, фармацевтически приемлемым эксципиентом, таким как цитрат натрия

или фосфат дикальция и/или наполнители или сухие разбавители (например, крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота), связывающие вещества (например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик), увлажнители (например, глицерин), дезинтегрирующие средства (например, агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия), задерживающие раствор средства (например, парафин), ускорители абсорбции (например, четвертичные соединения аммония), увлажняющие средства (например, цетиловый спирт и глицерин моностеарат), абсорбенты (например, каолин и бентонитовая глина) и смазывающие средства (например, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия), а также их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль, лекарственная форма может содержать буферные средства.

Топическое или чрескожное введение.

Как описано в настоящем документе, композиции, содержащие взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению, могут быть сформулированы для топического введения. Кожа может быть идеальным сайтом-мишенью для доставки, поскольку она легкодоступна. Экспрессия гена может быть ограничена не только кожей, с потенциальным избеганием неспецифической токсичности, но также и конкретными слоями и типами клеток внутри кожи.

Сайт кожной экспрессии доставляемых композиций будет зависеть от способа доставки нуклеиновой кислоты. Обычно рассматривают три пути доставки взаимодействующих с гликанами антител в кожу: (i) топическое нанесение (например, для локального/зонального лечения и/или косметических вариантов применения); (ii) внутрикожная инъекция (например, для локального/зонального лечения и/или косметических вариантов применения); и (iii) системная доставка (например, для лечения дерматологических заболеваний, затрагивающих как кожные, так и внекожные области). Взаимодействующие с гликанами антитела можно доставлять в кожу с использованием нескольких разных подходов, известных в данной области.

В одном варианте осуществления изобретение относится к различным перевязочным средствам (например, раневым повязкам) или повязкам (например, лейкопластырным повязкам) для удобного и/или эффективного применения способов по настоящему изобретению. Как правило, перевязочные средства или повязки могут содержать значительные количества фармацевтических композиций и/или взаимодействующих с гликанами антител, описанных в настоящем документе, что позволяет производить многократные процедуры для субъекта(ов).

В одном варианте осуществления изобретение относится к композициям, содержащим взаимодействующие с гликанами антитела, доставляемые более чем одной, инъекцией.

Лекарственные формы для топического и/или чрескожного введения композиций могут включать мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, аэрозоли и/или пластыри. Как правило, активный ингредиент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым эксципиентом и/или любыми необходимыми консервантами и/или буферами, по мере необходимости.

Кроме того, по настоящему изобретению предусмотрено использование чрескожных пластырей, которые часто имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы можно получать, например, путем растворения и/или диспергирования соединения в надлежащей среде. Альтернативно или дополнительно, скорость можно контролировать либо за счет использования контролирующей скорость мембраны и/или за счет диспергирования соединения в полимерной матрице и/или геле.

Препараты, подходящие для топического введения, включают, но без ограничения, жидкие и/или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, эмульсии типа масло-в-воде и/или вода-в-масле, например, кремы, мази и/или пасты, и/или растворы, и/или суспензии.

Топически вводимые препараты могут, например, содержать от примерно 1% до примерно 10% (по массе) активного ингредиента, хотя концентрация активного ингредиента может быть настолько высокой, насколько позволяет предельная растворимость активного ингредиента в растворителе. Препараты для топического введения также могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе.

Введение депо.

Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению сформулированы в виде депо для пролонгированного высвобождения. Как правило, для введения выбирают конкретный орган или ткань ("ткань-мишень").

В некоторых аспектах изобретения взаимодействующие с гликанами антитела задерживаются внутри, или вблизи, ткани-мишени. Предложены способы доставки композиций к одной или более тканям-мишеням субъекта-млекопитающего путем создания контакта одной или более тканей-мишеней (содержащих одну или более клеток-мишеней) с композициями в условиях, при которых композиции, в частности, компонент(ы) композиции, представляющий собой взаимодействующее с гликанами антитело, в значительной степени задерживается в ткани-мишени, то есть по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 или более 99,99% композиции задерживается в ткани-мишени. Предпочтительно, удержание в ткани определяют путем измерения уровня взаимодействующих с глика-

нами антител, присутствующих в композициях, проникающих в ткани-мишени и/или клетки-мишени. Например, по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 или более 99,99% взаимодействующих с гликанами антител, введенных субъекту, присутствуют внутри клеток через некоторый период времени после введения. Например, внутримышечную инъекцию субъекту-млекопитающему выполняют с использованием водной композиции, содержащей одно или более взаимодействующих с гликанами антител и реагент для трансфекции, и задержание в ткани композиции определяют путем измерения уровня взаимодействующих с гликанами антител, присутствующих в мышечных клетках.

Некоторые аспекты изобретения относятся к способам доставки композиций для таргетирования тканей субъектов-млекопитающих путем создания контакта тканей-мишеней (содержащих одну или более клеток-мишеней) с композициями в условиях, при которых композиции в значительной степени задерживаются в ткани-мишени. Композиции содержат эффективное количество взаимодействующих с гликанами антител, так что интересующий эффект имеет место по меньшей мере в одной клетке-мишени. Композиции, как правило, содержат средства, обеспечивающие проникновение в клетки, и фармацевтически приемлемый носитель, хотя также предусмотрено введение "голых" взаимодействующих с гликанами антител (например, взаимодействующих с гликанами антител без средств, обеспечивающих проникновение в клетки, или других средств).

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат несколько разных взаимодействующих с гликанами антител, при этом одно или более чем одно, из взаимодействующих с гликанами антител направлено на интересующий гликан. Необязательно, композиции также содержат средства, обеспечивающие проникновение в клетки, которые облегчают внутриклеточную доставку композиций. Определяют дозу композиции, необходимую для таргетирования интересующих гликанов в значительной процентной доле клеток, содержащихся в заранее определенном объеме ткани-мишени (как правило, без таргетирования гликанов в ткани, соседней с заранее определенным объемом ткани, или расположенных в отдалении от тканей-мишеней). После такого определения определенную дозу можно вводить непосредственно в ткань субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления изобретение относится к взаимодействующим с гликанами антителам, доставляемым более чем одной инъекцией или инъекциями разделенных доз.

Легочное введение.

Фармацевтические композиции можно изготавливать, упаковывать и/или продавать в препаратах, подходящих для легочного введения введение через ротовую полость. Такие препараты могут содержать сухие частицы, содержащие активные ингредиенты и имеющие диаметр в диапазоне от примерно 0,5 нм до примерно 7 нм или от примерно 1 нм до примерно 6 нм. Такие композиции для удобства находятся в форме сухих порошков, вводимых с использованием устройства, включающего резервуар для сухого порошка, в который может быть направлен поток пропеллента для распыления порошка, и/или контейнер для распыления смеси самостоятельно приводимого в движение растворителя/порошка, например, устройства, содержащего активный ингредиент, растворенный и/или суспендированный в низкокипящем пропелленте в герметичном контейнере. Такие порошки включают частицы, из которых по меньшей мере 98% частиц по массе имеют диаметр более 0,5 нм, и по меньшей мере 95% частиц по количеству имеют диаметр менее 7 нм. Альтернативно, по меньшей мере 95% частиц по массе имеют диаметр более 1 нм, и по меньшей мере 90% частиц по количеству имеют диаметр менее 6 нм. Сухие порошковые композиции могут содержать твердый мелкодисперсный порошковый разбавитель, такой как сахар, и для удобства предоставляются в стандартной дозированной форме.

Низкокипящие пропелленты, как правило, включают жидкие пропелленты, имеющие температуру кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. Как правило, пропеллент может составлять от 50 до 99,9% (по массе) композиции, и активный ингредиент может составлять от 0,1 до 20% (по массе) композиции. Пропеллент также может содержать дополнительные ингредиенты, такие как жидкий неионный и/или твердый анионный сурфактант и/или твердый разбавитель (который может иметь размер частиц того же порядка, что и частицы, содержащие активный ингредиент).

Фармацевтические композиции, сформулированные для легочной доставки, могут доставлять активный ингредиент в форме капель раствора и/или суспензии. Такие препараты можно изготавливать, упаковывать и/или продавать в виде водных и/или слабоспиртовых растворов и/или суспензий, необязательно, стерильных, содержащих активный ингредиент, и их удобно вводить с использованием любого устройства для распыления и/или пульверизации. Такие препараты также могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но без ограничения, вкусо-ароматическую добавку, такую как сахарин натрия, летучее масло, буферное средство, поверхностно-активное средство и/или консервант, такой как метилгидроксибензоат. Капли, образующиеся при таком способе введения, могут иметь средний диаметр в диапазоне от примерно 0,1 нм до примерно 200 нм.

Интраназальное, назальное и трансбуккальное введение.

Препараты, описанные в настоящем документе, как подходящие для легочной доставки, подходят для интраназальной доставки фармацевтической композиции. Другим препаратом, подходящим для интраназального введения, является крупнодисперсный порошок, содержащий активный ингредиент и

имеющий средний размер частиц примерно от 0,2 мкм до 500 мкм. Такой препарат вводят путем вдыхания, то есть путем быстрой ингаляции через носовые ходы из контейнера с порошком, находящегося близко к носу.

Препараты, подходящие для назального введения, могут, например, содержать всего от примерно 0,1% (по массе) и вплоть до 100% (по массе) активного ингредиента, и могут содержать один или более дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе. Фармацевтическую композицию можно изготавливать, упаковывать и/или продавать в виде препарата, подходящего для трансбуккального введения. Такие препараты могут, например, иметь форму таблетки и/или пастилки, изготовленной с использованием общепринятых методов, и могут, например, содержать от 0,1% до 20% (по массе) активного ингредиента, с остальной частью, включающей растворимую и/или распадающуюся в ротовой полости композицию и, необязательно, один или более из дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе. Альтернативно, препараты, подходящие для трансбуккального введения, могут содержать порошок и/или находящийся в состоянии аэрозоля и/или распыленный раствор и/или суспензию, содержащие активный ингредиент. Такие порошкообразные, находящиеся в состоянии аэрозоля и/или тонкоизмельченные препараты при распылении могут иметь средний размер частиц и/или капель в диапазоне от примерно 0,1 нм до примерно 200 нм, и могут дополнительно содержать один или более из любых дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе.

Введение в глаз или в ухо.

Фармацевтическую композицию можно изготавливать, упаковывать и/или продавать в виде препарата, подходящего для введения в глаз или в ухо. Такие препараты могут, например, иметь форму глазных или ушных капель, содержащих, например, 0,1/1,0% (по массе) раствора и/или суспензии активного ингредиента в водном или масляном жидком эксципиенте. Такие капли могут дополнительно содержать буферные средства, соли и/или один или более из любых дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе. Другие полезные препараты, которые можно вводить в глаз, включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме и/или в липосомном препарате. Субретинальные вкладки также можно использовать в качестве способа введения.

Введение полезной нагрузки.

Взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в ряде разных сценариев, в которых желательна доставка вещества ("полезной нагрузки") к биологической мишени, например, доставка детектируемых веществ для обнаружения мишени, или доставка терапевтического или диагностического средства. Способы обнаружения могут включать, но без ограничения, как способы визуализации in vitro, так и способы визуализации in vivo, например, иммуногистохимические методы, биолюминесцентную визуализацию (БЛВ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), позитронную эмиссионную томографию (ПЭТ), электронную микроскопию, рентгеновскую компьютерную томографию, рамановскую визуализацию, оптическую когерентную томографию, абсорбционную визуализацию, тепловую визуализацию, визуализацию отраженной флуоресценции, флуоресцентную микроскопию, флуоресцентную молекулярную томографию, ядерную магнитно-резонансную томографию, рентгеновскую визуализацию, ультразвуковую визуализацию, фотоакустическую визуализацию, лабораторные анализы, или обнаружение в любой ситуации, когда необходима маркировка/окрашивание/визуализация.

Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть сконструированы для включения как линкера, так и полезной нагрузки, в любой полезной ориентации. Например, линкер, имеющий два конца, используют для присоединения одним концом к полезной нагрузке и другим концом к взаимодействующему с гликанами антителу. Взаимодействующие с гликанами антитела по изобретению могут включать более одной полезной нагрузки, а также расщепляемый линкер. В другом примере, лекарственное средство, которое может быть присоединено к взаимодействующим с гликанами антителам через линкер и может быть флуоресцентно мечено, можно использовать для отслеживания лекарственного средства in vivo, например, внутри клетки.

Другие примеры включают, но без ограничения, использование взаимодействующих с гликанами антител для обратимой доставки лекарственного средства в клетки.

Взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для внутриклеточного направления полезной нагрузки, например, детектируемых или лекарственных средств, к конкретным органеллам. Кроме того, взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для доставки лекарственных средств к клеткам или тканям, например, в организме живых животных. Например, взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для доставки химиотерапевтических средств для уничтожения раковых клеток; взаимодействующие с гликанами антитела, связанные с лекарственными средствами посредством линкеров, могут способствовать проникновению через мембрану, позволяя лекарственному средству проходить в клетку для достижения внутриклеточной мишени.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может представлять собой лекарственное средство, такое как цитотоксин, радиоактивный ион, химиотерапевтическое средство или другое лекарственное средство. Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое может

быть губительным для клеток. Примеры включают, но без ограничения, таксол, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацинедион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин, майтанзиноиды, например, майтанзинол (смотри патент США № 5208020, полное содержание которого включено в настоящий документ), рахелмицин (CC-1065, смотри патенты США № 5475092, 5585499 и 5846545, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), а также их аналоги или гомологи. Радиоактивные ионы включают, но без ограничения, йод (например, йод 125 или йод 131), стронций 89, фосфор, палладий, цезий, иридий, фосфат, кобальт, иттрий 90, самарий 153 и празеодимий. Другие лекарственные средства включают, но без ограничения, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, рахелмицин (CC-1065), мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин C и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (прежнее название дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимитотики (например, винкристин, винбластин, таксол и майтанзиноиды). В случае анти-STn антител по настоящему изобретению уничтожение опухоли может быть стимулировано за счет конъюгации токсина с такими анти-STn антителами.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка может представлять собой детектируемое средство, такое как различные органические малые молекулы, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или субстраты ферментов, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люцифераза, люциферин и экворин), хемилюминесцентные материалы, радиоактивные материалы (например, ^{18}F, ^{67}Ga, ^{81m}Kr, ^{82}Rb, ^{111}In, ^{123}I, ^{133}Xe, ^{201}Tl, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{3}H или ^{99m}Tc (например, в виде пертехнетата (технетата(VII), TcO_4^-)) и контрастные вещества (например, золото (например, золотые наночастицы), гадолиний (например, хелатированный Gd), оксиды железа (например, оксид суперпарамагнитного железа (SPIO), монокристаллические наночастицы оксида железа (MION) и сверхмелкие частицы оксида суперпарамагнитного железа (USPIO)), хелаты марганца (например, Mn-DPDP), сульфат бария, йодированные контрастные среды (йогексол), микропузырьки или перфторуглероды). Такие детектируемые оптическими методами метки включают, например, но без ограничения, 4-ацетамидо-4'-изотиоцианатстилбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; акридин и его производные (например, акридин и акридинизотиоцианат); 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфоновую кислоту (EDANS); 4-амино-N-[(3-винилсульфонил)фенил]нафталимид-3,5-дисульфонат; N-(4-анилино-1-нафтил)малеинимид; антраниламид; BODIPY; бриллиантовый желтый; кумарин и его производные (например, кумарин, 7-амино-4-метилкумарин (AMC, кумарин 120) и 7-амино-4-трифторметилкумарин (кумарин 151)); цианиновые красители; цианозин; 4',6-диаминидино-2-фенилиндол (DAPI); 5',5''-дибромпирогаллолсульфонафталеин (бромпирогаллол красный); 7-диэтиламино-3-(4'-изотиоцианатфенил)-4-метилкумарин; диэтилентриамин-пентаацетат; 4,4'-диизотиоцианатдигидростилбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; 4,4'-диизотиоцианатстилбен-2,2'-дисульфоновую кислоту; 5-[диметиламино]-нафталин-1-сульфонилхлорид (DNS, дансилхлорид); диметиламинофенилазофенил-4'-изотиоцианат (DABITC); эозин и его производные (например, эозин и эозин изотиоцианат); эритрозин и его производные (например, эритрозин B и эритрозин изотиоцианат); этидий; флуоресцеин и его производные (например, 5-карбоксифлуоресцеин (FAM), 5-(4,6-дихлортриазин-2-ил)аминофлуоресцеин (DTAF), 2',7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, X-родамин-5-(и-6)-изотиоцианат (QFITC или XRITC) и флуорескамин); 2-[2-[3-[[1,3-дигидро-1,1-диметил-3-(3-сульфопропил)-2H-бенз[o]индол-2-илиден]этилиден]-2-[4-(этоксикарбонил)-1-пиперазинил]-1-циклопентен-1-ил]этенил]-1,1-диметил-3-(3-сульфопропил)-1H-бенз[o]индолия гидроксид, внутреннюю соль, соединение с n,n-диэтилэтанамином (1:1) (IR144); хлор-2-[2-[3-[(5-хлор-3-этил-2(3H)-бензотиазолилиден)этилиден]-2-(дифениламино)-1-циклопентен-1-ил]этенил]-3-этилбензотиазолия перхлорат (IR140); малахитовый зеленый изотиоцианат; 4-метилумбеллиферон ортокрезолфтадеин; нитротирозин; пararозанилин; феноловый красный; B-фикоэритрин; o-фтальдиальдегид; пирен и его производные(например, пирен, пиренбутират и сукцинимидил-1-пирен); квантовые точки бутирата; реактивный красный 4 (CIBACRON™ Brilliant Red 3B-A); родамин и его производные (например, 6-карбокси-X-родамин (ROX), 6-карбоксиродамин (R6G), лиссамин-родамин B, сульфонилхлорид-родамин (Rhod), родамин B, родамин 123, родамин X изотиоцианат, сульфородамин B, сульфородамин 101, сульфонилхлоридное производное сульфородамина 101 (техасский красный), N, N, N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA), тетраметилродамин и тетраметилродамин изотиоцианат (TRITC)); рибофлавин; розоловую кислоту; производные хелатов тербия; цианин-3 (Cy3); цианин-5 (Cy5); цианин-5,5 (Cy5,5), цианин-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; La Jolta Blue; фталоцианин и нафталоцианин.

В некоторых вариантах осуществления детектируемое средство может представлять собой не детектируемый предшественник, который становится детектируемым при активации (например, флуорогенные конструкты тетразин-флуорофора (например, тетразин-BODIPY FL, тетразин-орегонский зеле-

ный 488 или тетразин-BODIPY TMR-X) или активируемые ферментами флуорогенные реагенты [например, PROSENSE® (VisEn Medical)]. In vitro анализы, в которых могут быть использованы меченые ферментами композиции, включают, но без ограничения, иммуноферментные анализы (ELISA), анализы иммунопреципитации, иммунофлуоресцентные анализы, иммуноферментные анализы (EIA), радиоиммунные анализы (RIA) и вестерн-блот анализ.

Сочетания.

Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы в сочетании с одним или более другими терапевтическими, профилактическими, диагностическими или визуализирующими средствами. Выражение "в сочетании с" не должно подразумевать, что средства должны быть введены в тот же момент времени и/или сформулированы для совместной доставки, хотя такие способы доставки входят в объем настоящего изобретения. Композиции могут быть введены одновременно, до или после одного или более других желательных терапевтических средств или медицинских процедур. Как правило, каждое средство будет введено в дозе и/или в соответствии со схемой введения, определенными для данного средства. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к доставке фармацевтических, профилактических, диагностических и/или визуализирующих композиций в сочетании со средствами, которые способны повышать их биодоступность, уменьшать и/или модифицировать их метаболизм, ингибировать их экскрецию и/или модифицировать их распределение в организме.

В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с гликанами антитела могут быть использованы в сочетании с одним или более противораковыми лекарственными средствами, такими как химиотерапевтическое средство, терапевтическое антитело и/или ингибитор клеточного цикла. Комбинирование лечения взаимодействующими с гликанами антителами с использованием таких противораковых лекарственных средств может обеспечивать дополнительные терапевтические преимущества, например, синергическую противоопухолевую активность, и может быть использовано для лечения рака. В некоторых случаях такие способы могут быть использованы для таргетирования раковых клеток, устойчивых к химиотерапии, терапии антителами и/или лечению ингибиторами клеточного цикла. Способы таргетирования устойчивых к лекарственным средствам раковых клеток могут опираться на изменение экспрессии STn в раковых клетках, происходящее после химиотерапии, терапии антителами и/или лечения ингибиторами клеточного цикла. В некоторых случаях устойчивые к лекарственным средствам раковые клетки экспрессируют STn до и/или после лечения. В некоторых случаях экспрессия STn на клеточной поверхности в устойчивых к лекарственным средствам раковых клетках может быть увеличена после лечения. После лечения некоторые раковые клетки могут пролиферировать, что приводит к образованию популяции STn-экспрессирующих раковых клеток, устойчивых к использованному противораковому лекарственному средству(ам). В некоторых случаях устойчивые к лекарственным средствам раковые клетки представляют собой раковые стволовые клетки.

Соответственно, способы по изобретению могут включать способы введения анти-STn антитела субъекту для таргетирования STn-экспрессирующих раковых клеток, имеющихся после введения одного или более противораковых лекарственных средств. Такие анти-STn антитела могут содержать вариабельный домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из любых из SEQ ID NO: 1-12. У субъектов и/или в раковых тканях у субъектов, получавших лечение анти-STn антителами, может происходить уменьшение количества STn-положительных клеток. В некоторых вариантах осуществления уменьшение количества может включать уменьшение количества STn-положительных клеток на величину от примерно 10% до примерно более 90% (например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%).

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтические средства, используемые в сочетании с анти-STn антителами, могут включать, но без ограничения, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), средства на основе платины (например, цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин), ингибиторы топоизомеразы (например, иринотекан), аналоги нуклеотидов (например, 5-фторурацил и гемцитабин), ингибиторы киназы [например, понатиниб (ICLUSIG®) и сорафениб (NEXAVAR®)] и ингибиторы PARP [например, олапариб (LYNPARZA™)]. Химиотерапевтические средства могут вызывать клеточную гибель или предотвращать клеточный рост за счет механизмов, которые включают, но без ограничения, ингибирование функции микротрубочек, функции ферментов или синтеза ДНК.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические антитела, используемые в сочетании с анти-STn антителами, могут включать антитела, которые направлены на поверхностные рецепторы раковых клеток. Такие поверхностные рецепторы могут быть вовлечены в пути клеточной сигнализации, важные для пролиферации и/или миграции клеток. В некоторых случаях поверхностный рецептор может представлять собой рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) или рецептор человеческого эпидермального фактора роста (HER). Антитела, направленные на эти рецепторы, или связанные факторы, могут ингибировать рост и/или миграцию раковых клеток. Иллюстративные анти-EGFR антитела включают цетуксимаб (ERBITUX®) и панитумумаб (VECTIBIX®). Иллюстративные анти-VEGF антитела включают бевацизумаб (AVASTIN®) и рамуциру-

маб (CYRAMZA®). Иллюстративные анти-HER2 антитела включают трастузумаб (HERCEPTIN®). Среди них, цетуксимаб, панитумумаб, бевацизумаб и рамуцирумаб являются одобренными FDA антителами для лечения колоректального рака.

В некоторых вариантах осуществления лечение ингибиторами клеточного цикла может быть использовано в сочетании с лечением анти-STn антителами. Ингибиторы клеточного цикла могут включать, но без ограничения, ингибиторы циклин-зависимой киназы (CDK), ингибиторы киназы контрольных точек, ингибиторы Polo-подобной киназы (PLK) и ингибиторы киназы Aurora. Используемый в настоящем документе термин "ингибитор клеточного цикла" означает любое средство, которое замедляет или останавливает прогрессирование клеточного цикла. Ингибиторы клеточного цикла могут вызывать остановку клеточного цикла на разных стадиях, и могут приводить к гибели и/или ингибированию роста клеток.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы клеточного цикла могут представлять собой ингибиторы CDK. Циклин-зависимые киназы (CDK) представляют собой группу серин/треониновых киназ. CDK и их партнеры циклины представляют собой ключевые регуляторные ферменты, которые управляют фазовыми переходами в клеточном цикле. Среди них, CDK4 и CDK6 являются ключевыми ферментами, управляющими переходом из фазы GO или фазы G1 в фазу S. CDK4 и CDK6 (в настоящем документе называемые CDK4/6) являются близкими гомологами, которые экспрессируются тканеспецифическим образом. CDK4/6 образует комплекс с циклином D и фосфорилирует белок ретинобластомы (Rb). Фосфорилирование Rb уменьшает супрессию им факторов транскрипции E2F, что приводит к транскрипции генов, кодирующих белки, необходимые для репликации ДНК. Это может позволить клеткам переходить в фазу S. Прохождение через фазу S контролируется комплексами циклина E-CDK2 и циклина A-CDK2. Переход из фазы G2 в фазу M регулируется CDK1 через взаимодействия с партнерами циклинами, циклином A2 и циклином B. Терапевтическое таргетирование CDK (в целом, или конкретных CDK) может препятствовать прогрессированию клеточного цикла и предотвращать клеточную пролиферацию. Смотри Otto and Sicinski, Nat Rev Cancer. 2017; 17(2):93-115; и Asghar et al., Nat Rev Drug Discov. 2015; 14(2): 130-146; содержание публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых случаях ингибиторы CDK могут представлять собой селективные ингибиторы CDK4/6. Из-за роли CDK4/6 в переходе из фазы G1 в фазу S ингибирование CDK4/6 вызывает остановку клеточного цикла в фазе G1. Иллюстративные ингибиторы CDK4/6 включают, но без ограничения, палбоциклиб (Pfizer), рибоциклиб (Novartis) и абемациклиб (Eli Lilly). Палбоциклиб (PD-0332991, IBRANCE®) представляет собой лекарственное средство, одобренное для лечения запущенного (метастатического) рака молочной железы (Finn et al., Breast Cancer Res. 2009; 11(5):R77; Rocca et al., Expert Opin Pharmacother. 2014; 15(3):407-20; патенты США № 6936612; 7863278; 7208489 и 7456168, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Палбоциклиб может быть получен и охарактеризован способами, раскрытыми в патенте США № 7345171, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Аналогично, рибоциклиб (LEE011) также селективно ингибирует CDK4/6 с высокой эффективностью. Рибоциклиб и фармацевтически приемлемые соли рибоциклиба могут быть получены способами, подробно описанными в патентах США № 8685980 и 9193732, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Абемациклиб (LY-2835219) ингибирует не только CDK4 и CDK6, но также несколько других киназ, включая PIM1 (патент США № 7855211, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). О ранней активности абемациклиба сообщалось у пациентов с раком легкого, раком яичника и меланомой (Shapiro et al., ASCO Meeting abstracts 2013; 31:2500).

В некоторых случаях ингибиторы CDK могут представлять собой ингибиторы пан-CDK. Такие ингибиторы могут блокировать несколько CDK и приводить к остановке клеточного цикла на разных стадиях, например к остановке в фазе G1, остановке в фазе G2 и/или остановке в фазе G2/M. Иллюстративные ингибиторы пан-CDK включают, но без ограничения, флавопиридол (альвоцидиб), динациклиб (MK-7965), R-росковитин, AT7519, милциклиб, TG02, CYC065 и RGB-286638. Например, ингибиторы пан-CDK могут представлять собой полусинтетический флавопиридол (например, смотри патент США № 4900727) или аналоги флавопиридола (например, смотри патенты США № 5733920 и 5849733, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В качестве другого примера, ингибиторы пан-CDK могут представлять собой динациклиб, или его фармацевтически приемлемую соль, описанные в патенте США № 7119200, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы клеточного цикла, используемые в сочетании с взаимодействующими с гликанами антителами, могут представлять собой ингибиторы киназы контрольных точек. Ингибирование киназ контрольных точек, например, CHK1, CHK2 или WEE1, может приводить к нарушениям в контрольных точках клеточного цикла (например, контрольной точке фазы S, контрольной точке фазы G2/M или контрольной точке сборки митотического веретена деления), что позво-

ляет клеточному циклу прогрессировать даже в случае повреждения ДНК. Это может инициировать клеточную гибель в процессе митоза по механизму, известному как "митотическая катастрофа". Иллюстративные ингибиторы киназы контрольных точек включают, но без ограничения, МК-8776, прексасертиб (LY2606368), AZD1775, GDC-0575, и те, которые описаны в публикации Visconti et al. J Exp Clin Cancer Res. 2016; 35:153, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы клеточного цикла могут представлять собой ингибиторы Polo-подобной киназы (PLK). Polo-подобные киназы (PLK) представляют собой регуляторные серин/треониновые киназы клеточного цикла. PLK1 является наиболее полно охарактеризованным представителем семейства PLK и является ключевой протеинкиназой митоза, вовлеченной во множество регуляторных событий, таких как фазовый переход G2/M, завершение сборки веретена деления, разделение хромосом и выход из митоза. Иллюстративные ингибиторы PLK1 включают, но без ограничения, ригосертиб (ON 01910.Na), воласертиб (BI 6727), BI 2536, HMN-176, TKM-080301, NMS-P937, DAP-81, циклопалин 1, ZK-тиазолидинон (TAL), SBE13, COM-36, LFM-A13, сцитонемин, вортманнин и GSK461364A (Kumar and Kim, Biomed Res Int. 2015; 2015:705745, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы клеточного цикла могут представлять собой ингибиторы киназы Aurora. Киназы Aurora представляют собой семейство высоко консервативных серин/треониновых киназ, которые важны для правильного прохождения через фазы митоза. Aurora A играет важную роль в различных событиях митоза, включая созревание центросомы, относительное расположение хромосом, сборку веретена деления, завершение мейоза и цитокинез. Aurora B является компонентом комплекса хромосомных пассажиров и принимает участие в конденсации и ориентации хромосом, а также в надлежащем осуществлении цитокинеза. Иллюстративные ингибиторы киназы Aurora включают барасертиб (AZD1152), алисертиб (MLN8237), данусертиб (PHA-739358), ENMD-2076, AT9283, PF-03814735 и AMG 900 (Bavetsias and Linardopoulos, Front Oncol. 2015; 5: 278, содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Дозировка.

Настоящее изобретение относится к доставке взаимодействующих с гликанами антител для любого из терапевтического, фармацевтического, диагностического применения, или визуализации, любым подходящим способом с учетом достижений в области доставки лекарственных средств. Можно доставлять "голые" или сформулированные антитела.

Доставка "голых" антител.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки, ткани, органы или организмы в "голой" форме. Используемый в настоящем документе термин "голые" относится к взаимодействующим с гликанами антителам, доставляемым без каких-либо средств или модификаций, стимулирующих трансфекцию или проницаемость клеток. "Голые" взаимодействующие с гликанами антитела могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы с использованием путей введения, известных в данной области и описанных в настоящем документе. Доставка в "голой" форме может включать доставку препарата в простом буфере, таком как солевой раствор или PBS.

Доставка сформулированных антител.

Взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению могут быть сформулированы с использованием способов, описанных в настоящем документе. Препараты могут содержать взаимодействующие с гликанами антитела, которые могут быть модифицированными или не модифицированными. Препараты также могут включать, но без ограничения, средства, облегчающие проникновение в клетки, фармацевтически приемлемые носители, средства доставки, биоразлагаемые или биосовместимые полимеры, растворители и депо для замедленного высвобождения препарата. Сформулированные взаимодействующие с гликанами антитела могут быть доставлены в клетки с использованием путей введения, известных в данной области и описанных в настоящем документе.

Композиции также могут быть сформулированы для прямой доставки в органы или ткани любым из нескольких способов, известных в данной области, включая, но без ограничения, прямое смачивание или промывание, при помощи катетеров, с использованием гелей, порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель, с использованием таких субстратов, как ткань или биоразлагаемые материалы, покрытые или пропитанные композициями, и тому подобное.

Дозирование.

Настоящее изобретение относится к способам, включающим введение одного или более взаимодействующих с гликанами антител по настоящему изобретению субъекту, который нуждается в этом. Нуклеиновые кислоты, кодирующие взаимодействующие с гликанами антитела, белки или комплексы, включающие взаимодействующие с гликанами антитела, либо их фармацевтические, визуализирующие, диагностические или профилактические композиции, можно вводить субъекту с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для предотвращения, лечения, диагностирования или визуализации заболевания, нарушения и/или состояния. Точное необходимое количество будет варьироваться для разных субъектов в зависимости от биологического вида, возраста и общего состояния здоро-

вья субъекта, степени тяжести заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, характера ее активности, и тому подобного. Композиции по изобретению, как правило, сформулированы в стандартной лекарственной форме для легкости введения и однородности доз. Однако следует понимать, что общее суточное использование композиций по настоящему изобретению будет определять лечащий врач на основании обоснованного медицинского решения. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или соответствующий визуализирующий уровень доз для каждого конкретного пациента будет зависеть от различных факторов, включая подвергаемое лечению заболевание и степень тяжести заболевания; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость экскреции конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в сочетании, или параллельно, с конкретным используемым соединением; и тому подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению (например, анти-STn антитела) можно вводить в виде части композиции, в которой концентрация таких соединений составляет от примерно 0,01 мг/мл до примерно 1 мг/мл, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 5 мг/мл, от примерно 0,5 мг/мл до примерно 10 мг/мл, от примерно 2 мг/мл до примерно 20 мг/мл или от примерно 5 мг/мл до примерно 50 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления композиции можно вводить в объеме, в расчете на массу субъекта, составляющем от примерно 0,01 мл/кг до примерно 1 мл/кг, от примерно 0,2 мл/кг до примерно 1,2 мл/кг, от примерно 0,05 мл/кг до примерно 2 мл/кг, от примерно 0,1 мл/кг до примерно 3 мл/кг, от примерно 0,5 мл/кг до примерно 5 мл/кг, от примерно 2 мл/кг до примерно 10 мл/кг или от примерно 5 мл/кг до примерно 20 мл/кг. Введение может представлять собой внутривенное введение (например, внутривенную болюсную инъекцию).

В конкретных вариантах осуществления соединения или композиции по настоящему изобретению можно вводить на уровнях доз, достаточных для доставки количества активного соединения (например, анти-STn антитела или химиотерапевтического средства), в расчете на массу тела субъекта, составляющего от примерно 0,0001 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 6 мг/кг, от примерно 2 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 5 мг/кг до примерно 20 мг/кг или от примерно 10 мг/кг до примерно 200 мг/кг. Введение можно выполнять один или более раз в сутки для достижения желаемого терапевтического, диагностического, профилактического или визуализирующего эффекта. Нужная доза может быть доставлена в соответствии с любой схемой дозирования, включая, но без ограничения, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, через день, каждый третий день, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые 5 месяцев, каждые 6 месяцев или каждый год. В конкретных вариантах осуществления нужная доза может быть доставлена с использованием нескольких введений (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати или более введений).

В соответствии с настоящим изобретением, взаимодействующие с гликанами антитела можно вводить в режимах разделенных доз. Используемый в настоящем документе термин "разделенная доза" означает разделение единичной стандартной дозы или общей суточной дозы на две или более доз, например, два или более введений единичной стандартной дозы. Используемый в настоящем документе термин "единичная стандартная доза" означает дозу любого терапевтического средства, введенную одной дозой/в один момент времени/одним путем/в одну точку контакта, то есть во время одного события введения. Используемый в настоящем документе термин "общая суточная доза" означает количество, вводимое или предписанное для введения в течение 24-часового периода времени. Оно может быть введено в виде единичной стандартной дозы. В одном варианте осуществления взаимодействующие с гликанами антитела по настоящему изобретению вводят субъекту в разделенных дозах. Взаимодействующие с гликанами антитела могут быть сформулированы только в буфере, или в препарате, описанном в настоящем документе. Фармацевтические композиции, содержащие взаимодействующие с гликанами антитела, описанные в настоящем документе, могут быть сформулированы в лекарственной форме, описанной в настоящем документе, например, топической, интраназальной, интратрахеальной или инъекционной (например, внутривенной, внутриглазной, интравитреальной, внутримышечной, внутрисердечной, внутрибрюшинной или подкожной). Общую информацию по формулированию и/или производству фармацевтических средств можно найти, например, в сборнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Покрытия или оболочки.

Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно изготавливать с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в фармацевтической области. Они могут, необязательно, содержать опалесцирующие компоненты и могут иметь такой состав, что они высвобождают активный ингредиент(ы) только, или предпоч-

тительно, в центральной части кишечного тракта, необязательно, отсроченным образом. Примеры композиций для покрытия, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции аналогичного типа можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполняемых желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза, или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное.

IV. Наборы и устройства.

Наборы.

Любые из композиций, описанных в настоящем документе, можно включать в набор. В качестве неограничивающего примера, в набор включают реагенты для получения взаимодействующих с гликанами антител, включая молекулы антигена. Набор может дополнительно включать реагенты или инструкции для получения или синтеза взаимодействующих с гликанами антител. Он также может включать один или более буферов. Другие наборы по изобретению могут включать компоненты для создания матриц или библиотек белков, или нуклеиновых кислот, взаимодействующих с гликанами антител и, таким образом, могут включать, например, твердую подложку.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам для скрининга, мониторинга и/или диагностики субъекта, включающим одно или более взаимодействующих с гликанами антител. Такие наборы могут быть использованы отдельно или в сочетании с одним или более другими способами скрининга, мониторинга и/или диагностики (например, сопроводительной диагностики). Некоторые наборы включают одно или более из буфера, биологического стандарта, вторичного антитела, обнаруживающего реагента и композиции для предварительной обработки образца (например, для извлечения, блокирования антигена, и так далее).

Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Контейнер в наборах, как правило, будет включать по меньшей мере одну ампулу, пробирку, колбу, флакон, шприц или другой контейнер, в который компонент может быть помещен и, предпочтительно, разделен на аликвоты. В случае наличия более одного компонента в наборе (реагент для мечения и метка могут быть упакованы совместно), набор, как правило, также будет включать второй, третий, и так далее, дополнительный контейнер, в которые могут быть отдельно помещены дополнительные компоненты. Наборы также могут включать второй контейнер для содержания стерильного, фармацевтически приемлемого буфера и/или другого разбавителя. Однако разные сочетания компонентов могут содержаться во флаконе. Наборы по настоящему изобретению, как правило, также будут включать приспособления для заключения взаимодействующих с гликанами антител, например, белков, нуклеиновых кислот и любых других контейнеров с реагентами в надежную упаковку для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать получаемые литьем под давлением или литьем с раздувом пластиковые контейнеры, в которых содержатся нужные флаконы.

Когда компоненты набора предоставляют в одном и/или более жидких растворах, жидкий раствор представляет собой водный раствор, при этом стерильный водный раствор является особенно предпочтительным. Однако компоненты набора могут быть предоставлены в виде сухого порошка(ов). Когда реагенты и/или компоненты предоставлены в виде сухого порошка, порошок может быть восстановлен путем добавления соответствующего растворителя. Предусмотрено, что растворитель также может быть предоставлен в другом контейнере. В некоторых вариантах осуществления маркирующие красители предоставляют в виде сухого порошка. Предусмотрено, что в наборах по изобретению предоставляют 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 мкг, или по меньшей мере 1000 мкг, или не более 10 г, сухого красителя. Затем краситель можно ресуспендировать в любом подходящем растворителе, таком как DMSO.

Набор может включать инструкции по использованию компонентов набора, а также по использованию любого другого реагента, не включенного в набор. Инструкции могут включать вариации, которые могут быть использованы.

Устройства.

Любые из композиций, описанных в настоящем документе, могут быть объединены с, нанесены на, или погружены в устройство. Устройства включают, но без ограничения, зубные имплантаты, стенты, замещающие дефекты кости материалы, искусственные суставы, клапаны, кардиостимуляторы или другие имплантируемые терапевтические устройства.

V. Эквиваленты и объем изобретения.

Специалисты в данной области осознают, или будут способны установить с использованием не более чем рутинного экспериментирования, множество эквивалентов конкретным вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем документе. Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен приведенным выше описанием, но лишь содержанием прилагаемой формулы изобретения.

В формуле изобретения форма единственного числа существительных может означать "один или более одного", если не указано иное или иное не следует из контекста. Пункты формулы или описания, которые включают слово "или" в выражении "один или более" членов группы, следует толковать так, что один, более чем один, или все из членов группы присутствуют в, участвуют в, или иным образом связаны с конкретным продуктом или процессом, если не указано иное или иное не следует из контекста.

Изобретение включает варианты осуществления, в которых точно один член группы присутствует в, участвует в, или иным образом связан с конкретным продуктом или процессом. Изобретение включает варианты осуществления, в которых более чем один, или все члены группы присутствуют в, участвуют в, или иным образом связаны с конкретным продуктом или процессом.

Также следует отметить, что термин "включающий" должен быть открытым, и допускает, но не требует, включение дополнительных элементов или этапов. Когда в настоящем документе используют термин "включающий", термин "состоящий из", следовательно, также предусмотрен и указан.

В приведенных диапазонах конечные значения включены. Более того, следует понимать, что, если нет иных указаний или иное не следует из контекста и знаний специалистов в данной области, значения, которые представлены в виде диапазона, могут являться любым конкретным значениям или поддиапазоном в указанных диапазонах в различных вариантах осуществления изобретения, до десятой доли единицы нижнего предела диапазона, если из контекста четко не следует иное.

Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который является частью предшествующего уровня техники, может быть в прямой форме исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку считается, что такие варианты осуществления известны специалистам в данной области, они могут быть исключены, даже если это исключение в прямой форме не заявлено в настоящем документе. Любой конкретный вариант осуществления композиций по изобретению (например, любая нуклеиновая кислота или белок, закодированный ею; любой способ получения; любой способ применения, и так далее), может быть исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения по любой причине, связанной или не связанной с существованием предшествующего уровня техники.

Все цитированные литературные источники, например, ссылки, публикации, базы данных, значения в базе данных и материалы, цитированные в настоящем документе, включены в настоящую заявку посредством ссылки, даже если это специально не указано при цитировании. В случае конфликта формулировок в цитируемом источнике и в настоящей заявке, формулировка в настоящей заявке должна иметь преимущественную силу.

Заголовки разделов и таблиц не должны быть ограничивающими.

Примеры

Пример 1. Анализ с гликановыми матрицами.

Оптимизированные гликановые матрицы используют для тестирования аффинности и специфичности антител в отношении нескольких гликанов в одном эксперименте. Гликановые матрицы включают 71 химически синтезированный и четко определенный гликан, большинство из которых представляют собой гликановые пары Neu5Ac и Neu5Gc. Слайды с матрицами получают коммерческим путем (ArrayIt Corp, Sunnyvale, CA) и они включают гликаны, приведенные в табл. 4.

Таблица 4

Гликаны матрицы

ID № Гликана	Гликан
1	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
2	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
3	Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
4	Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
5	Neu5Acα2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
6	Neu5Gcα2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
7	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
8	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
9	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
10	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
11	Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
12	Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
13	Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
14	Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
15	Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
16	Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
17	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
18	Neu5Gcα2,6Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
19	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
20	Neu5Gcα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
21	Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2

22	Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
23	Neu5,9Ac2α2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
24	Neu5Gc9Acα2,6GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
25	Neu5Acα2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
26	Neu5Gcα2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
27	Neu5Acα2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
28	Neu5Gcα2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
29	Neu5,9Ac2α2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
30	Neu5Gc9Acα2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
31	Neu5,9Ac2α2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
32	Neu5Gc9Acα2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
33	Neu5Acα2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
34	Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
35	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
36	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
37	Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
38	Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
39	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
40	Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
41	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
42	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2 NH2
43	Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
45	Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
47	GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
51	Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
52	Galβ1,3GlcNAcαO(CH2)2CH2NH2
53	Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
54	Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
55	Neu5Acα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
56	Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
57	Neu5Acα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
58	Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
59	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
60	Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
61	Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
62	Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
63	Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
64	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)3NHCOCH2(OCH 2CH2)6NH2
65	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)3NHC OCH2(OCH2CH2)6NH2
66	Neu5Acα2,6(Neu5Acα2,3)Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
67	Neu5Acα2,6(Neu5Gcα2,3)Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
68	Neu5Acα2,6(KDNα2,3)Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
69	Neu5Gcα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
70	KDNα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
71	Neu5Acα2,8Kdnα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
72	Neu5Acα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
73	Neu5Acα2,8Neu5Gcα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
74	KDNα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
75	Neu5Gcα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
76	Neu5Acα2,8Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2

300 мл эпоксидного блокирующего буфера готовят путем объединения 15 мл 2 М трис-буфера (pH 8) с 0,9 мл 16,6 М этаноламина и 284,1 мл дистиллированной воды. Раствор доводят до конечного значения pH 9,0 при помощи HCl. Раствор фильтруют с использованием нитроцеллюлозной мембраны с 0,2-мкм порами. Эпоксидный буферный раствор, а также 1 л дистиллированной воды предварительно нагревают до 50°C. Стеклянные слайды собирают в держателе слайдов и быстро погружают в ванночку для окрашивания с нагретым эпоксидным блокирующим буфером. Слайды инкубируют в эпоксидном блокирующем буфере в течение 1 часа при 50°C с периодическим встряхиванием для дезактивации эпоксидных связывающих сайтов. Затем слайды промывают и блокируют PBS с 1% OVA при 25°C в течение одного часа. Образцы сыворотки с поликлональными антителами (1:1000) или очищенные моноклональные антитела (1 мкг/мл) разбавляют в PBS с 1% OVA и добавляют к гликановым матрицам на один час при 25°C. После интенсивного промывания связывание антител обнаруживают путем инкубации слайдов гликановых матриц с Cy3-конъюгированными антителами против IgG мыши (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) в течение одного часа. Затем слайды интенсивно промывают, сушат и сканируют на сканере Genepix 4000B (лазер на 100%; усиление на 350; 10-мкм пиксели). Необработанные данные от сканированных изображений получают с использованием программы Genepix и проводят анализ необработанных данных. Антитела считают высоко специфичными в отношении AcSTn и GcSTn, если они демонстрируют связывание с обеими молекулами, но не с Tn или какими-либо другими гликанами на мат-

рице.

На основании результатов анализа с использованием матриц антитела классифицируют в соответствии с профилем связывания матричных гликанов. Антитела относят к "группе 1" антител, способных к связыванию AcSTn и GcSTn, если они связывают гликаны 5, 6, 23 и 24. Такие антитела называют пан-STn антителами из-за их способности к связыванию широкого диапазона структур STn и части STn, указанной наибольшим эллипсом на фиг. 1A. Антитела относят к "группе 2" антител, способных к связыванию STn, а также некоторых родственных структур, содержащих O-связь с остатком серина или треонина, если они связывают гликаны 5, 6, 23, 24, 27 и 31. Считается, что эти антитела связывают часть STn, указанную наибольшим эллипсом на фиг. 1B. Некоторые антитела группы 2 с большим предпочтением связывают структуры с AcSTn, чем структуры с GcSTn. Антитела относят к "группе 3" антител (способных к связыванию STn, но также способных к связыванию более широкой группы родственных структур), если они связывают гликаны 5, 6, 23, 24, 17, 3, 19, 37, 27 и 31. В отличие от антител группы 2, для антител группы 3 не требуется, чтобы такие структуры имели O-связь с остатком серина или треонина. Считается, что антитела группы 3 связывают часть STn, указанную наибольшим эллипсом на фиг. 1C. И наконец, антитела относят к "группе 4" антител, способных к связыванию как AcSTn, так и GcSTn, а также не сиалированного антигена Tn (то есть имеющих более широкую специфичность), если они связывают гликаны 5, 6, 23, 24 и 47. Считается, что антитела группы 4 связывают часть STn, указанную наибольшим эллипсом на фиг. 1D.

Пример 2. Получение мышиных анти-STn антител.

Антитела mSIA101 и mSIA102 получали с использованием вариабельных доменов из анти-STn моноклональных антител, полученных, как описано ранее в патентной публикации США номер US2016/0130356 (содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме), путем иммунизации мышей муцинами. Последовательности вариабельных доменов mSIA103 получали из IgG1 антитела 3F1 (SBH Biosciences, Natick, MA). Экспрессионные векторные конструкты IgG2a (плазмиду H1206 для тяжелых цепей антитела и плазмиду L1206 для легких цепей антитела, LakePharma, Belmont, CA) модифицировали для кодирования вариабельных доменов mSIA101, mSIA102 и mSIA103 выше константных областей IgG2a. Последовательности экспрессированных доменов приведены в табл. 5.

Таблица 5

Последовательности, используемые для получения IgG2a антитела

Домен	Последовательность	SEQ ID NO
mSIA101, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQK PEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFRGKATLTADKSSSTAYM QLNSLSSDDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTLVTVSA	1
mSIA101, домен VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNRGNHKNYLT WYRQKPGLPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFALTI SSVQAEDLAVYYCQNDYTYPYTFGGGTKLEIKR	2
mSIA102, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQK PEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVKATLTADKSSSTAY MQLTSLTSEDSAVYFCKRSYYGDWGQGTTLTVSS	3
mSIA102, домен VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQQKQG KSPQLLVYGATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSLQSEDF GSYYCQHFWGAPFTFGSGTKLEIK	4
mSIA103, домен VH	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQK PEQGLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTACM HLNSLTSEDSAVYFCKRSLLALDYWGQGTTLTVSS	5
mSIA103, домен VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTNIAWYQQKP GRSPKVLIYSASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSED LTDYFCQQYSSFPLTFGVGTKLELK	6

IgG2a, константный домен тяжелой цепи	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN VAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF PPKIKDVLMISLSPIVTCVWDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRWSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K	13
константный домен легкой цепи каппа	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	14

Плазмиды, кодирующие полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой цепи, и плазмиды, кодирующие полноразмерные аминокислотные последовательности легкой цепи, были трансфицированы в клетки и экспрессированы, с получением зрелых антител.

Клетки яичника китайского хомяка K1 (CHO-K1) трансфицировали для получения стабильной линии клеток, экспрессирующих IgG2a антитела. Клетки культивировали в инкубаторе с увлажненной атмосферой, содержащей 5% CO_2, при 37°C в среде с определенным химическим составом (CD-CHO, Invitrogen, Carlsbad, CA), содержащей L-глутамин.

Примерно 80 миллионов суспензионных клеток CHO в логарифмической фазе роста трансфицировали методом электропорации (MaxCyte) 80 мкг суммарной плазмиды, кодирующей полноразмерные тяжелые и легкие цепи. Через двадцать четыре часа трансфицированные клетки подвергали селекции на стабильную интеграцию генов антитела. В процессе селекции клетки осаждали и ресуспендировали в свежей селективной среде каждые 2-3 дня до того момента, когда в пуле клеток были восстановлены скорость роста и жизнеспособность. Клетки контролировали в отношении роста, титра и стабильной интеграции экспрессионных конструктов антитела. Период удвоения составлял 20 часов.

Стабильные линии клеток культивировали для крупномасштабного продуцирования, и получали 10 л культуры. Кондиционированную среду, собранную от стабильно продуцирующего пула клеток, осветляли центрифугированием и фильтрованием через мембрану с 0,2-мкм порами. Антитело очищали аффинной хроматографией с белком A, затем стерилизовали и осветляли от частиц пропусканием через мембранный фильтр с 0,2-мкм порами. После очистки от примесей эндотоксина и фильтрования концентрацию доводили до 5 мг/мл и извлекали 120 мг антитела.

Для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) антитела конъюгировали с монометилауристатином E (MMAE). Конъюгацию выполняли путем создания контакта антител с малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил-монометилауристатином E (MC-vc-PAB-MMAE, в настоящем документе называемым CL-MMAE). Полученная конъюгация основана на связи малеинимид-цистеин, при этом межцепочечные дисульфидные связи антитела были восстановлены TCEP, а затем связаны с малеинимидным фрагментом лекарственного средства.

Конъюгированные антитела обессоливали на колонках с Sephadex G50 для удаления остаточных непрореагировавших токсинов, а затем диализовали в 30 мМ HEPES, pH 7,7, с 150 мМ NaCl. Использовали эксклюзионную хроматографию (SEC) и хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC) для определения соотношения лекарственного средства и антитела (DAR).

Пример 3. Характеристики мышиных антител и ADC.

Мышиные антитела характеризовали в отношении in vitro и in vivo эффективности в моделях рака молочной железы, толстой кишки и яичника. Антитела использовали для идентификации линии клеток CRC, экспрессирующих на поверхности STn. Пять линий клеток CRC инкубировали in vitro и выращивали до конфлюэнтности. Экспрессию STn, в %, определяли методом проточной цитометрии с использованием анти-STn антител. Примерно 30-70% культивируемых клеток SW403, COLO205 и LS174T естественным образом экспрессировали STn на своей поверхности (что установлено с использованием mSIA103), в то время как HT29 и RKO имели очень небольшое, или не поддающееся обнаружению, количество STn (что установлено с использованием hSIA101) на своей клеточной поверхности (смотри табл. 6).

Таблица 6

Экспрессия STn в линиях клеток CRC

Линия клеток	Экспрессия STn, %
COLO205	67,7
LS174T	69,9
SW403	30,0
RKO	низкая или неопределяемая
HT29	низкая или неопределяемая

Кроме того, микропанель тканей (TMA) CRC (NBP2-30214; Novus Bio, Littleton, CO) окрашивали на экспрессию STn. Матрица состояла из 59 образцов, с обработкой и без обработки ферментом нейраминидазой (сиалидазой). Нейраминидаза специфически расщепляет концевые сиаловые кислоты и разрушает антиген STn, присутствующий в данной ткани. Из 51 неопластических образцов на TMA 45 имели до некоторой степени положительное окрашивание мембран, и окрашивание анти-STn mSIA103 на всех 45 отсутствовало в случае обработки 250 мЕд/мл нейраминидазы. Окрашивание виментин-специфичным антителом было не эффективным, свидетельствуя о том, что связывание анти-STn антитела mSIA103 было специфичным для сиаловой кислоты. Окрашивание образцов нормальной толстой кишки (8 образцов) было ограничено криптами и поверхностной слизистой оболочкой, а также апикальной стороной клеток, которая должна быть защищена от вводимого внутривенно терапевтического ADC.

Были проведены предварительные исследования ксенотрансплантатов с использованием клеток COLO205 для оценки in vivo эффективности мышиных конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Модель с подкожным ксенотрансплантатом COLO205 получали путем инъекции 5×106 клеток/мышь в правый бок бестимусным "голым" мышам. Лечение начинали, когда опухоли достигали среднего размера 180 мм^3. Мышам вводили один раз в неделю дозу 5 мг/кг в течение трех недель. В данном исследовании оценивали только mSIA103 без токсина, mSIA103-CL-MMAE, mSIA103, конъюгированное с монометилауристатином F (MMAF) при помощи нерасщепляемого линкера, и контрольный растворитель. mSIA103-CL-MMAE демонстрировало значительное ингибирование роста опухолей с показателем соотношения лечения/контроля (T/C), составляющим 44,5% (p=0,008), в сравнении с другими тремя группами.

Пример 4. Получение гуманизированных анти-STn антител.

Гуманизированные варианты вариабельных доменов mSIA101, mSIA102 и mSIA103 получали путем введения CDR в последовательности зародышевой линии антитела человека методом, носящим название "пересадка CDR". Полученные вариабельные домены использовали для получения гуманизированных антител hSIA101, hSIA102 и hSIA103 путем экспрессии конструктов, кодирующих гуманизированные вариабельные домены, с константными доменами IgG1 человека. Последовательности вариабельных доменов и константных доменов экспрессированных антител приведены в табл. 7.

Таблица 7

Гуманизированные вариабельные домены

Антитело	Домен	Последовательность	SEQ ID NO
hSIA101	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGTLVTVSS	7
hSIA101	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPYTFGQGTKVEIK	8
hSIA102	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTLVTVSS	9
hSIA102	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQGTKVEIK	10
hSIA103	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTAYMQLRSLRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGTLVTVSS	11

hSIA103	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQK PGKAPKVLIYSASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYFCQQYSSFPLTFGQGTKVEIK	12
IgG1 человека	Константный домен тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
IgG1 человека	Константный домен легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVДHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

Получение конъюгатов гуманизированное антитело-лекарственное средство (ADC) с MMAE выполняли, используя те же способы, которые описаны ранее для мышиных антител.

Пример 5. Характеристики гуманизированных антител.

Характеристики гуманизированных IgG1 антител, полученных, как описано выше, получали с использованием анализа связывания на основе метода проточной цитометрии с клетками MDA-MB-231-STn; анализа связывания методом BSM ELISA и анализа с использованием гликановых матриц.

В исследованиях связывания на основе метода проточной цитометрии проводили скрининг антител в диапазоне концентраций от 0 до 300 нМ, сравнивая связывание с клетками MDA-MB-231, имеющими или не имеющими индуцированную трансфекцией экспрессию STn. Связывание определяли с использованием APC-конъюгированного вторичного антитела против иммуноглобулинов человека, и учитывали лишь живые клетки (за счет установки негативного дискриминационного окна на окрашивание пропидий йодидом). В среднем для каждого образца было собрано 5000 событий. Данные анализировали с использованием FlowJo software (Asland, OR) и получали средние значения для APC и % APC. Эти данные логарифмически преобразовывали, а затем проводили подгонку модели нелинейной регрессии, получая информацию по связыванию для построения кривой зависимости ответа от дозы и определения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}). Человеческое IgG1 антитело использовали в качестве отрицательного контроля по изотипу. Рецептор эпидермального фактора роста (LA22, EMD Millipore, Billerica, MA) использовали в качестве положительного контроля.

Для анализа BSM ELISA проводили скрининг антител в диапазоне концентраций от 0 до 100 нМ в лунках, покрытых муцином подчелюстных желез крупного рогатого скота (BSM). Набор лунок обрабатывали слабым раствором периодата перед внесением антитела для удаления боковой цепи на концевых остатках сиаловой кислоты (разрушение антигена STn). Определяли оптическую плотность в обработанных и не обработанных периодатом лунках, показатели логарифмически преобразовывали, а затем проводили подгонку модели нелинейной регрессии, получая кривую зависимости ответа от дозы. Значения оптической плотности, полученные для обработанных периодатом лунок, вычитали из значений для не обработанных периодатом лунок, получая кривую для периодат-чувствительного связывания STn и соответствующие значения EC_{50}.

Анализ с гликановыми матрицами проводили, как описано ранее, и для антител определяли профили связывания гликанов в матрице на основании полученных результатов.

Результаты проточной цитометрии, ELISA и анализа с гликановыми матрицами приведены в табл. 8.

Таблица 8

Результаты определения характеристик антител

Клон	**Связывание клеток MDA–MB–231–STn [EC_{50} (нМ)]**	**BSM ELISA [EC_{50} (нМ)]**	**Профиль связывания гликанов в матрице**
hSIA101	2,0	4,2	Группа 1
hSIA102	0,1	не определено	Группа 4
hSIA103	0,3	1,8	Группа 1

Все протестированные антитела демонстрировали связывание с STn, связанным с клетками и BSM. Связывание отсутствовало в случае контрольных по изотипу IgG1 человека (Southern Biotech, Birmingham, AL). Связывание hSIA102 не было чувствительным к обработке периодатом в анализах ELISA,

вследствие чего невозможно было надежно определить EC_{50} в анализе BSM ELISA.

Пример 6. Анализ конъюгатов гуманизированное антитело-лекарственное средство.

MMAE-конъюгированные ADC-варианты hSIA101, hSIA102 и hSIA103 оценивали в анализе цитотоксичности ADC с использованием клеток MDA-MB-231 (родительских или трансфицированных для повышенной экспрессии STn). Родительские клетки выращивали в минимальной эссенциальной среде Игла (EMEM) с добавлением 10% ЭБС, 1х смеси пенициллин/стрептомицин и 45 мкг/мл гентамицина. STn-положительные клетки выращивали в той же среде, за исключением добавления 1 мг/мл G418 в качестве селективного антибиотика. Клетки высевали раздельно (4000 клеток/лунку для родительских клеток или 2000/лунку для STn-положительных клеток) в 96-луночные планшеты, используя соответствующую среду, описанную выше. Клетки росли в течение ночи. Через 16-20 часов клетки обрабатывали в тройном повторе тестируемыми антителами в разных концентрациях (50 нМ - 0,012 нМ) в течение 72 часов. Затем клетки анализировали с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток ADC CELLTITER-GLO® (Promega, Madison, WI) для определения количества присутствующего АТФ, показателя метаболически активных клеток. В анализе используют единственный реагент, который добавляют непосредственно к культивируемым клеткам в содержащей сыворотку среде. Реагент лизирует клетки и генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству присутствующего АТФ. Люминесцентные сигналы анализировали и использовали для расчета значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для каждого используемого антитела на основании концентрации, необходимой для уничтожения STn-положительных клеток на половине максимального уровня (см. табл. 9).

Таблица 9

Значения IC_{50} для ADC гуманизированных антител

Гуманизированное антитело	IC_{50} (нМ)
hSIA103	1,3
hSIA102	2,6
hSIA101	5,2

Все протестированные антитела имели значения IC_{50} в единственном наномолярном диапазоне, это указывало на сильную способность каждого из них к уничтожению экспрессирующих STn клеток.

Аналогичные исследования проводили с использованием клеток OVCAR3 в культуре. Использовали дозы hSIA101-MMAE и hSIA102-MMAE от 5 пМ до примерно 300 нМ и получили значение IC_{50}, равное 29 нМ, для hSIA101-MMAE и значение IC_{50}, равное 15 нМ, для hSIA102-MMAE.

Пример 7. Анализы STn.

Анализы ELISA разрабатывают для идентификации и количественного определения уровней STn в образцах от субъектов. Муцин подчелюстных желез крупного рогатого скота (BSM), который является сильно сталированным, используют для получения стандартных кривых и для оптимизации анализа. В начальных анализах используют коммерчески доступные мышиные анти-STn антитела [например, антитело 3F1 (SBH Sciences, Natick, MA), антитело B72.3 (смотри Colcher, D. et al., 1981. PNAS. 78(5): 3199-203) и антитело CC49 (смотри Muraro, R. et al., 1988. Cancer Res. 48: 4588-96)] для покрытия аналитических планшетов и захвата BSM в тестируемых образцах (буферных растворах или образцах сыворотки с добавленным BSM). Гуманизированные анти-STn антитела (например, hSIA101, hSIA102 и hSIA103) используют для обнаружения захваченного BSM. Антитела, используемые для захвата и обнаружения, тестируют двумя способами. Один из них заключается в тестировании на сочетающуюся пару в анализах ELISA в сэндвич-формате. Второй заключается в тестировании методом проточной цитометрии на конкурентное связывание с использованием флуоресцентных меток антител и чередованием порядка экспонирования для STn-экспрессирующих клеток. Пары антител, которые не конкурируют за связывание, используют для дальнейшей разработки анализа.

В следующих анализах используют анти-STn антитела в качестве захватывающих антител, связанных с аналитическими планшетами, и видоспецифические обнаруживающие антитела для обнаружения связанных белков. Например, человеческие анти-STn мАт могут быть использованы в качестве как покрывающих, так и обнаруживающих мАт, если обнаруживающие мАт являются напрямую мечеными (например, Alexa-488, HRP и так далее). Например, мышиные анти-STn мАт могут быть использованы в качестве как покрывающих, так и обнаруживающих мАт, если обнаруживающие мАт являются напрямую мечеными (например, Alexa-488, HRP и так далее). Обнаружение STn в образцах от мышей (например, собранных в исследованиях модели ксенотрансплантата, описанных в настоящем документе) и в образцах от людей (например, сывороточных образцах, полученных, как описано в настоящем документе) оценивают как с мышиными, так и с человеческими обнаруживающими антителами.

Пример 8. Анализ STn с использованием гуманизированных анти-STn антител.

Проводили анализ STn ELISA с использованием mSIA102 в качестве захватывающего антитела и hSIA102 или hSIA103 в качестве обнаруживающего антитела и с контрольным по изотипу человеческим IgG в качестве контрольного обнаруживающего антитела. Растворы, содержащие пять микрограмм на миллилитр (мкг/мл) захватывающего антитела, использовали для покрытия лунок планшетов для ELISA

в течение ночи. Планшеты промывали и блокировали, с последующей обработкой серийно разведенным муцином подчелюстных желез крупного рогатого скота (BSM) в диапазоне концентраций от 0 нМ до 6×10^{-8} нМ. BSM, связанный с аналитической поверхностью, обнаруживали с использованием обнаруживающего антитела в концентрации 3 мкг/мл. Конъюгированные с пероксидазой хрена антитела против иммуноглобулинов человека (0,08 мкг/мл) использовали для связывания обнаруживающих антител, и комплексы антитело-антиген обнаруживали при помощи субстрата HRP. Результаты показали, что гуманизированные анти-STn антитела способны обнаруживать связанный BSM с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}) для связывания антитела, составляющей 9×10^{-9} нМ для hSIA103 и 2×10^{-8} нМ для hSIA101. В случае контрольного по изотипу обнаруживающего антитела связывание отсутствовало.

Пример 9. Фармакокинетические исследования.

Антитела hSIA101 и hSIA102, оба конъюгированные с MMAE, вводили самкам бестимусных мышей в дозе 5 мг/кг (дозу определяли гравиметрически) внутривенной (в/в) инъекцией в хвостовую вену для оценки конечного элиминационного периода полувыведения антитела. Каждая группа состояла из 9 мышей. Кровь (сыворотку) собирали через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 168, 336 и 672 часа и использовали для расчета периода полувыведения антитела.

Оценку фармакокинетических (ФК) параметров проводили в конце исследования с использованием программы WINNONLIN® (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Площадь под кривой (AUC) оценивали с начала введения первой дозы до времени после введения последней поддающейся количественному определению наблюдаемой концентрации (AUC_{last}) и от начала исследования до бесконечности (AUC_{INF}). Также определяли максимальную наблюдаемую концентрацию в плазме (C_{max}), наблюдаемый клиренс (CL), конечный элиминационный период полувыведения (HL), равновесный объем распределения (V_{ss}) и объем распределения в конечной фазе (V_z). ФК параметры рассчитывали с использованием некомпартментного анализа с разреженной выборкой. Результаты приведены в табл. 10.

Таблица 10

ФК параметры

Антитело	**C_{max} (мкг/мл)**	**AUC_{last} (сутки*мкг/мл)**	**AUC_{INF} (сутки*мкг/мл)**	**CL (мл/сутки/кг)**	**HL (сутки)**	**V_z (мл/кг)**	**Vss (мл/кг)**
hSIA101–MMAE	254	1050,00	1050,00	4,77	2,55	17,51	20,07
hSIA102–MMAE	285	1075,00	1079,17	4,63	3,77	25,16	23,57

В исследовании было определено, что hSIA101-MMAE имеет конечный элиминационный период полувыведения 2,55 суток, в то время как было определено, что hSIA102-MMAE имеет конечный элиминационный период полувыведения 3,77 суток. Эти значения были сопоставимы с теми, которые известны для других конъюгатов антитело-лекарственное (см., например, публикацию Leal, M. et al., 2015, Bioconjugate Chem, 26: 2223-32, в которой сообщается, что конечный элиминационный период полувыведения для анти-5T4 конъюгата антитело-лекарственное средство составляет 3,5 суток).

Пример 10. Получение линий клеток, избыточно экспрессирующих STn.

Стабилизированные линии раковых клеток генетически модифицируют для стабильной экспрессии STn, как описано в публикации Julien et al. (Mien, S. et al., 2005. Breast Cancer Res Treat. 90(1): 77-84). Клетки трансдуцируют лентивирусными векторами, доставляющими экспрессионные конструкты ST6GalNAc I (hST6GalNAc I pRc-CMV), или контрольным вектором (пустой вектор pRc-CMV). Стабильные трансфектанты отбирают в среде, содержащей генетицин 418 (G418, 1 мг/мл). Устойчивые клетки высевают в 96-луночные планшеты, используя стратегию серийных разведений, и субклонируют три раза, получая стабильные клональные линии. Клональные линии демонстрируют разные уровни экспрессии ST6GalNAc I [что определяют в анализе количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР)]. Линии клеток OVCAR3, стабильно экспрессирующих дополнительные количества STn (в сравнении с клетками дикого типа), называют клетками "OVCAR3-STn". Успешную экспрессию STn подтверждают в анализе проточной цитометрии с использованием анти-STn антител.

Пример 11. Получение линий клеток SKOV3 с повышенной экспрессией ST6GalNAc I.

Клетки SKOV3 трансдуцировали лентивирусными векторами, доставляющими экспрессионные конструкты ST6GalNAc I (hST6GalNAc I pRc-CMV). Были получены пулы стабильных клеток, и были выбраны 6 клонов с различными уровнями экспрессии ST6GalNAc I [что определяли в анализе количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР)] (смотри табл. 11).

Таблица 11
Уровни экспрессии ST6GalNAc I в выбранных клонах

Клон	Уровень экспрессии мРНК ST6GalNAc I (кратность уровня экспрессии относительно контроля)
Клон 7	165
Клон 8	105
Клон 10	15
Клон 13	125
Клон 15	20
Клон 16	30

Клоны 7, 8 и 13 демонстрировали самый высокий уровень мРНК ST6GalNAc I при сравнении с уровнями в линиях не трансдуцированных клеток.

Клоны SKOV3, не экспрессирующие (дикого типа), экспрессирующие на умеренном уровне (клон 15) и на высоком уровне (клон 13) STn, тестировали на чувствительность к обработке анти-STn антителами. Клетки культивировали и обрабатывали контрольным растворителем, hSIA101, hSIA101-MMAE, hSIA102 или hSIA102-MMAE в концентрациях 2,5 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 50 нМ и 100 нМ. Затем жизнеспособность клеток определяли в анализе MTT (EMD Millipore, Billerica, MA). Жизнеспособность клеток снижалась при обработке hSIA101-MMAE и hSIA102-MMAE во всех дозах в случае клеток, экспрессирующих на высоком уровне STn, и в дозах выше 2,5 нМ в случае клеток, экспрессирующих STn на умеренном уровне. Жизнеспособность клеток снижалась при обработке hSIA101-MMAE и hSIA102-MMAE во всех дозах в случае клеток, экспрессирующих на умеренных уровнях STn, и в дозах выше 5 нМ в случае клеток, экспрессирующих STn на умеренном уровне. На клетки, не экспрессирующие STn, hSIA101-MMAE и hSIA102-MMAE оказывали незначительный эффект, за исключением самой высокой используемой дозы. Данные результаты указывают на то, что чувствительность к обработке анти-STn антителами зависит от уровня экспрессии STn.

Пример 12. In vivo исследование ксенотрансплантатов, полученных из клеток линии OVCAR3, у мышей.

Мышиную модель подкожного ксенотрансплантата на бестимусных "голых" мышах получали, используя человеческие клетки OVCAR3 рака яичника. Животным вводили гуманизированный анти-STn ADC (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг), контрольный по изотипу ADC (1 мг/кг, 5 мг/кг), паклитаксел (20 мг/кг) или только растворитель. ADC вводили внутривенно один раз в неделю в течение четырех недель. Паклитаксел вводили внутрибрюшинно один раз в неделю в течение трех недель. Объем опухоли и массу тела измеряли в дни, указанные в табл. 12. Гуманизированный ADC вызывал значительное уменьшение объемов опухолей в сравнении с растворителем и контрольным по изотипу ADC (смотри табл. 12), хотя оказывал незначительное влияние на общую массу тела. Эти данные свидетельствуют о том, что анти-STn ADC не токсичны in vivo и эффективны для снижения объемов ксенотрансплантатов серозных опухолей яичника. После окончания исследования опухолевые ткани собирали и анализировали иммуногистохимическими методами на экспрессию STn. Опухолевые ткани от мышей, получавших анти-STn ADC, отличались сниженной экспрессией STn в сравнении с тканями животных, получавших другие препараты.

Таблица 12

Объем опухолей

Воздействие	**Средний объем опухолей ($мм^3$)**									
	День 1	**День 4**	**День 9**	**День 12**	**День 15**	**День 18**	**День 23**	**День 26**	**День 30**	**День 31**
Растворитель	161,8	242,8	373,5	539,1	678,4	803,1	987,1	1039,3	1175,6	1224,0
hSIA101–MMAE, 1 мг/кг	161,7	228,9	347,7	448,2	551,5	609,0	768,4	882,7	937,1	966,8
hSIA101–MMAE, 2,5 мг/кг	161,9	213,2	275,8	302,6	313,5	299,7	234,0	195,9	169,7	169,1
hSIA101–MMAE, 5 мг/кг	161,7	203,4	211,0	193,4	165,0	131,1	77,8	59,4	39,5	39,1
hSIA102–MMAE, 1 мг/кг	161,7	219,7	335,5	465,7	567,1	707,1	871,9	897,0	957,7	984,8
hSIA102–MMAE, 2,5 мг/кг	161,8	202,9	291,8	358,5	399,5	420,8	414,3	370,2	384,0	384,7
hSIA102–MMAE, 5 мг/кг	161,7	210,7	210,6	187,4	168,7	127,2	84,0	67,3	50,5	46,8
Изотип–MMAE, 1 мг/кг	161,1	222,1	312,6	368,8	423,1	468,3	510,6	472,5	531,4	548,2
Изотип–MMAE, 5 мг/кг	161,4	196,5	255,9	241,8	205,9	176,9	127,1	94,3	78,0	74,0
Паклитаксел, 20 мг/кг	161,2	210,0	370,0	482,3	620,4	767,4	971,6	1133,0	1277,8	1385,2

Пример 13. Экспрессия STn в образцах CRC пациентов.

Образцы от пациентов с первичным CRC анализировали методом проточной цитометрии с hSIA101 и двумя коммерческими антителами B72.3 и CC49. Все 10 протестированных образцов были STn-положительными. Результаты приведены в табл. 13. В таблице % STn выражен в виде % жизнеспособной популяции CD45-/CD34-. Экспрессию STn часто более надежно определяли при помощи hSIA101, чем при помощи коммерческих антител. Положительная по экспрессии популяция составляла 3-47%, при этом в метастатическом образце наблюдали наибольшую процентную долю положительных клеток. Это указывало на то, что анти-STn антитела могут быть использованы для идентификации STn-специфических популяций в опухолевых образцах.

Таблица 13
Экспрессия STn в образцах пациентов

Образец	Исходная ткань	Антитело	% STn+
160093–2	Толстая кишка	SIA201a	22,9
		B72.3	18,9
		CC49	17,1
160101–2	Толстая кишка	SIA201a	10
		B72.3	5,8
		CC49	5
160102–2	Толстая кишка	SIA201a	12,9
		B72.3	14,7
		CC49	11,4
160115–2	Толстая кишка	SIA201a	5,4
		B72.3	13
		CC49	5,7
160127–2	Толстая кишка	SIA201a	4,2
		B72.3	14,4
		CC49	3,5
160149–1	Толстая кишка	SIA201a	22,7
		B72.3	10,5
		CC49	9,8
160151–1	Толстая кишка	SIA201a	19,6
		B72.3	6,8
		CC49	11,5
169068–1	Толстая кишка	SIA201a	10,9
		B72.3	7,4
		CC49	8,4
1601666	Толстая кишка	SIA201a	29,4
		B72.3	17,3
		CC49	20,6
160104–2	Метастаз из толстой кишки в печень	SIA201a	47,8
		B72.3	46,6
		CC49	39,4

Пример 14. In vitro тестирование токсинов на линиях клеток CRC.

Исходя из результатов предварительных анализов методом проточной цитометрии, показавших, что примерно 60-70% общей клеточной популяции в линиях COLO205 и LS174T экспрессируют STn, проводят in vitro анализы для тестирования методов лечения на основе анти-STn антител. С учетом предварительных результатов для мышиных и гуманизированных анти-STn-MMAE ADC, проводят эксперименты для идентификации оптимальных токсинов/линкеров для анти-STn ADC с целью лечения колоректального рака. Резистентность 8 линий CRC (COLO205, LS174T, RKO, HT-29, LSI80 и SW403), а также линий клеток с модифицированной экспрессией STn [COLO205 STn-нокдаун, LS174T STn-нокдаун, RKO STn+ (избыточная экспрессия ST6GalNAc I) и HT-29 STn+ (избыточная экспрессия ST6GalNAc I)], имеющих разные уровни экспрессии STn, изучают с использованием панели из 10 обычных токсинов для ADC, включая ауристатины (MMAE и MMAF), майтанзины (DM4 и DM1), димеры пирролобензодиазепина (талирин и тезирин) и ингибиторы топоизомеразы (SN-38 и DXd), а также других природных средств (дуокармицин и аманитин). Чувствительность CRC определяют в сравнении со стандартным лечебным препаратом (иринотекан, также известный как CPT-11) и только растворителем для определения полумаксимальной ингибирующей (цитотоксической) концентрации (IC_{50}). Для выполнения этого, не конъюгированные токсины тестируют на линиях клеток CRC с различными уровнями эндогенной экспрессии STn, а также производных этих клеточных линий, в которых уровни экспрессии STn либо повышены, либо экспрессия отсутствует.

Нокдаун экспрессии STn в клетках COLO205 и LS174T выполняют с использованием направленной против ST6GalNAc I киРНК-сайленсера (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) методами, описанными в литературе (например, Gao et al., Nat Med. 2015 Nov; 21(11): 1318-25). Напротив, клетки RKO и HT-29 (экспрессирующие небольшие или не поддающиеся обнаружению количества STn) трансдуцируют лентивирусными векторами, доставляющими экспрессионные конструкты ST6GalNAc I, с получением кло-

нальных популяций клеток, экспрессирующих STn на повышенных уровнях. Генетически модифицированные клетки контролируют в отношении экспрессии STn на клеточной поверхности методами проточной цитометрии и вестерн-блот анализа, и уровни мРНК ST6GalNAc I контролируют методом кОТ-ПЦР. Не конъюгированные токсины добавляют к линиям клеток CRC, получая значения IC_{50} через 24, 48, 72 и 96 часов после инкубации для определения чувствительности. Набор для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® (Promega, Madison, WI) используют в соответствии с инструкциями производителя для оценки жизнеспособности клеток после обработки. Два токсина с желательными для ADC свойствами выбирают для конъюгации с антителом и дальнейшей характеризации.

Пример 15. Оценка анти-STn ADC в моделях CRC.

Два токсина конъюгируют с двумя выбранными гуманизированными анти-STn антителами, и используют анализы на связывание для подтверждения сохранения специфичности связывания с STn. Анализы на связывание (анализ на основе метода проточной цитометрии, ELISA и гликановых матриц) проводят, как описано ранее. Одно человеческое антитело изотипа IgG1 отдельно конъюгируют с каждым из двух токсинов и используют в качестве отрицательного контроля для связывания. Антитела к EGFR (клон LA22) и CEA (клон CD66e) используют в качестве положительных контролей для связывания с линиями клеток MDA-MB-231 и CRC, соответственно.

Анти-STn ADC тестируют с тремя линиями клеток CRC, описанными выше, на in vitro эффективность. Всего тестируют 8 вариантов условий, включая: анти-STn 1+токсин 1; анти-STn 1+токсин 2; анти-STn 2+токсин 1; анти-STn 2+токсин 2; изотип+токсин 1; изотип+токсин 2; стандартный препарат и растворитель. Анти-STn ADC оценивают в отношении их эффекта на жизнеспособность клеток и способность клеток к образованию колоний, используя анализы на жизнеспособность и анализы с ростом клеток в мягком агаре, соответственно. Анализы на жизнеспособность проводят с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® (Promega, Madison, WI). Относительную эффективность ADC рассчитывают в соответствии с инструкциями производителя, получая показатель жизнеспособности в процентах и значения IC_{50}. Проводят анализы на образование колоний, в которых клетки разбавляют в среде на основе метилцеллюлозы и выращивают при 37°C в течение 5-14 дней в присутствии ADC. Количество колоний подсчитывают и сравнивают. В обоих анализах тестируют анти-STn ADC в диапазоне концентраций и получают соответствующие значения IC_{50}. Результаты сравнивают с результатами для стандартно применяемого химиотерапевтического средства и контрольных по изотипу ADC. Выбирают два лучших ADC на основании данных по IC_{50} и информации об образовании колоний.

Оценивают TMA для ксенотрансплантации CRC в отношении экспрессии STn для идентификации двух STn-положительных моделей CRC для in vivo исследований. Панель состоит из 20 уникальных моделей, включающих модели для разных стадий, подтипов, генетического фона, а также отвечающие на лечение/резистентные модели. Экспрессию STn оценивают иммуногистохимическими (ИГХ) методами. TMA окрашивают двумя анти-STn антителами, контролем по изотипу и только вторичным антителом. ИГХ обнаружение проводят с использованием стратегии предварительного комплексообразования, когда антитело инкубируют с меченым биотином вторичным антителом против IgG человека, а затем инкубируют с тканью. Окрашивание оценивают в баллах для оценки специфического для мембран неопластических клеток окрашивания. Две модели ксенотрансплантатов CRC и один анти-STn ADC выбирают для in vivo исследований ксенотрансплантации.

Анти-STn ADC - кандидат оценивают в отношении in vivo эффективности в исследовании с множественными дозами одного лекарственного средства, используя две линии клеток и три концентрации доз (1, 2,5 и 5 мг/кг). Мышиные модели ксенотрансплантатов получают путем подкожной инъекции человеческих клеток CRC, экспрессирующих STn (то есть 5×106 клеток 1:1 (по объему) матригель), в правый бок мышам ICR SCID (~80 мышей). Когда у 60 мышей опухоли достигают среднего объема ~200 $мм^3$, животных рандомизируют в 6 групп (n=10 мышей на группу) с примерно одинаковыми средними размерами опухолей в группах. Животные в группах получают или анти-STn ADC (1, 2,5 или 5 мг/кг), контрольный по изотипу ADC (5 мг/кг), стандартный лечебный препарат (иринотекан 40 мг/кг), или растворитель (DPBS). Препараты вводят внутривенной инъекцией один раз в неделю в течение четырех недель на основании полученных ранее результатов ФК исследований анти-STn-MMAE ADC. Объем опухолей и массу тела измеряют дважды в неделю, и отдельных мышей умерщвляют, когда размер опухоли достигает намеченного конечного размера (>1500 мм) для группы контрольного растворителя, или когда мыши оказываются в предсмертном состоянии. Мышей из каждой группы оценивают в отношении экспрессии STn опухолью методами ИГХ и проточной цитометрии после завершения исследования.

На основании результатов данных исследований токсин/линкеры дополнительно оптимизируют для повышения in vivo и in vitro эффективности анти-STn ADC.

Пример 16. Выбор моделей CRC PDX.

Микропанели (TMA) опухолей CRC из полученных от пациентов опухолевых (PDX) клеток оценивают в отношении экспрессии STn с использованием гуманизированных анти-STn антител для определения восприимчивых моделей для исследований с PDX. Хорошо охарактеризованные коммерчески дос-

тупные фиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE) PDX TMA (CrownBio, Santa Clara, CA), включающие всего более 200 образцов, анализируют на экспрессию STn методами ИГХ. Эти TMA состоят из множества не подвергнутых лечению и резистентных к стандартному лечению моделей PDX, включая те, которые устойчивы к AP24534 [понатиниб, (ингибитор RET)], цетуксимабу, бевацизумабу (AVASTIN®), трастузумабу (HERCEPTIN®), сорафенибу, 5-фторурацилу, цисплатину, доцетакселу, гемцитабину, иринотекану или паклитакселу. TMA окрашивают не конъюгированным анти-STn антителом, контрольным по изотипу антителом или только вторичным антителом. Все проанализированные ИГХ методами TMA оценивают в баллах при микроскопическом исследовании "слепым" образом в отношении интенсивности окрашивания антителом, частоты и локализации окрашивания. Корреляции между экспрессией STn и прогрессированием CRC изучают и используют для выбора моделей.

На основании ИГХ данных 10 PDX выбирают для in vitro тестирования анти-STn ADC - кандидата. Эти 10 моделей PDX оценивают на предмет цитотоксичности и образования колоний в анализах на жизнеспособность и способность к образованию колоний, описанных ранее. В анализ включают контрольный ADC, три стандартных лечебных препарата (иринотекан, цетуксимаб и бевацизумаб, в виде отдельных средств) и контрольный растворитель. Три модели PDX [включая 1 устойчивую к стандартному лечебному препарату (SOC) модель PDX] выбирают для in vivo исследований на основании экспрессии STn и in vitro ответа на анти-STn ADC.

Пример 17. ФК исследования с введением одной дозы.

Перед проведением in vivo исследований анти-STn ADC - кандидат оценивают в отношении ФК свойств в in vivo исследовании на мышах с введением одной дозы. В этом исследовании с введением одной дозы используют два уровня доз (2,5 и 5 мг/кг) и 10 временных точек (0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 168, 336 и 672 часа после дозирования). Всего девять мышей включают в каждую группу введения препарата, с тремя подгруппами мышей для скользящего графика сбора образцов крови. В запланированные временные точки у мышей собирают образцы крови, и сыворотку собирают в пробирки для отделения сыворотки. Кровь оставляют сворачиваться в течение минимум 30 минут, с последующим центрифугированием (3500 об/мин в течение 10 мин при 5°C) в пределах 1 часа после сбора образцов. После центрифугирования сыворотку отделяют и используют в иммуноанализах для определения анти-STn ADC, присутствующего в сыворотке. Определяют конечный элиминационный период полувыведения (HL), площадь под кривой (AUC), максимальную наблюдаемую концентрацию в плазме (C_{max}), равновесный объем распределения (V_{ss}) и объем распределения в конечной фазе (V_z). ФК параметры используют для определения оптимального режима дозирования для in vivo исследований PDX.

Пример 18. Оценка in vivo эффективности в моделях PDX на мышах.

Исследования PDX на мышах проводят с использованием трех моделей PDX, идентифицированных при иммуногистохимическом анализе PDX TMA, для оценки in vivo эффективности анти-STn ADC - кандидатов в терапии одним средством. Мышам с PDX, рандомизированным в 6 групп (10 мышей на группу), вводят анти-STn ADC в дозе 1, 2,5 или 5 мг/кг, контрольный по изотипу ADC (5 мг/кг), стандартный лечебный препарат (иринотекан (40 мг/кг), цетуксимаб (10 мг/кг) или бевацизумаб (10 мг/кг)), или только растворитель. Дозы вводят животным один раз в неделю в течение четырех недель. Экспрессию STn определяют в начале исследования и после завершения исследования методами ИГХ и проточной цитометрии.

Пример 19. Комбинированное лечение в моделях PDX на мышах.

Анти-STn ADC - кандидаты оценивают для комбинированной терапии в сочетании со стандартным лечебным препаратом (SOC) в выбранной мышиной модели PDX, используя либо совместное, либо последовательное введение препаратов.

В случае совместного введения тестируют в общей сложности 9 групп лечения, с 10 мышами в группе, включая: только растворитель, анти-STn ADC (1 мг/кг), анти-STn ADC (5 мг/кг), только SOC, SOC+растворитель, SOC+анти-STn ADC (1 мг/кг), SOC+анти-STn ADC (5 мг/кг), SOC+не конъюгированные анти-STn (1 мг/кг) и SOC+не конъюгированные анти-STn (5 мг/кг). Дозы животным вводят еженедельно в течение четырех недель. Экспрессию STn в опухолях определяют в начале исследования и после завершения исследования методами ИГХ и проточной цитометрии.

В случае последовательного введения мыши сначала получают SOC. После лечения в течение четырех недель, или после уменьшения среднего размера опухолей до <25% от исходного объема опухолей, мышей рандомизируют в 6 групп следующим образом: анти-STn ADC (1 мг/кг), анти-STn ADC (5 мг/кг), не конъюгированные антитела (1 мг/кг), не конъюгированные антитела (5 мг/кг), один контрольный по изотипу ADC и контрольный растворитель. Дозы животным вводят еженедельно в течение четырех недель. Экспрессию STn в опухолях определяют в начале исследования и после завершения исследования методами ИГХ и проточной цитометрии.

Пример 20. Пилотное токсикологическое исследование с многократным введением доз.

Исследование с многократным введением доз проводили для оценки фармакокинетических характеристик и токсичности при введении hSIA101-MMAE яванским макакам. Исследования включали прижизненные оценки, такие как оценка смертности/заболеваемости, клинических наблюдений, массы тела,

потребления пищи, температуры тела, локального раздражения, офтальмологических признаков, а также оценки клинической патологии. В данных исследованиях использовали 9 самцов (возраст 2-4 года), по 3 обезьяны на группу лечения, смотри табл. 14.

Таблица 14

Группы лечения

Группа	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Концентрация дозы, (мг/мл)	Животных в группе
1	1	1,2	0,833	3
2	3	1,2	2,5	3
3	6	1,2	5	3

Животным во всех группах вводили дозы всего 2 раза внутривенной болюсной инъекцией, один раз в день 1 и вновь в день 22. Образцы крови собирали для фармакокинетических исследований в дни 1 и 22, используя следующую схему: до введения дозы (0), а затем через 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96 и 168 часов после дозирования. Дополнительные образцы крови собирали через 240, 336 и 504 часов после дозирования только в день 1 дозирования. Образцы крови собирали для оценки клинической патологии (клинической биохимии, гематологии и свертываемости крови) с использованием следующей схемы: до введения дозы (предварительное тестирование), в день 8, день 22 (перед введением второй дозы) и в день 29 перед проведением эвтаназии. Оценки клинических биохимических параметров включали оценку уровней натрия, креатинина, общего белка, калия, щелочной фосфатазы, триглицеридов, хлорида, аланинаминотрансферазы, общего билирубина, кальция, аспартатаминотрансферазы, альбумина, неорганического фосфора, глюкозы, глобулина, азота мочевины, холестерина и отношения альбумин/глобулин. Гематологические оценки включали оценку гематокрита, средней концентрации эритроцитарного гемоглобина, гемоглобина, количества ретикулоцитов (абсолютного и относительного), количества тромбоцитов, количества эритроцитов, среднего объема тромбоцитов, общего количества белых клеток крови, среднего количества эритроцитарного гемоглобина, дифференциального количества белых клеток крови (абсолютного и относительного), среднего эритроцитарного объема и относительной ширины распределения эритроцитов по объему. K3-ЭДТА использовали в качестве антикоагулянта. Оценки свертываемости крови включали оценку протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени. Эвтаназию всех групп животных проводили в день 29, и органы собирали для исследования.

Сыворотки из образцов крови субъектов использовали для фармакокинетической (ФК) оценки уровней человеческих IgG. ФК параметры оценивали с использованием программы Phoenix для анализа фармакокинетики (Certara, USA), используя некомпартментный подход, согласующийся с внутривенным болюсным путем введения. Все параметры получали из индивидуальных концентраций человеческих IgG в сыворотке, полученной в дни 1 и 22. Параметры оценивали с использованием номинальных моментов сбора образцов относительно конца введения каждой дозы. Концентрацию в момент времени ноль в день 1 обратно экстраполировали, исходя из первых двух наблюдаемых концентраций в сыворотке для целей оценки параметров. Образцы с не поддающимися количественной оценке значениями концентраций считали отсутствующими образцами.

Значения концентраций антитела в сыворотке, полученные относительно первой дозы, представлены на фиг. 2, и значения, полученные относительно второй дозы, представлены на фиг. 3. Площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) рассчитывали с использованием линейного метода трапеций с линейной/линейной интерполяцией. AUC не рассчитывали для ФК профилей с менее чем 3 поддающимися количественному определению концентрациями тестируемого вещества в отдельных временных точках. Когда это целесообразно, строили кривую зависимости конечной элиминационной фазы каждой концентрация от времени с использованием по меньшей мере последних трех наблюдаемых значений концентрации. Наклон кривой для конечной элиминационной фазы определяли с использованием логарифмической линейной регрессии на невзвешенных данных по концентрации. Средние значения со стандартным отклонением (SD; в скобках) приведены в табл. 15 и табл. 16. C_{max} представляет собой максимальную наблюдаемую концентрацию, измеренную после введения дозы.

AUC_{last} представляет собой площадь под кривой зависимости концентрации от времени от начала введения дозы до последней наблюдаемой поддающейся количественному определению концентрации с использованием линейного или линейного/логарифмического метода трапеций. $AUC_{0\text{-}7день}$ представляет собой то же самое, но без включения площади после дня 7. AUC_{INF} представляет собой площадь под кривой зависимости концентрации от времени с момента начала введения дозы до времени, экстраполированного до бесконечности. CL представляет собой кажущуюся скорость клиренса антитела из анализируемой матрицы. HL представляет собой кажущийся конечный период полувыведения. V_{ss} представляет собой кажущийся объем распределения в равновесном состоянии.

Таблица 15

ФК параметры, полученные после первой дозы

Доза (мг/кг)	C_{max} (мкг/мл) Среднее (SD)	AUC_{last} (сутки*мкг/мл) Среднее (SD)	$AUC_{0-7день}$ (сутки*мкг/мл) Среднее (SD)	AUC_{INF} (сутки*мкг/мл) Среднее (SD)	CL (мл/кг/сутки) Среднее (SD)	HL (сутки) Среднее (SD)	V_{ss} (мл/кг) Среднее (SD)
1	19,13 (1,78)	57,31 (7,5)	42,6 (0,96)	62,62 (7,81)	16,13 (1,96)	4,66 (1,43)	96,83 (17,29)
3	81,24 (11,17)	228,39 (25,02)	157,34 (4,94)	267,39 (56,39)	11,57 (2,52)	7,47 (3,91)	96,16 (30,64)
6	151,37 (20,97)	419,05 (50,18)	342,22 (32,58)	440,63 (28,26)	13,65 (0,86)	3,53 (051)	61,62 (10,98)

Таблица 16

ФК параметры, полученные после второй дозы

Доза (мг/кг)	C_{max} (мкг/мл); Среднее (SD)	AUC_{last} (сутки*мкг/мл) Среднее (SD)
1	22,16 (0,01)	41,59 (4,68)
3	75,27 (5,18)	145,48 (51,93)
6	117,23 (45–7)	172,36 (141,18)

В день 1 увеличение системной экспозиции человеческих IgG было линейным и пропорциональным дозе при дозах 1-6 мг/кг/дозу, с легкой тенденцией к более чем пропорциональности дозе. В день 22 увеличение системной экспозиции было нелинейным при дозах 1-6 мг/кг/дозу. Снижение системной экспозиции человеческих IgG, в терминах $AUC_{(0-t)}$, наблюдали при сравнении дня 1 и дня 22, с увеличением при увеличении уровня дозы.

Животных, выживших до дня 29, подвергали эвтаназии и проводили некропсию. Ткани, необходимые для микроскопического анализа, измельчали, обрабатывали обычным образом, заливали парафином и окрашивали гематоксилином и оэзином с последующим изучением под световым микроскопом.

Не были обнаружены никакие связанные с лекарственным средством серьезные патологии. Наблюдаемые серьезные патологии были сочтены случайными, часто наблюдаемыми у яванских макак этой линии и в этом возрасте; и/или встречались с примерно одинаковой частотой у контрольных и получавших препарат животных, вследствие чего были сочтены не связанными с введением антитела. У животных в исследовании не наблюдали потерю массы тела или гибель, и во всех исследуемых органах отсутствовали серьезные патологии. Гистопатологические изменения были ограничены костным мозгом, этот эффект связан с MMAE. Наблюдали минимальное или слабое уменьшение насыщенности клетками и умеренное снижение соотношения миелоидных и эритроидных клеток. Изменения гематологических параметров (то есть умеренная нейтропения) соответствовали изменениям, наблюдаемым в случае других конъюгатов антитело-лекарственное средство с MMAE, и не рассматривались, как связанные с мишенью. И наконец, все результаты клинической биохимии оставались нормальными на всем протяжении исследования.

Пример 21. Получение линии клеток.

Для производства антител для клинического применения получают стабильную линию клеток яичника китайского хомяка (CHO) при помощи набора GIBCO® FREEDOM® CHO-S® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Клетки CHO-S трансфицируют конструктом, содержащим гены, кодирующие гуманизированное анти-STn антитело. Отбирают стабильные клоны с использованием двухфазной схемы селекции. Клоны с высоким уровнем продуцирования отбирают для дальнейшей характеризации. Стабильную линию клеток трансфицируют в условиях, соответствующих требованиям Надлежащей производственной практики (GMP), с получением антител для токсикологического тестирования в соответствии с требованиями GLP и для проведения фазы I клинического испытания.

Пример 22. Исследования тканевой перекрестной реактивности.

Исследования тканевой перекрестной реактивности проводили для оценки профиля связывания (как целевого, так и, потенциально, нецелевого связывания) с тканями человека и соответствующих биологических видов, используемых в доклинических исследованиях безопасности. Гуманизированные анти-STn антитела исследовали в отношении связывания с панелью нормальных тканей человека, крысы, мыши и яванского макака. Исследование проводили на срезах 10 нормальных замороженных тканей: сердца, головного мозга, почки, желудка, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, печени, поджелу-

дочной железы, селезенки и костного мозга, используя дозы 1-3 мкг/мл. Положительным контролем служило новообразование поджелудочной железы человека, содержащее STn-положительные раковые клетки, и отрицательным контролем служили нормальные стромальные клетки, содержащиеся в том же образце. Окрашивание всех нормальных тканей было ограничено цитоплазмой. Были проведены дополнительные анализы без первичного антитела или с использованием контрольных по изотипу IgG в качестве отрицательного контроля.

Из всех протестированных антител, hSIA101 имело самую низкую перекрестную реактивность с нормальными человеческими тканями. Умеренную активность связывания наблюдали в случае сосудов тканей сердца, эпителиальных клеток желудка, эпителиальных клеток тонкого кишечника и сосудов селезенки. Было обнаружено, что антитела также перекрестно реагируют с аналогичными видами тканей яванского макака (смотри табл. 17) и крысы (не показано). В таблице: 1+ = слабое окрашивание; 2+ = умеренное окрашивание; 3+ = сильное окрашивание; 4+ = интенсивное окрашивание; отр. = отрицательное; част. = частое (окрашивание в >75-100% клеток); эпи. = эпизодическое (окрашивание в >25-50% клеток) и редк. означает окрашивание в 1-5% клеток.

Таблица 17

Результаты исследования тканевой перекрестной реактивности

Ткань	**Человек**	**Яванский макак**
Сосуды сердца	2+ редк. (цитоплазма)	отр.
Эпителиальные клетки желудка	2–3+ част. (цитоплазма)	2–3+ эпи. (цитоплазма)
Сосуды желудка	отр.	2+ эпи. (цитоплазма)
Эпителий легкого	отр.	2–3+ част. (цитоплазма)
Эпителиальные клетки тонкого кишечника	2–4+ част. (цитоплазма)	3–4+ част. (цитоплазма)
Эпителиальные клетки толстой кишки	1+ част. (цитоплазма)	отр.
Сосуды толстой кишки	отр.	4+ част. (цитоплазма)
Сосуды поджелудочной железы	отр.	2–3+ част. (цитоплазма)
Сосуды селезенки	2–3+ част. (цитоплазма)	отр.

Окрашивание не наблюдали на клеточных мембранах ни в одной из тканей. Полушария головного мозга, мозжечок, почки и печень не окрашивались. При использовании контроля по изотипу и только вторичного антитела окрашивание отсутствовало, при этом только в ткани положительного контроля (новообразование поджелудочной железы) наблюдали сильное окрашивание мембран hSIA101.

Пример 23. Сравнение лечения анти-STn антителом и лечения цисплатином в модели PDX опухоли яичника.

Анти-STn ADC - кандидаты сравнивали со стандартным лечебным препаратом (SOC) в модели ксенотрансплантата опухоли с использованием человеческих, полученных от пациента, опухолей рака яичника от двух разных пациентов. Ранее методами иммуногистохимического окрашивания было подтверждено, что клетки в образцах от пациентов экспрессируют STn; и опухоли от одного из пациентов, ранее не подвергавшиеся лечению химиотерапевтическими средствами (без химио) и опухоли от пациента, ранее получавшего химиотерапию, были имплантированы бестимусным "голым" мышам с иммунодефицитом. Мышей с успешно растущими опухолями отбирали, и вводили им антитела (дозу 5 мг/кг) еженедельной в/в инъекцией; цисплатин (дозу 3 мг/кг) еженедельной внутрибрюшинной инъекцией (ограничение 3 дозы); или контрольный растворитель. Вводимые антитела включали hSIA101, hSIA101-ADC (конъюгат с MMAE) или контрольный по изотипу конъюгат IgG с MMAE (изотип-ADC). Мыши с опухолями "без химио" получали лечение антителами в течение 4 недель, в то время как мыши с устойчивыми к химиотерапии опухолями получали лечение антителом в течение 6 недель. Объем опухолей у мышей, получавших hSIA101-ADC или изотип-ADC, контролировали в течение 4-5 недель после завершения лечения для оценки регрессии опухолей.

Объемы цисплатин-чувствительных (фиг. 4, верхняя панель) и цисплатин-резистентных (Фиг. 4, нижняя панель) опухолей измеряли с течением времени. Введение hSIA101-ADC привело к наиболее эффективному уменьшению объема опухоли в сравнении с другими видами воздействия. Опухоли, полученные из цисплатин-резистентных клеток, были значительно уменьшены в размерах при введении hSIA101-ADC, в сравнении с введением цисплатина (фиг. 4, нижняя панель). Соответственно, введение hSIA101-ADC может быть использовано для эффективного лечения цисплатин-чувствительных и цисплатин-резистентных опухолей. Интересно, что, у 75% мышей "без химио", получавших лечение hSIA101-ADC, полностью исчезли опухоли через четыре недели после завершения лечения, при этом регрессию опухолей более 50% наблюдали у 75% мышей с устойчивыми к химиотерапии опухолями через 5 недель после завершения лечения hSIA101-ADC.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, резистентного к лечению соединениями платины, у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), где рак, резистентный к лечению соединениями платины, (i) выбирают из рака молочной железы, меланомы, рака толстой кишки, рака печени, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака желудка и рака предстательной железы, (ii) является резистентным к цисплатину или оксалиплатину, или (iii) является раком яичников и резистентным к цисплатину, и указанный ADC содержит:

a) анти-STn антитело, где указанное анти-STn антитело содержит:

1) вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и вариабельный домен легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8;

2) VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10; или

3) VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12; и

b) цитотоксическое средство, конъюгированное с анти-STn-антителом.

2. Способ по п.1, где указанное цитотоксическое средство выбирают из ауристатина, майтанзина, тубулизина, алкалоида барвинка, димера пирролобензодиазепина, камптотецина, дуокармицина, аманитина, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и ингибитора митоген-активируемой протеинкиназы (MEK).

3. Способ по п.1 или 2, где указанное цитотоксическое средство конъюгировано с анти-STn антителом при помощи линкера.

4. Способ по п.3, где линкер является расщепляемым линкером.

5. Способ по п.3 или 4, где указанный линкер содержит один или более полимеров, выбранных из поли(этиленгликоля) (PEG), поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламида) (полиHPMA), поли(α-аминокислоты), углеводного полимера, гликополисахарида, гликолипида, гликоконъюгата, полиглицерина, поливинилового спирта, поли(акриловой кислоты), поликеталя, полиацеталя и поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаля) (PHF).

6. Способ по любому из пп.3-5, где линкер содержит валин-цитруллин.

7. Способ по любому из пп.1-6, где анти-STn антитело содержит VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

8. Способ по любому из пп.1-7, где рак, резистентный к лечению соединениями платины, является раком яичников и резистентным к цисплатину.

9. Способ по любому из пп.1-7, где рак, резистентный к лечению соединениями платины, является раком толстой кишки.

10. Способ по п.9, где указанный колоректальный рак является резистентным к лечению по меньшей мере одним из цетуксимаба, панитумумаба, бевацизумаба, рамуцирумаба, трастузумаба, понатиниба, сорафениба, 5-фторурацила, доцетаксела, гемцитабина, иринотекана или паклитаксела.

11. Способ по любому из пп.1-10, где цитотоксическое средство содержит MMAE.

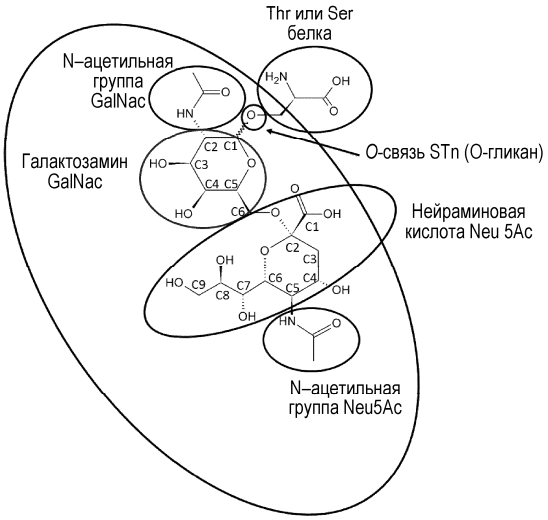
12. Способ по любому из пп.1-11, где анти-STn антитело содержит VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и цитотоксическое средство содержит MMAE.

13. Способ по любому из пп.1-12, где ADC вводят в дозе от 1 до 6 мг/кг.

Специфичность связывания STn

(Группа 1)

Обнаруженный эпитоп (наибольший эллипс)

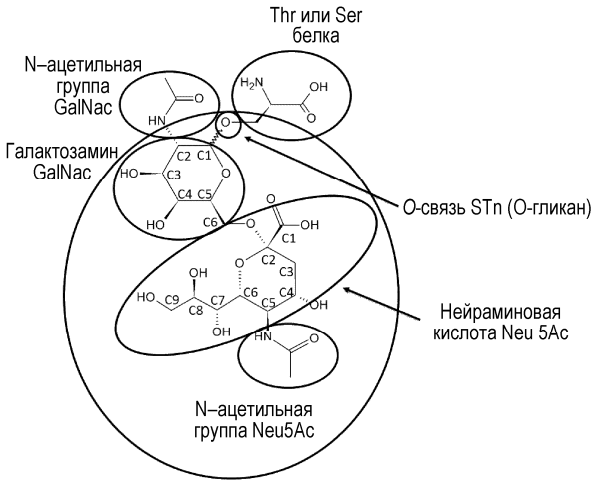


Фиг. 1A

Специфичность связывания STn

(Группа 2)

Обнаруженный эпитоп (наибольший эллипс)

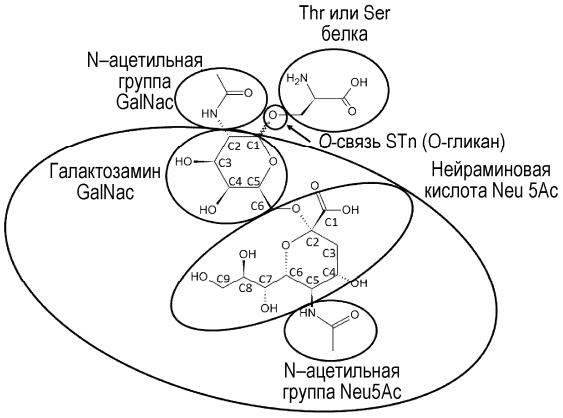


Фиг. 1B

Специфичность связывания STn

(Группа 3)

Обнаруженный эпитоп (наибольший эллипс)

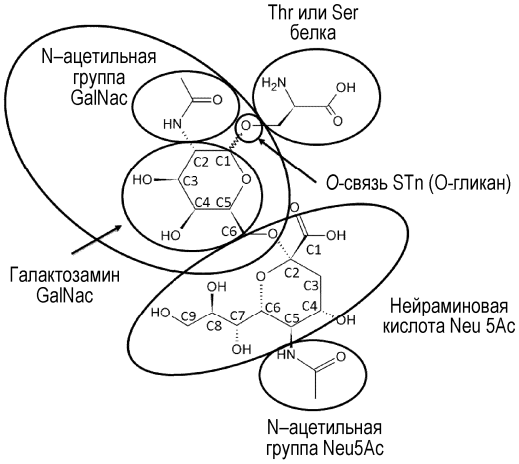


Фиг. 1C

Специфичность связывания STn

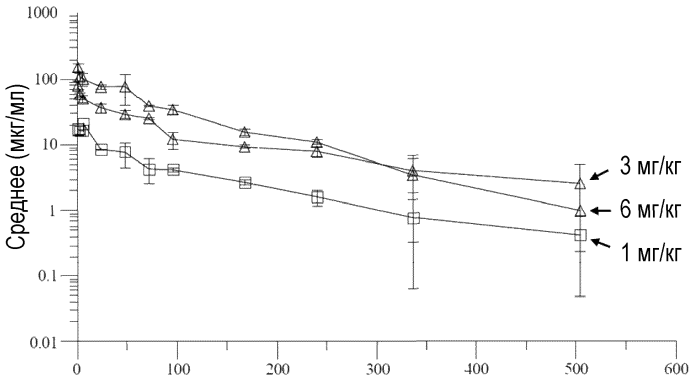
(Группа 4)

Обнаруженный эпитоп (наибольший эллипс)



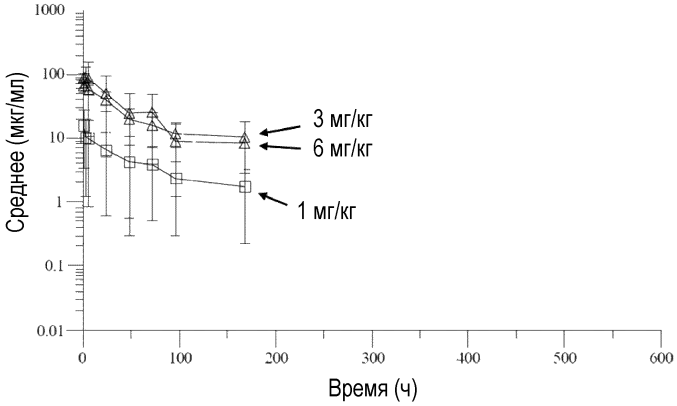
Фиг. 1D

Концентрации антитела в сыворотке после введения в день 1

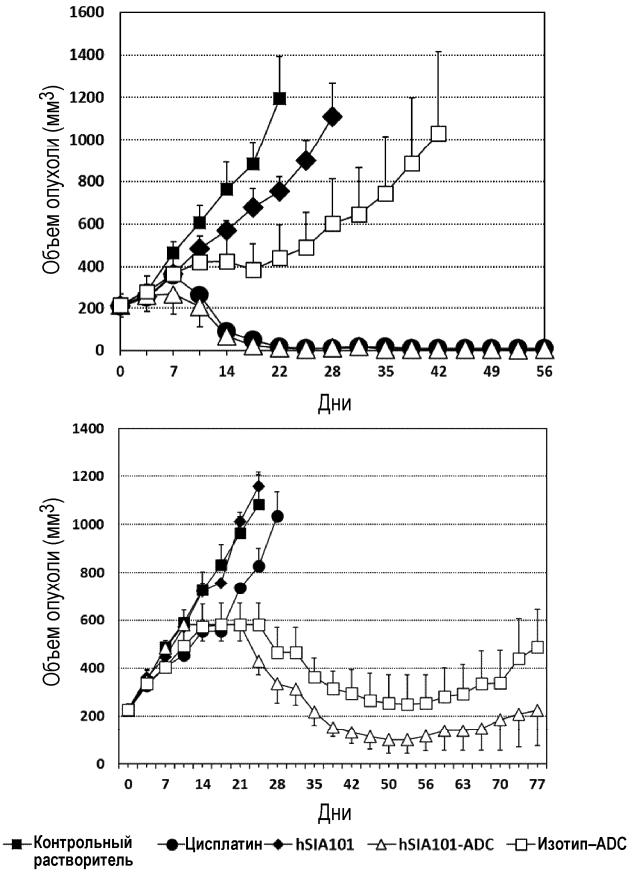


Фиг. 2

Концентрации антитела в сыворотке после введения в день 22



Фиг. 3



Фиг. 4