

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390346 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.22

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.15

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ MUC1-C/ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА MUC1-C (MUC1-C/ECD)

(31) 63/052,599

(72) Изобретатель:

(32) 2020.07.16

Кхарбанда Сарендер, Куфе Дональд В.
(US)

(33) US

(86) PCT/US2021/070881

(74) Представитель:

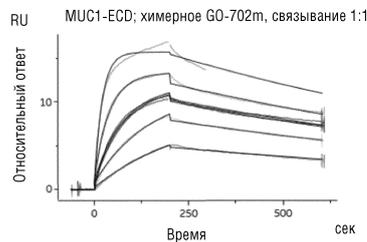
(87) WO 2022/016190 2022.01.20

Медведев В.Н. (RU)

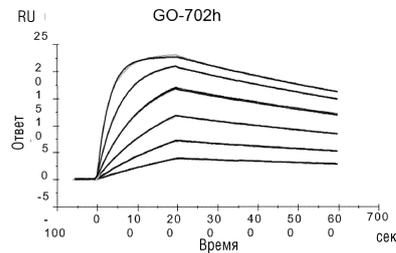
(71) Заявитель:

ДАНА-ФАРБЕР КЭНСЕР
ИНСТИТЮТ, ИНК.; ДЖЕНУС
ОНКОЛОДЖИ, ЭлЭлСи (US)

(57) Настоящее изобретение направлено на антитела, связывающиеся с MUC1-C/внеклеточным доменом (MUC1-C/ECD), и способы применения таких антител для лечения злокачественных опухолей, которые экспрессируют антиген MUC1.



Лиганд	Аналит	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
Химерный IgG	MUC1-SEA-NIS	9.43E+05	8.55E-04	9.06E-10	15.8	5.18E-02



Лиганд	Аналит	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
Химерный IgG		5.93E+05	3.85E-04	6.49E-10	31.5	0.0218
GO-702h		5.45E+05	8.44E-04	1.55E-09	23.21	0.0103

A1

202390346

202390346

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577183EA/23

АНТИТЕЛА ПРОТИВ MUC1-С/ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА MUC1-С (MUC1-С/ECD)

Настоящая заявка испрашивает преимущества приоритета по предварительной заявке на патент США 63/052,599, поданной 16 июля 2020 года, все содержание которой настоящим включено посредством отсылки.

Список последовательностей, который содержится в файле под именем GENUP0047WO_ST25.txt, который имеет размер 39 КБ (согласно измерению в Microsoft Windows®) и был создан 6 июля 2021 года, подан вместе с настоящим документом в электронной форме и включен в настоящий документ посредством отсылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к областям медицины, онкологии и иммунотерапевтических средств. В частности, оно относится к разработке иммунореагентов для применения в обнаружении и лечении MUC1-положительных злокачественных опухолей.

2. Уровень техники

Муцины представляют собой обильно О-гликозилированные белки, которые преимущественно экспрессируются эпителиальными клетками. Секретируемые и мембраносвязанные муцины формируют физический барьер, который защищает апикальные границы эпителиальных клеток от повреждений, вызываемых токсинами, микроорганизмами и другими формами стресса, которые возникают на границе с внешней средой. Трансмембранный муцин 1 (MUC1) также может передавать сигнал внутрь клетки посредством своего цитоплазматического домена. MUC1 не обнаруживает сходства с последовательностями других мембраносвязанных муцинов за исключением присутствия домена белка спермы морского ежа-энтерокиназы-агрина (SEA) (Duraisamy et al., 2006). В этой связи MUC1 транслируется как единый полипептид, а затем подвергается авторасщеплению по SEA-домену (Macao et al., 2006).

MUC1 был глубоко изучен авторами изобретения и другими исследователями на предмет его роли при раке. Как обсуждалось выше, человеческий MUC1 представляет собой гетеродимерный гликопротеин, транслируемый в виде единого полипептида и расщепляющийся на N- и C-концевые субъединицы (MUC1-N и MUC1-C) в эндоплазматическом ретикулуме (Ligtenberg et al., 1992; Macao et al., 2006; Levitin et al., 2005). Абберрантная оверэкспрессия MUC1, обнаруженная в большинстве карцином человека (Kufe et al., 1984), обуславливает независимый от прикрепления клеток рост и туморогенность (Li et al., 2003a; Huang et al., 2003; Schroeder et al., 2004; Huang et al., 2005). Другие исследования продемонстрировали, что оверэкспрессия MUC1 придает устойчивость к апоптозу, вызванному окислительным стрессом, и генотоксичным противоопухолевым средствам (Yin and Kufe, 2003; Ren et al., 2004; Raina et al., 2004; Yin

et al., 2004; Raina et al., 2006; Yin et al., 2007).

Семейство связанных и секретируемых муцинов функционирует, обеспечивая защитный барьер поверхности эпителиальных клеток. При повреждении эпителиального слоя плотные контакты между соседними клетками нарушаются, и теряется полярность, поскольку клетки запускают индуцируемую херегулином программу восстановления (Vermeer et al., 2003). MUC1-N сбрасывается с поверхности клеток (Abe and Kufe, 1989), оставляя MUC1-C функционировать в качестве передатчика стрессовых сигналов из окружения в клетку. В этом отношении MUC1-C образует комплексы на клеточной поверхности с членами семейства рецепторов ErbB, а MUC1-C направляется в ядро в ответ на стимуляцию херегулином (Li et al., 2001; Li et al., 2003c). MUC1-C также участвует в интеграции сигнальных путей рецептора ErbB и Wnt посредством прямых взаимодействий между цитоплазматическим доменом MUC1 (CD) и членами семейства катенинов (Huang et al., 2005; Li et al., 2003c; Yamamoto et al., 1997; Li et al., 1998; Li et al., 2001; Li and Kufe, 2001). В других исследованиях было показано, что MUC1-CD фосфорилируется киназой гликогенсинтазы 3β , c-Src, протеинкиназой C δ и c-Abl (Raina et al., 2006; Li et al., 1998; Li et al., 2001); Ren et al., 2002). Ингибирование любого из вышеперечисленных взаимодействий представляет потенциальную точку терапевтического вмешательства при злокачественных опухолях, связанных с MUC1.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложено антитело или фрагмент, который селективно связывается с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным SEQ ID NO: 1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно. Антитело или его фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19, и переменную область легкой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или может включать переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27, и переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно.

Антитело может быть одноцепочечным антителом, однодоменным антителом, биспецифичным антителом или химерным антителом. Фрагментом антитела может Fab-фрагмент. Антитело или его фрагмент могут быть рекомбинантным антителом или его фрагментом, обладающим специфичностью в отношении MUC1-C/ECD и определенного поверхностный антигена раковой клетки. Антитело может быть мышинным антителом, IgG, гуманизированным антителом или гуманизированным IgG антителом. Антитело или его фрагмент могут дополнительно включать метку. Метка может быть пептидной

меткой, ферментом, магнитной частицей, хромофором, флуоресцентной молекулой, хемилюминесцентной молекулой или красителем. Антитело или его фрагмент могут дополнительно включать противоопухолевое средство, присоединенное к ним, например, где противоопухолевое средство соединено с указанным антителом или его фрагментом через фотолабильный линкер, или указанное противоопухолевое средство связано с указанным антителом или его фрагментом через ферментативно расщепляемый линкер. Противоопухолевое средство может быть токсином, радиоизотопом, цитокином или ферментом.

Тяжелые и легкие цепи могут обладать 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно. Антитело или его фрагмент могут быть конъюгированы с наночастицей или липосомой. Антитело или его фрагмент могут вызывать гибель клетки и включают антителозависимую клеточную цитотоксичность или комплемент-опосредованную цитотоксичность.

Также предложен способ лечения рака, включающий контакт MUC1-положительной раковой клетки у субъекта с антителом или его фрагментом, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно. Антитело или его фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19, и переменную область легкой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или могут включать переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27, и переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно.

Антитело может быть одноцепочечным антителом, однодоменным антителом, биспецифичным антителом или химерным антителом. Фрагментом антитела может Fab-фрагмент. Антитело или его фрагмент могут быть рекомбинантным антителом или его фрагментом, обладающим специфичностью в отношении MUC1-C/ECD и определенного поверхностного антигена раковой клетки. Антитело может быть мышиным антителом, IgG, гуманизированным антителом или гуманизированным IgG антителом. Антитело или его фрагмент могут дополнительно включать метку. Метка может быть пептидной меткой, ферментом, магнитной частицей, хромофором, флуоресцентной молекулой, хемилюминесцентной молекулой или красителем. Антитело или его фрагмент могут

дополнительно включать противоопухолевое средство, присоединенное к ним, например, где противоопухолевое средство соединено с указанным антителом или его фрагментом через фотолabileный линкер, или указанное противоопухолевое средство соединено с указанным антителом или его фрагментом через ферментативно расщепляемый линкер. Противоопухолевое средство может быть токсином, радиоизотопом, цитокином или ферментом.

Тяжелые и легкие цепи могут обладать 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно. Антитело или его фрагмент могут быть конъюгированы с наночастицей или липосомой. Антитело или его фрагмент могут вызывать гибель клетки и включают антителозависимую клеточную цитотоксичность или комплемент-опосредованную цитотоксичность.

MUC1-положительная раковая клетка может быть клеткой солидной опухоли, такой как клетка рака легкого, клетка рака головного мозга, клетка рака головы и шеи, клетка рака молочной железы, клетка рака кожи, клетка рака печени (такого как гепатоцеллюлярная карцинома), клетка рака поджелудочной железы, клетка рака желудка, клетка рака толстой кишки, клетка рака прямой кишки, клетка рака матки, клетка рака шейки матки, клетка рака яичника, раковая клетка яичка, клетка рака кожи или клетка рака пищевода. MUC1-положительная раковая клетка может быть лейкозом или миеломой, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома. MUC1-положительная раковая клетка может быть метастатической раковой клеткой, раковой клеткой с множественной лекарственной резистентностью или рецидивировавшей раковой клеткой.

Способ может дополнительно включать контакт указанной MUC1-положительной раковой клетки со вторым противоопухолевым средством или терапией, такой как химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, гормональная терапия или токсинотерапия. Второе противоопухолевое средство или терапия могут ингибировать внутриклеточную функцию MUC1. Второе противоопухолевое средство или терапию могут применять одновременно с указанным первым средством или применять до и/или после указанного первого средства.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения рака, ассоциированного с вирусом папилломы человека, такого как рак шейки матки, или ассоциированного с *H. pylori*, такого как рак желудка, включающий введение субъекту антитела или его фрагмента, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения воспалительного заболевания, включающий введение субъекту антитела или его фрагмента, которые

селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе. Такие воспалительные заболевания включают острые и хронические воспалительные заболевания, такие как колит, ВЗК и ИЛФ. Воспалительные заболевания также могут включать бактериальные, вирусные, грибковые и паразитарные инфекции, такие как SARS-Cov-2, вирус папилломы человека и *H. pylori*.

Также предложен способ диагностики MUC1-положительного рака у субъекта, включающий контакт субъекта или содержащего клетку образца, полученного у субъекта, с антителом или его фрагментом, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе. MUC1-положительный рак может быть злокачественной солидной опухолью, такой как рак легкого, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак кожи, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак матки, рак шейки матки, рак яичника, рак яичка, рак кожи или рак пищевода. MUC1-положительный рак может быть лейкозом или миеломой, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома. MUC1-положительный рак может представлять собой гепатоцеллюлярную карциному или рак шейки матки, вызванный вирусом папилломы человека.

Способ может дополнительно включать введение указанному субъекту противоопухолевого средства или терапии, такой как химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, гормональная терапия или токсинотерапия, включающих антитело или его фрагмент, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе. MUC1-положительный рак может представлять собой метастатический рак, рак с множественной лекарственной резистентностью или рецидивирующий рак. Содержащий клетку образец может быть образцом солидной ткани, таким как образец биопсии, или образцом жидкости, такой как моча, сперма, мокрота, слюна, аспират из соска или кровь.

Другие варианты осуществления включают: (а) фармацевтический состав, включающий антитело или его фрагмент, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определенным в SEQ ID NO: 1, как определено в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, буфер или разбавитель. Фармацевтический состав может быть далее определен как вакцинный состав, необязательно дополнительно включающий адъювант, или иммуногистохимический реагент или радиовизуализационное вещество. Состав может дополнительно включать дополнительное терапевтическое средство.

В другом варианте осуществления предложен слитый белок, включающий: (i) первое одноцепочечное антитело, которое селективно связывается с MUC1-C/внеклеточным доменом (ECD), определенным в SEQ ID NO:1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи,

включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно; и (ii) второе одноцепочечное антитело, которое связывается с Т или В-клеткой. Второе одноцепочечное антитело может связываться с CD3, CD16, PD1, PD-L1, CD33, Her-2, EGFR, CTLA-4, OX40, FcγRI (CD64), FcγRIIIa (CD16A), FcαRI (CD89), CD163, CD68, CD89 мАт. Слитый белок может дополнительно включать метку или терапевтическую молекулу. Тяжелые и легкие цепи могут обладать 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или кодироваться нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно.

В еще одном варианте осуществления предложен химерный антигенный рецептор, включающий: (i) эктодомен, включающий переменную область одноцепочечного антитела, которое селективно связывается с MUC1-С/внеклеточным доменом (MUC1-С/ECD), определенным в SEQ ID NO:1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно, с гибкой шарнирной областью, присоединенной на С-конец указанной переменной области одноцепочечного антитела; (ii) трансмембранный домен; и (iii) эндодомен, где указанный эндодомен включает функцию сигнальной трансдукции, когда указанная переменная область одноцепочечного антитела связана с MUC1. Трансмембранные домены и эндодомены могут происходить из одной и той же молекулы. Эндодомен может включать CD3-дзета домен или высокоаффинный FcεRI. Гибкая шарнирная область может происходить из CD8α или Ig. Тяжелые и легкие цепи могут обладать 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26, соответственно, или могут обладать 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно.

Кроме того, предложена клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, как описано выше. Трансмембранный домен и эндодомен могут происходить из одной и той же молекулы. Эндодомен может включать CD3-дзета домен или высокоаффинный FcεRI. Гибкая шарнирная область может происходить из CD8α или Ig.

Предполагается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы с учетом любого другого способа или композиции, описанных в настоящем документе.

Использование форм единственного числа "а" или "an" в сочетании с термином "включающий" в формуле и/или описании изобретения может означать "один", но также согласуется со значением "один или больше", "по меньшей мере один" и "один или больше одного". Слово "приблизительно" означает плюс-минус 5% от указанного числа.

Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что

подробное описание и конкретные примеры, не смотря на то, что в них указаны конкретные варианты осуществления изобретения, приведены лишь в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в рамках сущности и объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области на основе этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующие чертежи являются частью настоящего описания и включены, чтобы дополнительно продемонстрировать некоторые аспекты настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше понято при обращении к одному или больше из этих чертежей в сочетании с подробным описанием определенных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

ФИГ. 1A-D. Последовательности антител. (ФИГ. 1A) последовательности GO-701m. (ФИГ. 1B) последовательности GO-702m. (ФИГ. 1C) аминокислотные последовательности GO-702h. (ФИГ. 1D) последовательности нуклеиновых кислот GO-702h.

ФИГ. 2. Измерение аффинности химерного антитела и гуманизированного антитела. Ответы в реальном времени показаны на кривых. Кривые, подобранные по экспериментальным данным ViaCore в соответствии с моделью взаимодействия 1:1, показаны черным цветом. Концентрации антигена, используемые для верхней панели, составляли 3,125 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ, соответственно. Концентрации антигена, используемые для нижней панели, составляли 1,875 нМ, 3,75 нМ, 7,5 нМ, 15 нМ, 30 нМ, 60 нМ, соответственно.

ФИГ. 3. Результаты электрофореза в ДСН-ПААГ выбранного антитела в невозстанавливающих условиях. Восстанавливающие условия: Дорожка М (маркер); Дорожка 1 (VH1+VL3); Дорожка 3 (VH1+VL4); Дорожка 5 (VH2+VL3); Дорожка 7 (VH5+VL1); Дорожка 9 (VH5+VL2); Дорожка 11 (VH5+VL3); Дорожка 13 (VH5+VH4). Несокращение условий: Дорожка 2 (VH1+VL3); Дорожка 4 (VH1+VL4); Дорожка 6 (VH2+VL3); Дорожка 8 (VH5+VL1); Дорожка 10 (VH5+VL2); Дорожка 12 (VH5+VL3); Дорожка 14 (VH5+VH4); Дорожка 15 (мышинный IgG).

ФИГ. 4. Измерение аффинности химерного IgG и гуманизированных IgG. Ответы в реальном времени показаны в виде цветных кривых. Кривые, подобранные по экспериментальным данным ViaCore в соответствии с моделью взаимодействия 1:1, показаны черным цветом. Концентрации антигена составляли 1,875 нМ, 3,75 нМ, 7,5 нМ, 15 нМ, 30 нМ, 60 нМ, соответственно.

ФИГ. 5. Сравнение аффинности химерного IgG и гуманизированных IgG с помощью проточной цитометрии. Антитела инкубировали с клетками HCT116/MUC1, а затем инкубировали с вторичными антителами. Связывание исследовали с помощью проточной цитометрии.

ФИГ. 6. Зависимое от концентрации связывание mAb с HCT116/MUC1. Дикий тип и афукозилированные (AF) формы и GO-702m и GO-702m/hFc химеры, которая

содержит Fc из IgG1 человека, инкубировали с клетками при различных концентрациях (как показано выше) с последующим инкубированием с Бiotин-+Стрептавидин-ФЭ-конъюгатом против hIgG или ФИТЦ-конъюгатом против мышинового IgGk в качестве вторичных реагентов. Эффективность связывания была представлена как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации.

ФИГ. 7. Неокрашенные клетки, используемые в качестве отрицательного контроля для ФИГ. 6.

ФИГ. 8А-В. GO-702m направленно взаимодействует с альфа-4 спиралью. (ФИГ. 8А) ак последовательности 58-ак внеклеточных доменов MUC1-С человека (SEQ ID NO: 2), яванского макака (SEQ ID NO: 38) и Muc1-С мыши (SEQ ID NO: 39). Спирали $\alpha 3$ и $\alpha 4$ подчеркнуты. Локализация эпитопа МАт GO-702m в $\alpha 4$ спирали, как показано с помощью ЯМР-спектроскопии гетеродимера p62/p58 (Macao et al., 2006). (ФИГ. 8В) Указанные концентрации МАт GO-702m инкубировали с клетками НСТ116/vector или НСТ116/MUC1. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) определяли с помощью проточной цитометрии. Связывание МАт GO-702m (средний столбик в каждом наборе столбцов) согласно ИФА с WT p58/p62 гетеродимером и S33A, R34G, Y35A, N36A мутантных белков с альфа-4 спиралью или D19E/V20A/T22A мутантных белков с альфа-3 спиралью. МАт к CD1 (правый столбик в каждом наборе столбцов) использовали в качестве контроля. МАт 3D1 (левый столбик в каждом наборе столбцов) использовали в качестве контроля альфа-3-положительного связывания. Результаты представлены в процентах от контрольного связывания в сравнении со связыванием, полученным с WT белком (>3,0 единиц OD).

ФИГ. 9. Связывание химерных МАт GO-702mFc с НСТ116/MUC1. Химеру дикого типа (GO-702m/hFc) и ее афукозилированную форму, содержащие Fc из IgG1 человека, инкубировали с клетками, с последующим инкубированием с Бiotин-конъюгатом против hIgG+Стрептавидин-ФЭ или ФИТЦ-конъюгатом против мышинового IgGk в качестве вторичных реагентов. Эффективность связывания была представлена как средняя интенсивность флуоресценции (MFI).

ФИГ. 10А-В. Зависимое от концентрации связывание GO-702h с мышинным Fc-рецептором (FcRIV). (ФИГ. 10А) Дикий тип и афукозилированные (AF) формы GO-702h инкубировали с клетками при различных концентрациях (как показано выше) с последующим инкубированием с ФИТЦ-конъюгатом против IgG челока в качестве вторичных реагентов. Эффективность связывания была представлена как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации. (ФИГ. 10В) Дикий тип (алмаз) и афукозилированную (AF) форму (квадрат) GO-702h инкубировали с клетками при различных концентрациях с последующим инкубированием с ФИТЦ-конъюгатом против IgG человека в качестве вторичных реагентов. Эффективность связывания была представлена как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) в зависимости от концентрации. Справа показано графическое представление связывания.

ФИГ. 11. Биохимический анализ крови MUC1.Tg мышей, получавших МАт

(GO-702m-AF). Пять мг/кг афукозилированного мАт GO-702m вводили в/б MUC1.Tg мышам, несущим опухоли MC-38/MUC1. Полный биохимический анализ крови выполняли для оценки какого-либо токсического действия афукозилированного антитела GO-702m.

ФИГ. 12. Общий анализ крови мышей MUCT1-Tg, получавших мАт (GO-702m-AF). Пять мг/кг афукозилированного мАт GO-702m вводили в/б MUC1.Tg мышам, несущим опухоли MC-38/MUC1. Развернутый общий анализ крови выполняли для оценки какого-либо токсического действия афукозилированного антитела GO-702m.

ФИГ. 13. Связывание антител GO-702m, GO-702h и GO-701m с клетками НСТ116-MUC1. Связывание антитела с клетками НСТ116, повышенно экспрессирующими MUC1 человека, исследовали с помощью проточной цитометрии. Пять мкг указанного антитела против MUC1 или изотипического контроля инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против мышинового или человеческого иммуноглобулина (в зависимости от первичного антитела) использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 14. Связывание дикого типа и афукозилированный GO-702h с клетками НСТ116/MUC1. Связывание антитела с клетками НСТ116, повышенно экспрессирующими MUC1 человека, исследовали с помощью проточной цитометрии. Антитела против MUC1 GO-702h дикого типа, афукозилированное GO-702h или, в качестве отрицательного контроля, антитело к CD1, инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против человеческого иммуноглобулина использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 15. Проточная цитометрия GO-702m с НСТ116±MUC-1. Связывание антитела с клетками НСТ116 без MUC1 (Черный) и клетками НСТ116, повышенно экспрессирующими человеческий MUC1 (серый), исследовали с помощью проточной цитометрии. Антитело GO-702m против MUC1 инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против иммуноглобулина мыши использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 16. Проточная цитометрия GO-702m в клетках ZR-75-1. Связывание антитела с линией клеток рака молочной железы ZR-75-1. Антитело GO-702m против MUC1 (серый) или, в качестве отрицательного контроля MUC1, антитело к CD1 (черный) инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против иммуноглобулина мыши использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 17. Проточная цитометрия GO-702m в MCF-7/CshRNA в сравнении с MCF-7/MUC1shRNA. Связывание антитела с клетками MCF-7/MUC1shRNA (черный) или MCF-7/CshRNA (серый) исследовали с помощью проточной цитометрии. Антитело

GO-702m против MUC1 инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против иммуноглобулина мыши использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 18. Проточная цитометрия GO-702m в клетках НМРЛ Н-1975. Связывание антитела с линией клеток НМРЛ Н-1975. Антитело GO-702m против MUC1 (серый) или IgG в качестве отрицательного контроля (черный) инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против иммуноглобулина мыши использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 19. Проточная цитометрия GO-702m в MDA-MB-468 CshRNA/MUC1shRNA. Связывание антитела с клетками MDA-MB-468/MUCshRNA (серый пик справа) или MDA-MB-468/CshRNA (серый пик слева) исследовали с помощью проточной цитометрии. IgG использовали в качестве отрицательного контроля (черный пик слева). Антитело GO-702m против MUC1 инкубировали с клетками в течение 60 минут на льду. ФИТЦ-конъюгированный F(ab')₂ козы против иммуноглобулина мыши использовали в качестве вторичного реагента. Связывание антитела с клеточной поверхностью исследовали с помощью FACS Canto II.

ФИГ. 20. Активность ADCC GO-702m (круги) и GO-702m-AF (НСТ-MUC1; квадраты). Клетки НСТ116/MUC1 в 96-луночном планшете инкубировали с клетками Jurkat (в которых связывание антитела с FcRIV связано с NFAT-опосредованной экспрессией люциферазы) в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 20:1, в течение 6 часов в присутствии указанных антител, начиная с 1 мкг/мл с 3-кратным серийным разведением. Люциферазную активность измеряли при использовании люциферина в качестве субстрата и наносили на кривую в зависимости от концентрации с использованием Microsoft Excel.

ФИГ. 21. Активность ADCC GO-702m-IgG2a в отношении BT549. Клетки BT549 в 96-луночном планшете инкубировали с клетками Jurkat (в которых связывание антитела с FcRIV связано с NFAT-опосредованной экспрессией люциферазы) в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 20:1, в течение 6 часов в присутствии указанных антител, начиная с 1 мкг/мл с 3-кратным серийным разведением. Люциферазную активность измеряли при использовании люциферина в качестве субстрата и наносили на кривую в зависимости от концентрации с использованием Microsoft Excel. Квадраты=афукозилированное антитело GO-702m; треугольники - wt антитело GO-702m.

ФИГ. 22. Эффективность афукозилированного GO-702m у MUC1.Tg мышей с опухолями МС-38/MUC1. Клетки МС-38 с оверэкспрессией MUC1 вводили MUC1.Tg мышам. Через 10-12 дней мышей рандомизированно распределяли в 2 разных группы. Группа 1: контроль растворителем; группа 2: афукозилированное антитело GO-702m, 5 мг/кг один раз в неделю × 3 недель, в/б. Измерения опухолей производили раз в два дня.

Ромбы: контрольная группа, получавшая растворитель (на кривой показаны средние значения опухолей в группе), и Круги: афукозилированное GO-702m (кривые показаны для отдельной мыши). Значимого изменения массы тела не надлюдали. Эффективность показана до 84 дней.

ФИГ. 23. Исследования ADCC in vitro с антителом hGO702-AF в сравнении с hGO-702 в клетках карциномы толстой кишки HCT116/MUC1. Клетки HCT116/MUC1 в 96-луночном планшете инкубировали с клетками Jurkat (в которых связывание антитела с FcRIV связано с NFAT-опосредованной экспрессией люциферазы) в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 20:1, в течение 6 часов в присутствии указанных антител, начиная с 1 мкг/мл с 3-кратным серийным разведением. Люциферазную активность измеряли при использовании люциферина в качестве субстрата и наносили на кривую в зависимости от концентрации.

ФИГ. 24. Исследования ADCC in vivo с антителом hGO702-AF в сравнении с hGO-702. Мышам C57BL/6 возрастом шесть-восемь недель подкожно в бок вводили 5×10^5 клеток карциномы толстой кишки мыши MC38/MUC1, экспрессирующих человеческий MUC1 (MC38/MUC1), в 100 мкл культуральной среды DMEM. Мышей рандомизировано распределяли в две группы лечения (6 мышей в группе hGO-702-WT и 7 мышей в группе афукозилированного hGO-702 (AF)). Когда средний объем опухоли достигал 70-130 мм³, мыши получали 5 мг/кг гуманизированного афукозилированного GO-702 (hGO-702-AF) или гуманизированного GO-702 дикого типа (hGO-702-WT), один раз в неделю в течение 3 недель, в/б. Измерения опухолей и массу тела регистрировали раз в два дня. Мышей умерщвляли по достижении опухолями размера >2000 мм³, вычисляемого по следующей формуле: (ширина)²×длина/2. Результаты выражены как объемы опухолей (среднее±SEM) в зависимости от дней лечения.

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Авторам изобретения были созданы антитела против несбрасываемой части внешнего домена белка MUC1-C размером 58 аминокислот. Было продемонстрировано, что эти антитела селективно связываются с этой частью MUC1-C и, таким образом, обеспечивают возможность блокирования активности MUC1 после отщепления N-концевой области. Они также могут применяться для доставки полезной терапевтической нагрузки в MUC1-экспрессирующие раковые клетки даже после отщепления N-концевого домена MUC1. Эти и другие аспекты изобретения более подробно описаны ниже.

I. MUC1

A. Структура

MUC1 представляет собой гликопротеин муцинового типа, который экспрессируется на апикальных границах нормальных секреторных эпителиальных клеток (Kufe et al., 1984). MUC1 образует гетеродимер после синтеза одного полипептида и расщепления предшественника на две субъединицы в эндоплазматическом ретикулуме (Ligtenberg et al., 1992). Расщепление может быть опосредовано аутокаталитическим процессом (Levitan et al., 2005). N-концевая субъединица MUC1 размером >250 кДа

(MUC1 N-ter, MUC1-N) содержит переменное количество tandemных повторов из 20 аминокислот, которые являются несовершенными, с высококонсервативными вариациями, и модифицированы O-связанными гликанами (Gendler et al., 1988); Siddiqui et al., 1988). MUC1-N прикрепляется к клеточной поверхности в результате димеризации с C-концевой субъединицей размером ~23 кДа (MUC1 C-ter, MUC1-C), которая включает цитоплазматический домен из 72 аминокислот (MUC1-C/CD), трансмембранный домен из 28 аминокислот (MUC1-C/TMD), внеклеточный домен из 58 аминокислот (MUC1-C/ECD), после которого следует участок из 62 аминокислот, коорые димеризуются вместе с образованием SEA-домена (Merlo et al., 1989). Именно эта часть MUC1-C/ECD длиной 58 аминокислот (выделена курсивом) играет основную роль в связывании с антителами согласно настоящему изобретению. Последовательность MUC1-C человека показана ниже:

**SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFFSAQSGAGV
PGWGIALLVLCVLAIVYLI~~ALAVCQCRRKNYGOLDIFPARDTYHPMSEYPTYHT~~
HGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL** (SEQ ID NO: 1)

Выделенная жирным шрифтом последовательность обозначает CD, а подчеркнутая часть представляет собой олигомер-ингибирующий пептид. При трансформации нормального эпителия в карциномы, нарушается продукция MUC1 с его оверэкспрессией в цитозоле и всей клеточной мембране (Kufe et al., 1984; Perey et al., 1992). Ассоциированный с клеточной мембраной MUC1 направляется в эндосомы посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза (Kinlough et al., 2004). Кроме того, MUC1-C, но не MUC1-N, направляется в ядро (Baldus et al., 2004; Huang et al., 2003; Li et al., 2003a; Li et al., 2003b; Li et al., 2003c; Wei et al., 2005; Wen et al., 2003) и митохондрии (Ren et al., 2004).

В. Функция

MUC1-C взаимодействует с членами семейства рецепторов ErbB (Li et al., 2001b; Li et al., 2003c; Schroeder et al., 2001) и с Wnt-эффектором, β -катенином (Yamamoto et al., 1997). Рецептор эпидермального фактора роста и c-Src фосфорилируют цитоплазматический домен MUC1 (MUC1-CD) по Y-46 и тем самым усиливают связывание MUC1 и β -катенина (Li et al., 2001a; Li et al., 2001b). Связывание MUC1 и β -катенина также регулируют киназа гликогенсинтазы 3β и протеинкиназа C δ (Li et al., 1998; Ren et al., 2002). MUC1 колокализован с β -катенином в ядре (Baldus et al., 2004; Li et al., 2003a; Li et al., 2003c; Wen et al., 2003) и коактивирует транскрипцию генов-мишеней Wnt (Huang et al., 2003). Другие исследования показали, что MUC1 также связывается непосредственно с p53 и регулирует транскрипцию генов-мишеней p53 (Wei et al., 2005). Примечательно, что оверэкспрессия MUC1-C достаточна для индукции независимого от прикрепления клеток роста и туморогенности (Huang et al., 2003; Li et al., 2003b; Ren et al., 2002; Schroeder et al., 2004).

II. Продукция моноклональных антител

Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем документе

относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью, будучи направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к своей специфичности моноклональные антитела обеспечивают преимущество, связанное с тем, что они могут быть синтезированы без контаминации другими антителами. Определение "моноклональное" не следует толковать как требование получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Колером с соавт. (Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), или могут быть получены с применением методов рекомбинантных ДНК в бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (см., например, патент США 4,816,567) после отбора одиночных антигенспецифичных В-клеток, антигенспецифичного плазмобласта, отвечающего на инфекцию или иммунизацию, или путем захвата связанных тяжелых и легких цепей из одиночных клеток в смешанной сортированной антигенспецифичной коллекции. "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением технологий, описанных, например, в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

"Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое было отделено от и/или выделено из смеси компонентов в его естественном окружении. Контаминирующие компоненты его естественного окружения представляют собой материалы, которые могут препятствовать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В конкретных вариантах осуществления антитело очищают: (1) до больше чем 95% по весу антитела при определении методом Лоури, и наиболее конкретно до больше чем 99% по весу; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до гомогенности согласно электрофорезу в ДСН-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, с использованием окрашивания кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку будет отсутствовать по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела. Однако обычно выделенное антитело получают с использованием по меньшей мере одной стадии очистки.

Основной единицей четырехцепочечного антитела является гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных звеньев

вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как секретируемые IgA антитела могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, включающих 2-5 основных 4-цепочечных звеньев вместе с J-цепью. В случае IgG иммуноглобулинов 4-цепочечная единица обычно имеет размер примерно 150000 дальтон. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи соединены друг с другом одной или больше дисульфидными связями, в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь на N-конце имеет переменную область (V_H), после которой следуют три константных домена (C_H) в случае каждой из альфа- и гамма-цепей и четыре C_H -домена в случае мю- и эпсилон-изоформ. Каждая L-цепь содержит на N-конце переменную область (V_L), после которой следует константный домен (C_L) на другом конце. V_L выравнивается с V_H , а C_L выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными областями легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L приводит к образованию одного антигенсвязывающего участка. По поводу структуры и свойств различных классов антител см., например, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, стр. 71 и Главу 6.

У позвоночных любых видов L-цепь может быть отнесена к одному из двух четко определенных типов, называемых каппа и лямбда, в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов (C_L). В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначают альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Гамма- и альфа-классы также подразделяются на подклассы на основании относительно малых различий последовательностей и функций C_H , у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин "переменный" относится к тому, что некоторые сегменты V-доменов сильно различаются по последовательности среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. Однако переменность неравномерно распределяется на протяжении 110 аминокислот переменных областей. Вместо этого V-области состоят из относительно инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями крайне высокой переменности, которые называются "гиперпеременными областями", каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждая из переменных областей нативных тяжелых и легких цепей состоит из четырех FR, в основном имеющих конфигурацию бета-листа, соединенных тремя гиперпеременными областями, которые образуют петли,

соединяющие структуру бета-слоя и в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством FR-областей и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи способствуют формированию антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP), антителозависимом фагоцитозе нейтрофилами (ADNP) и антителозависимом депонировании комплемента (ADCD).

Термин "гипервариабельная область" при использовании в настоящем документе относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно включает аминокислотные остатки из "определяющей комплементарность области" или "CDR" (например, приблизительно остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L и приблизительно остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации Кэбата; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); и/или соответствующие остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3) в V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации Чотиа, Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)); и/или соответствующие остатки из "гипервариабельной петли"/CDR (например, остатки 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-120 (L3) в V_L и остатки 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-120 (H3) в V_H при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT, Lefranc, M. P. et al. *Nucl. Acids Res.* 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. *Nucl. Acids Res.* 28:219-221 (2000)). Необязательно антитело имеет симметричные вставки в одной или более из следующих положений 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) и 123 (L3) в V_L и 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) и 123 (H3) в $V_{sub}H$ при нумерации в соответствии с АНо; Honneger, A. and Plunkthun, A. *J. Mol. Biol.* 309:657-670 (2001).

Под "остатком нуклеиновой кислоты зародышевой линии" подразумевается остаток нуклеиновой кислоты, который естественным образом встречается в гене зародышевой линии, кодирующем константную или вариабельную область. "Ген зародышевой линии" представляет собой ДНК, обнаруженную в зародышевой клетке (т.е. клетке, которой предстоит стать яйцеклеткой или сперматозоидом). "Мутация зародышевой линии" относится к наследуемому изменению в конкретной ДНК, которое произошло в зародышевой клетке или зиготе на стадии одной клетки, при этом при передаче потомству такая мутация внедряется в каждую клетку организма. Мутация зародышевой линии отличается от соматической мутации, которая приобретает в одной клетке организма. В некоторых случаях нуклеотиды в последовательности ДНК

зародышевой линии, кодирующей вариабельную область, подвергаются мутации (т.е. соматической мутации) и заменяются другим нуклеотидом.

А. Общие методы

Антитела к MUC1-C/ECD могут быть получены стандартными способами, которые хорошо известны в уровне техники (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; патент США 4,196,265). Способы получения моноклональных антител (мАт) обычно начинают с теми же линиями, что и способы получения поликлональных антител. Первым этапом в обоих этих методах является иммунизация соответствующего хозяина или идентификация субъектов, иммунных после перенесенной инфекции. Как хорошо известно из уровня техники, каждая конкретная композиция для иммунизации может отличаться по своей иммуногенности. Поэтому часто требуется стимулировать иммунную систему реципиента, что может быть достигнуто путем связывания пептидного или полипептидного иммуногена с носителем. Типичными и предпочтительными носителями являются гемоцианин лимфы моллюска *Megathura crenulata* (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Другие альбумины, такие как яичный альбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика, также могут использоваться в качестве носителей. Средства конъюгирования полипептида с белком-носителем хорошо известны в уровне техники и включают глутаровый альдегид, сложный эфир м-малеимидобенкоил-N-гидроксисукцинимид, карбодиимид и бис-биазотированный бензидин. Как также хорошо известно в уровне техники, иммуногенность конкретной иммуногенной композиции может быть усилена благодаря применению неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Иллюстративные и предпочтительные адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитую *Mycobacterium tuberculosis*), неполные адъюванты Фрейнда и адъювант на основе гидроксида алюминия.

Количество иммуногенной композиции, используемой при получении поликлональных антител, зависит от природы иммуногена, а также от животного, используемого для иммунизации. Для введения иммуногена можно использовать разные пути (подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутривенный и внутрибрюшинный). Продукцию поликлональных антител можно контролировать путем отбора проб крови иммунизированного животного в разные моменты времени после иммунизации. Также могут делать вторую, бустерную инъекцию. Процесс бустерной иммунизации и титрования повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий титр. Когда достигается требуемый уровень иммуногенности, у иммунизированного животного можно забирать кровь, выделять и помещать на хранение сыворотку крови, и/или животное можно использовать для получения мАт.

После иммунизации соматические клетки, способные к продукции антител, в частности В-лимфоциты (В-клетки), отбирают для использования в протоколе получения мАт. Эти клетки могут быть получены из образцов биопсии селезенки или лимфатических

узлов или из циркулирующей крови. Антителопродуцирующие В-лимфоциты иммунизированного животного затем подвергают слиянию с клетками линии бессмертных клеток миеломы, как правило, того же вида, что и иммунизированное животное, или с клетками человека или химерными клетками человека/мыши. Линии клеток миеломы, подходящие для использования в процедурах слияния для получения гибридом, предпочтительно не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и дефицитны по ферментам, что делает их неспособными к росту в некоторых селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых слитых клеток (гибридом).

Могут использоваться любые клетки миеломы, которые известны специалистам в данной области (Goding, стр. 65-66, 1986; Campbell, стр. 75-83, 1984). Например, если иммунизируемым животным является мышь, можно использовать P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XX0 Bul; для крыс можно использовать R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210; а U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6 подходят для слияния с клетками человека. Одной конкретной клеткой мышинной миеломы является линия клеток миеломы NS-1 (также называемая P3-NS-1-Ag4-1), которая может быть легко получена из коллекции генетических мутантных клеток человека NIGMS при запросе линии клеток под номером GM3573. Другой линией клеток мышинной миеломы, которая может использоваться, является непродуцирующая линия клеток мышинной миеломы SP2/0, устойчивая к 8-азагуанину. Недавно были описаны дополнительные линии-партнеры по слиянию для использования с В-клетками человека, включающие KR12 (ATCC CRL-8658; K6H6/B5 (ATCC CRL-1823 SHM-D33 (ATCC CRL-1668) и HMMA2.5 (Posner et al., 1987). Антитела в настоящем описании были получены при использовании линии клеток SP2/0/mIL-6, IL-6-секретирующей производной линии SP2/0.

Способы создания гибридов антителопродуцирующих клеток селезенки или лимфатических узлов и клеток миеломы обычно включают смешивание соматических клеток с клетками миеломы в соотношении 2:1, хотя соотношение может изменяться от приблизительно 20:1 до приблизительно 1:1 соответственно в присутствии веществ или средств (химических или электрических), которые способствуют слиянию клеточных мембран. Способы слияния с использованием вируса Сендай были описаны Колером и Мильштейном (1975; 1976), а способы с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), например, 37% (об/об) ПЭГ - в публикации Gefter et al. (1977). Также можно использовать методы электрически индуцированного слияния (Goding, стр. 71-74, 1986).

Процедуры слияния обычно дают жизнеспособные гибриды при низких частотах, приблизительно от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} . Однако это не представляет сложности, поскольку жизнеспособные слитые гибриды можно отличить от исходных клеток после инфузии (в частности клеток миеломы после инфузии, которые обычно продолжают делиться неограниченно долго) при культивировании в селективной среде. Селективная среда обычно является средой, которая содержит средство, которое блокирует синтез

нуклеотидов *de novo* в среде для культивирования тканей. Иллюстративными и предпочтительными средствами являются аминоптерин, метотрексат и азасерин. Аминоптерин и метотрексат блокируют синтез *de novo* как пуринов, так и пиримидинов, тогда как азасерин блокирует только синтез пуринов. При использовании аминоптерина или метотрексата в среду добавляют гипоксантин и тимидин в качестве источника нуклеотидов (среда НАТ). При использовании азасерина в среду добавляют гипоксантин. Уабаин добавляют, если источником В-клеток является линия человеческих В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), чтобы удалить трансформированные ВЭБ линии, которые не были слиты с миеломой.

Предпочтительной средой для селекции является НАТ или НАТ с уабаином. Только клетки, способные использовать пути реутилизации нуклеотидов, могут выживать в среде НАТ. Клетки миеломы дефектны по ключевым ферментам пути реутилизации, например, по гипоксантинфосфорибозилтрансферазе (HPRТ), и гибнут. В-клетки могут использовать этот путь, но их время жизни в культуре ограничено, и обычно они погибают в течение приблизительно двух недель. Таким образом, единственными клетками, которые могут выживать в селективной среде, являются гибриды, полученные из миеломных клеток и В-клеток. Если источником В-клеток, используемых для слияния, является линия В-клеток, трансформированных ВЭБ, как в данном случае, то уабаин также используется для лекарственной селекции гибридов, поскольку трансформированные ВЭБ В-клетки чувствительны к действию цитотоксических средств, тогда как используемую миелому-партнера выбирают так, чтобы она была устойчива к уабаинам.

Культивирование дает популяцию гибридом, из которых отбирают специфичные гибридомы. Как правило, селекцию гибридом проводят путем культивирования клеток при моноклональном разведении в микротитровальных планшетах с последующим тестированием супернатантов отдельных клонов (приблизительно через две-три недели) на наличие нужной реактивности. Анализ должен быть чувствительным, простым и быстрым, таким как радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, анализы цитотоксичности, анализы бляшкообразования, дот-блот анализы и т.п.

Затем отобранные гибридомы подвергают серийному разведению или сортировке с получением отдельных клеток методом проточной цитометрии и клонируют в виде индивидуальных антитело-продуцирующих клеточных линий, при этом такие клоны затем можно размножить неограниченно долго с получением МАт. Линии клеток можно использовать для продукции МАт двумя основными способами. Образец гибридомы можно вводить (часто в брюшную полость) животному (например, мышам). Необязательно перед инъекцией животных примиряют углеводородом, в особенности маслами, такими как пристан (тетраметилпентадекан). Когда человеческие гибридомы используют таким образом, оптимально делать инъекции мышам с ослабленным иммунитетом, таким как мыши с ТКИД, для предотвращения отторжения опухоли. После инъекции у животного развиваются опухоли, секретирующие специфическое моноклональное антитело,

продуцируемое гибридом из слитых клеток. Физиологические жидкости животного, такие как сыворотка или асцитная жидкость, затем можно отбирать для получения мАт в высокой концентрации. Отдельные клеточные линии также можно культивировать *in vitro*, при этом мАт естественным образом секретируются в среду культивирования, из которой их можно легко получать в высоких концентрациях. В альтернативе линии человеческих гибридных клеток можно использовать *in vitro* для получения иммуноглобулинов в супернатанте клеток. Клеточные линии могут быть адаптированы для роста в бессывороточной среде с целью оптимизации возможности выделять человеческие моноклональные иммуноглобулины высокой чистоты.

МАт, полученные любыми способами, могут быть дополнительно очищены, при необходимости, с использованием фильтрации, центрифугирования и различных хроматографических методов, таких как FPLC или аффинная хроматография. Фрагменты моноклональных антител согласно изобретению могут быть получены из очищенных моноклональных антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или путем расщепления дисульфидных связей при химическом восстановлении. В альтернативе фрагменты моноклональных антител, охваченные настоящим изобретением, можно синтезировать при использовании автоматического синтезатора пептидов.

Также предполагается, что метод молекулярного клонирования может использоваться для получения моноклональных антител. Для этого РНК можно выделять из гибридной линии с последующим клонированием генов антител, полученных с помощью ОТ-ПЦР, в вектор экспрессии иммуноглобулина. В альтернативе комбинаторные библиотеки иммуноглобулиновых фагмид получают из РНК, выделенной из клеточных линий, и фагмиды, экспрессирующие соответствующие антитела, отбирают методом пэннинга с использованием вирусных антигенов. Преимущества этого подхода по сравнению с традиционными гибридными технологиями заключаются в том, что за один раунд можно получить и провести скрининг приблизительно в 10^4 раз больше антител, и что новые специфичности создаются в результате комбинирования Н и L цепей, что еще больше повышает вероятность обнаружения подходящих антител.

Другие патенты США, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки, в которых описано получение антител, применимых в настоящем изобретении, включают патент США 5,565,332, в котором описано получение химерных антител с применением комбинаторного метода; патент США 4,816,567, в котором описаны препараты рекомбинантных иммуноглобулинов; и патент США 4,867,973, в котором описаны конъюгаты антител с терапевтическими средствами.

В. Антитела согласно настоящему изобретению

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть определены, прежде всего, своей специфичностью связывания, т.е. эпитопом, с которым связывается антитело. Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, на который отвечают В и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы смежными аминокислотами или несмежными

аминокислотами, которые сближаются в результате третичного фолдинга белка. Эпитопы, сформированные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, сформированные в результате третичного фолдинга, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

В этом случае, из гетеродимера р58/р62, основная часть эпитопа присутствует в MUC1-C/ECD, в частности:

SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQS
GAG (SEQ ID NO: 2). Специалисты в данной области при оценке специфичности/аффинности связывания конкретного антитела с помощью методов, хорошо известных из уровня техники, могут определить, находятся ли такие антитела в рамках объема настоящей формулы изобретения.

Анализ профиля с помощью модификаций (MAP), также известный как анализ профиля антитела на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой способ, позволяющий классифицировать большое число моноклональных антител (мАт), направленных против одного и того же антигена, в соответствии со сходством профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. US 2004/0101920). Каждый класс может отражать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного другим классом, либо частично перекрывается с ним. Эта технология позволяет быстро отсеивать генетически идентичные антитела, благодаря чему исследование характеристик можно сосредоточить на генетически различных антителах. В случае применения для скрининга гибридом, MAP может облегчать идентификацию редких клонов гибридом, которые продуцируют мАт, обладающие нужными характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител согласно настоящему изобретению по группам антител, связывающих разные эпитопы.

Настоящее изобретение включает антитела, которые могут связываться с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела, которые конкурируют за связывание с мишенью или ее фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе. Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и референсное антитело, или конкурирует за связывание с референсным антителом, используя стандартные методы, известные в уровне техники. Например, для определения, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и референсное антитело, референсному антителу позволяют связываться с мишенью в насыщающих условиях. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой-мишенью. Если тестируемое антитело способно связываться с молекулой-мишенью после насыщения связывания с референсным антителом, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, нежели референсное антитело. С другой

стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой-мишенью после насыщения связывания с референсным антителом, то тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается референсное антитело.

Для определения, конкурирует ли антитело за связывание с референсным антителом против MUC1, описанную выше методику связывания проводят в двух направлениях: в первом способе референсному антителу позволяют связаться с антигеном MUC1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой MUC1. Во втором способе тестируемому антителу позволяют связаться с молекулой антигена MUC1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания референсного антитела с молекулой MUC1. Если в обоих способах только первое (насыщающее) антитело способно связываться с MUC1, то делают вывод, что тестируемое антитело и референсное антитело конкурируют за связывание с MUC1. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с референсным антителом, не должно обязательно связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело, но может стерически блокировать связывание референсного антитела посредством связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99% при измерении в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). В альтернативе два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (например, мутации пептидов и анализы связывания) для подтверждения, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела вызвано связыванием с тем же эпитопом, как у референсного антитела, или отсутствие наблюдаемого связывания вызвано стерическим блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого рода можно проводить с использованием ИФА, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области. Структурные исследования с помощью ЭМ или кристаллографии также могут продемонстрировать, распознают ли два антитела, конкурирующие за связывание, один и тот же эпитоп.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело изотипа иммуноглобулина G (IgG). Составляя примерно 75% всех сывороточных

иммуноглобулинов человека, IgG является наиболее распространенным изотипом антител, обнаруживаемым в кровотоке. Молекулы IgG синтезируются и секретируются В-клетками плазмы. У человека существует четыре подкласса IgG (IgG1, 2, 3 и 4), которые названы в порядке их представленности в сыворотке (IgG1 является наиболее распространенным). Диапазон от высокой до нулевой аффинности к рецептору Fc.

IgG является основным изотипом антител, присутствующих в крови и внеклеточной жидкости, что позволяет ему контролировать инфицирование тканей организма. Связывая многие типы патогенов, представляющих вирусы, бактерии и грибы, IgG защищает организм от инфекций. Он делает это посредством нескольких иммунных механизмов: IgG-опосредованное связывание патогенов вызывает их иммобилизацию и связывание вместе посредством агглютинации; IgG покрывает поверхности патогенов (что известно как опсонизация), что позволяет фагоцитирующим иммунным клеткам распознавать и поглощать их; IgG активирует классический путь системы комплемента, каскад продукции иммунных белков, что приводит к устранению патогенов; также IgG связывает и нейтрализует токсины. IgG также играет важную роль в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и внутриклеточном антитело-опосредованном протеолизе, при котором он связывается с TRIM21 (рецептором с наибольшей аффинностью к IgG у человека), направляя помеченные вирионы в протеасому в цитозоле. Также IgG связан с гиперчувствительностью II типа и III типа. Антитела IgG вырабатываются после переключения класса и созревания гуморального ответа и, таким образом, участвуют в первую очередь во вторичном иммунном ответе. IgG секретируется в виде мономера малого размера, что позволяет ему легко перфузировать ткани. Это единственный изотип, который имеет рецепторы для облегчения прохождения через плаценту человека. Наряду с IgA, секретлируемым в грудное молоко, остаточный IgG, абсорбируемый через плаценту, обеспечивает гуморальный иммунитет у новорожденного до того, как сформируется его собственная иммунная система. Молозиво содержит высокий процент IgG, особенно молозиво коров. У лиц с предыдущим иммунитетом к патогену, IgG появляются приблизительно через 24-48 часов после антигенной стимуляции.

В другом аспекте антитела могут быть определены их вариабельными последовательностями, которые определяют их специфичность связывания. Примеры приведены ниже:

Таблица 1 - CDR-последовательности антител

Антитело	Тяжелая цепь	Легкая цепь
GO-701m	CDR1 - SYWMH (SEQ ID NO: 3) CDR2 - EINPSNGRTYYNENFKT (SEQ ID NO: 4) CDR3 - DGDYVSGFAY (SEQ ID NO: 5)	CDR1 - KASENVGTYVVS (SEQ ID NO: 9) CDR2 - GASNRYT (SEQ ID NO: 10) CDR3 - GQSYSYPWT (SEQ ID NO: 11)
GO-702m	CDR1 - GFTFNYFW (SEQ ID NO: 6) CDR2 - ILPGTGST (SEQ ID NO: 7) CDR3 - RYDYTSSMDY (SEQ ID NO: 8)	CDR1 - CRASESVQYSGTSLMH (SEQ ID NO: 12) CDR2 - GASNVET (SEQ ID NO: 13)

	8)	CDR3 - QQNWKVPWT (SEQ ID NO: 14)
GO-702h	CDR1 - GFTFNYFW (SEQ ID NO: 6) CDR2 - ILPGTGST (SEQ ID NO: 7) CDR3 - RYDYTSSMDY (SEQ ID NO: 8)	CDR1 - CRASESVQYSGTSLMH (SEQ ID NO: 12) CDR2 - GASNVET (SEQ ID NO: 13) CDR3 - QQNWKVPWT (SEQ ID NO: 14)

Кроме того, последовательности антител могут отличаться от приведенных выше последовательностей, необязательно в результате применения способов, более подробно обсуждаемых ниже. Например, аминокислотные последовательности могут отличаться от указанных выше тем, что: (a) переменные области могут быть отделены от константных доменов легких цепей, (b) аминокислоты могут отличаться от представленных выше без существенного влияния на химические свойства остатков (так называемые консервативные замены), (c) аминокислоты могут отличаться от представленных выше на заданный процент, например, с гомологией 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В альтернативе нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, могут: (a) быть отделены от константных доменов легких цепей, (b) отличаться от представленных выше без изменения при этом кодируемых ими остатков, (c) отличаться от представленных выше на заданный процент, например, с гомологией 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или (d) отличаться от представленных выше за счет способности гибридизоваться в условиях высокой строгости, представленных, например, условиями с низкой концентрацией соли и/или высокой температурой, таких как обеспечиваемые от приблизительно 0,02 М до приблизительно 0,15 М NaCl при температуре от приблизительно 50°C до приблизительно 70°C.

При внесении консервативных изменений в аминокислотную последовательность может учитываться гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислоты для придания белку взаимодействующей биологической функции общеизвестна в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Принято считать, что относительный гидропатический (гидрофобный) характер аминокислоты способствует формированию вторичной структуры образующегося белка, что, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Также в данной области техники известно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно выполнена на основе гидрофильности. В патенте США 4,554,101, включенном в настоящий документ посредством отсылки, указано, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как подробно описано в патенте США 4,554,101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5); кислотные аминокислоты: аспартат (+3,0±1), глутамат (+3,0±1), аспарагин (+0,2), глутамин (+0,2); гидрофильные, неионогенные аминокислоты: серин (+0,3), аспарагин

(+0,2), глутамин (+0,2), треонин (-0,4), серосодержащие аминокислоты: цистеин (-1,0) и метионин (-1,3); гидрофобные, неароматические аминокислоты: валин (-1,5), лейцин (-1,8), изолейцин (-1,8), пролин (-0,5±1), аланин (-0,5), глицин (0); гидрофобные, ароматические аминокислоты: триптофан (-3,4), фенилаланин (-2,5) и тирозин (-2,3).

Следует понимать, что одна аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, обладающей аналогичной гидрофильностью, с получением биологически или иммунологически модифицированного белка. При таких изменениях предпочтительна замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 , особенно предпочтительными являются замены в пределах ± 1 , и еще более предпочтительными являются замены в пределах $\pm 0,5$.

Как указано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном подобии заместителей боковой цепи аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п. Примеры замен, которые учитывают различные указанные выше характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено при использовании программы Megalign в составе пакета программ для биоинформатики Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) с использованием параметров по умолчанию. В этой программе реализовано несколько схем выравнивания, описанных в следующих ссылках: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. В Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogeny pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730.

В альтернативе оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено с использованием алгоритма локальной идентификации Смита и Уотермана (Smith and Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482), алгоритма выравнивания идентичности Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443), методов поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444), при использовании компьютерной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.), или путем визуальной проверки.

Одним конкретным примером алгоритмов, подходящих для определения процента

идентичности последовательностей и подобия последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в публикациях Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 соответственно. BLAST и BLAST 2.0 можно использовать, например, с параметрами, описанными в настоящем документе, для определения процента идентичности последовательностей полинуклеотидов и полипептидов согласно настоящему изобретению. Программа для проведения анализов BLAST общедоступна на сервере Национального центра биотехнологической информации США. Реаранжированная природа последовательности антитела и переменная длина каждого гена требуют нескольких раундов поиска BLAST для одной последовательности антитела. Кроме того, ручная сборка различных генов сложна и часто допускает ошибки. Инструмент анализа последовательностей IgBLAST (адрес в сети Интернет ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) идентифицирует совпадения с генами V, D и J зародышевой линии, детали в местах соединения перестроенных участков, выделяет каркасные области V доменов Ig и определяющие комплементарность области. IgBLAST позволяет производить анализ нуклеотидных или белковых последовательностей и может обрабатывать последовательности партиями, а также позволяет проводить поиск в базах данных генов зародышевой линии и других базах данных последовательностей одновременно, что позволяет свести к минимуму вероятность пропуска, возможно, наиболее точно совпадающего V-гена зародышевой линии.

В одном иллюстративном примере кумулятивные баллы могут быть вычислены с использованием, в случае нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительный балл за пару совпавших остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпавшие остатки; всегда <0). Продолжение участка совпадения слов в каждом направлении останавливается, когда: кумулятивный балл выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; кумулятивный балл становится равным нулю или ниже из-за накопления одного или больше выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используются длина слова (W) 11 и ожидание (E) 10, а также матрица замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) выравнивания, (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

Для аминокислотных последовательностей матрицу замен можно использовать для вычисления кумулятивного балла. Продолжения участка совпадения слов в каждом направлении останавливается, когда: кумулятивный балл выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; кумулятивный балл становится равным нулю или ниже из-за накопления одного или больше выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания.

В одном подходе "процент идентичности последовательностей" определяют путем

сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения по меньшей мере из 20 положений, при этом часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может включать добавления или делеции (т.е. пропуски) 20 процентов или меньше, обычно от 5 до 15 процентов или от 10 до 12 процентов, по сравнению с референсными последовательностями (которые не включают добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют путем определения числа положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки присутствуют в обеих последовательностях с получением числа совпавших положений, деления количества совпавших положений на общее число положений в референсной последовательности (то есть на размер окна) и умножения результатов на 100, с получением процента идентичности последовательностей.

Еще одним способом определения антитела является "производное" любого из описанных ниже антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Термин "производное" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые иммуноспецифически связываются с антигеном, но содержат одну, две, три, четыре, пять или больше аминокислотных замен, добавлений, делеций или модификаций по отношению к "исходной" молекуле (или молекуле дикого типа). Такие аминокислотные замены или добавления могут вводить природные (т.е. кодируемые ДНК) или неприродные аминокислотные остатки. Термин "производное" охватывает, например, варианты, содержащие измененные СН1, шарнирные, СН2, СН3 или СН4 области, с образованием, например, антител и т.д., имеющих вариантыные Fc-области, которые демонстрируют усиленные или ослабленные эффекторные или связывающие свойства. Термин "производное" дополнительно включает неаминокислотные модификации, например, аминокислоты, которые могут быть гликозилированы (например, имеют измененное содержание маннозы, 2-N-ацетилглюкозамина, галактозы, фукозы, глюкозы, сиаловой кислоты, 5-N-ацетилнейраминовой кислоты, 5-гликольнейраминовой кислоты и т.д.), ацетилированы, пэгиллированы, фосфорилированы, амидированы, дериватизированы известными защитными/блокирующими группами, протеолитически расщепленные, связанные с клеточным лигандом или другим белком и т.д. В некоторых вариантах осуществления измененные углеводные модификации модулируют одно или больше из следующего: сольбилизацию антитела, облегчение субклеточного транспорта и секреции антитела, стимуляцию сборки антитела, конформационную целостность и антителоопосредованную эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления измененные углеводные модификации усиливают антителоопосредованную эффекторную функцию по сравнению с антителом, не содержащим такой углеводной модификации. Углеводные модификации, которые приводят к изменению антителоопосредованной эффекторной функции, хорошо известны в уровне техники (например, см. Shields, R. L. et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740; Davies J. et al. (2001), *Biotechnology & Bioengineering* 74(4): 288-294). Способы изменения углеводного состава известны

специалистам в данной области, см., например, Wallick, S. C. et al. (1988), *J. Exp. Med.* 168(3): 1099-1109; Tao, M. H. et al. (1989), *J. Immunol.* 143(8): 2595-2601; Routledge, E. G. et al. (1995), *Transplantation* 60(8):847-53; Elliott, S. et al. (2003), *Nature Biotechnol.* 21:414-21; Shields, R. L. et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740.

Производное антитело или фрагмент антитела могут быть получены с генно-инженерно модифицированной последовательностью или состоянием гликозилирования для придания предпочтительных уровней активности в отношении функций антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), антителозависимого фагоцитоза нейтрофилами (ADNP) или антителозависимого депонирования комплемента (ADCD), при измерении с помощью анализов, основанных на использовании гранул или клеток, или исследований *in vivo* в моделях на животных.

Производное антитела или фрагмент антитела могут быть модифицированы посредством химических модификаций при использовании методик, известных специалистам в данной области, включающих, без ограничения этим, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, изготовление составов, метаболический синтез туникамицина и т.д. В одном варианте осуществления производное антитела обладает такой же или идентичной функцией, что и исходное антитело. В другом варианте производное антитела демонстрирует измененную активность по сравнению с исходным антителом. Например, производное антитело (или его фрагмент) может более прочно связываться со своим эпитопом или может быть более устойчивым к протеолизу, чем исходное антитело.

С. Инженерия последовательностей антител

В различных вариантах осуществления генно-инженерное конструирование последовательностей идентифицированных антител могут выбирать по ряду причин, таких как улучшенная экспрессия, улучшенная перекрестная реактивность, сниженное нецелевое связывание или устранение одной или более естественных эффекторных функций, таких как активация комплемента или рекрутинг иммунных клеток (например, Т-клеток). В частности, IgM антитела могут быть преобразованы в IgG антитела. Следующее является общим обсуждением соответствующих методик инженерии антител.

Гибридомы можно культивировать, затем лизировать клетки и выделять суммарную РНК. Случайные гексамеры можно использовать для ОТ с получением кДНК-копий с РНК, а затем проводить ПЦР при использовании мультиплексной смеси ПЦР-праймеров с предположительной амплификацией всех последовательностей переменных генов человека. Продукт ПЦР можно клонировать в вектор pGEM-T Easy, а затем секвенировать с помощью автоматического секвенирования ДНК при использовании стандартных праймеров на вектор. Анализ связывания и нейтрализации можно проводить при использовании антител, собранных из супернатантов гибридом и очищенных с помощью FPLC при использовании колонок с G-белком. Рекомбинантные полноразмерные IgG антитела могут быть получены путем субклонирования ДНК,

кодирующих Fv тяжелой и легкой цепей, из клонирующего вектора в плазмидный вектор Lonza pConIgG1 или pConK2, трансфекции в клетки 293 Freestyle или Lonza CHO, с последующим сбором и очисткой из супернатанта клеток CHO.

Возможность быстрого получения антитела, продуцированного в одном и том же процессе из клеток-хозяев и клеточных культур, что и конечный процесс производства cGMP, потенциально может сократить длительность программ разработки процессов производства. Компания Lonza разработала общий метод с использованием смешанных пулов трансфектантов, выращенных в среде CDACF, для быстрого получения малых количеств (до 50 г) антител в клетках CHO. Хотя это немного медленнее, чем настоящая транзистентная система, преимущества включают более высокую концентрацию продукта и использование того же хозяина и процесса, как для линии клеток-продуцентов. Пример роста и продуктивности пулов GS-CHO, экспрессирующих модельное антитело, в биореакторе одноразового применения: в культуре, выращиваемой в биореакторе с одноразовым мешком (рабочим объемом 5 л), работающем в периодическом режиме с подпиткой, концентрация собранного антитела 2 г/л была достигнута в течение 9 недель после трансфекции.

Векторы pCon VectorsTM - это простой способ повторной экспрессии цельных антител. Векторы с константной областью представляют собой набор векторов, предлагающих ряд векторов с константными областями иммуноглобулинов, клонированных в векторы pEE. Эти векторы обеспечивают возможность простого конструирования полноразмерных антител с константными областями человека и удобства применения GS SystemTM.

Молекулы антител включают фрагменты (такие как F(ab'), F(ab')₂), которые образуются, например, в результате протеолитического расщепления mAb, или одноцепочечные иммуноглобулины, получаемые, например, при использовании рекомбинантных методов. Такие производные антител являются моновалентными. В одном варианте осуществления такие фрагменты можно комбинировать друг с другом или с другими фрагментами антител или лигандами рецепторов с получением "химерных" связывающих молекул. Важно отметить, что такие химерные молекулы могут содержать заместители, способные связываться с разными эпитопами одной и той же молекулы.

Может потребоваться "гуманизировать" антитела, продуцированные в не относящихся к человеку хозяевах, чтобы ослабить какой-либо иммунный ответ при медицинском применении в терапии. Такие гуманизированные антитела можно исследовать в контексте *in vitro* или *in vivo*. Гуманизированные антитела могут быть получены, например, при замене иммуногенной части антитела соответствующей, но не иммуногенной, частью (т.е. химерные антитела). Заявка PCT PCT/US86/02269; заявка EP 184,187; заявка EP 171,496; заявка EP 173,494; заявка PCT WO 86/01533; заявка EP 125,023; и публикации Sun et al. (1987); Wood et al. (1985); and Shaw et al. (1988 г.) включены в настоящий документ посредством отсылки. Общие обзоры по "гуманизированным" химерным антителам представлены в Morrison (1985) и также

включены в настоящий документ посредством отсылки. В альтернативе "гуманизированные" антитела могут быть получены путем замены CDR или CEA. См. Jones et al. (1986); Verhoeven et al. (1988); Beidler et al. (1988), включенные в настоящий документ посредством отсылки.

В подобных вариантах осуществления антитело представляет собой производное раскрытых антител, например, антитело, включающее CDR-последовательности, идентичные соответствующим последовательностям раскрытых антител (например, химерное, гуманизированное или CDR-перевитое антитело). В еще одном варианте осуществления антитело является полностью человеческим рекомбинантным антителом.

Модификация Fc. В настоящем изобретении также предусмотрена модификация изотипа. Путем модификации Fc-области с получением другого изотипа могут быть достигнуты другие функциональности. Например, замена на IgG₁ может усиливать антителозависимую клеточную цитотоксичность, замена на класс A может улучшить распределение в ткани, и замена на класс M может повысить валентность.

Альтернативно или дополнительно может быть полезным комбинировать модификации аминокислот с одной или больше дополнительными модификациями аминокислот, которые изменяют функцию связывания C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) Fc-области молекулы, связывающей IL-23p19. Связывающий полипептид, представляющий особый интерес, может быть полипептидом, который связывается с C1q и проявляет комплементзависимую цитотоксичность. Полипептиды с ранее существовавшей C1q-связывающей активностью, необязательно дополнительно обладающие способностью опосредовать CDC, могут быть модифицированы таким образом, что одна или обе эти активности усиливаются. Аминокислотные модификации, которые изменяют C1q и/или модифицируют его комплементзависимую цитотоксичность, описаны, например, в WO/0042072, которая включена в настоящее описание посредством отсылки.

Можно сконструировать Fc-область антитела с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания C1q и/или связывания FcγR и, таким образом, изменения активности CDC и/или активности ADCC. "Эффекторные функции" отвечают за активацию или снижение биологической активности (например, у субъекта). Примеры эффекторных функций включают, без ограничения этим: связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; даунрегуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции могут потребовать объединения Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела) и могут быть оценены с помощью различных анализов (например, анализов связывания Fc, анализов ADCC, анализов CDC и т.д.).

Например, можно создать вариант Fc-области антитела с улучшенным связыванием C1q и улучшенным связыванием FcγRIII (например, обладающим как

повышенной активностью ADCC, так и повышенной активностью CDC). В альтернативе, если требуется, чтобы эффекторная функция была снижена или удалена, может быть сконструирован вариант Fc-области с пониженной активностью CDC и/или пониженной активностью ADCC. В других вариантах осуществления может быть повышена только одна из этих активностей и, необязательно, также может быть снижена другая активность (например, для создания варианта Fc-области с улучшенной ADCC активностью, но сниженной CDC активностью, и наоборот).

Связывание FcRn. Мутации Fc также могут быть введены и созданы для изменения для изменения их взаимодействия с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и улучшения их фармакокинетических свойств. Описана коллекция вариантов Fc человека с улучшенным связыванием с FcRn (Shields et al., (2001), High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R, J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Известен ряд методов, которые могут привести к увеличению периода полувыведения (Kuo and Aveson, (2011)), в том числе аминокислотные модификации могут быть сделаны с помощью методов, включающих аланин-сканирующий мутагенез, случайный мутагенез и скрининг для оценки связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и/или свойств *in vivo*. Стратегии компьютерного моделирования с последующим мутагенезом также могут использоваться для выбора одной из аминокислотных мутаций для мутации.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен вариант антигенсвязывающего белка с оптимизированным связыванием с FcRn. В конкретном варианте осуществления указанный вариант антигенсвязывающего белка включает по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области указанного антигенсвязывающего белка, где указанная модификация выбрана из группы, состоящей из 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 и 447 Fc-области по сравнению с указанным исходным полипептидом, где нумерация аминокислот в Fc-области соответствует EU-индексу согласно Кэбату. В другом аспекте изобретения модификациями являются M252Y/S254T/T256E.

Кроме того, в различных публикациях описаны способы получения физиологически активных молекул с измененным периодом полувыведения, см., например, Kontermann (2009), либо путем введения FcRn-связывающего полипептида в такие молекулы, либо путем слияния таких молекул с антителами, аффинность связывания FcRn которых сохранена, но аффинность к другим Fc-рецепторам значительно снижена, или путем слияния с FcRn-связывающими доменами антител.

Дериватизированные антитела можно использовать для изменения периодов

полувыведения (например, полупериодов существования в сыворотке) исходных антител у млекопитающего, в частности у человека. Такие изменения могут привести к увеличению периода полувыведения на больше чем 15 дней, предпочтительно больше чем 20 дней, больше чем 25 дней, больше чем 30 дней, больше чем 35 дней, больше чем 40 дней, больше чем 45 дней, больше чем 2 месяца, больше чем 3 месяца, больше чем 4 месяца или больше чем 5 месяцев. Увеличенный период полувыведения антител согласно настоящему изобретению или их фрагментов у млекопитающего, предпочтительно человека, приводит к более высокому титру указанных антител или фрагментов антител в сыворотке млекопитающего и, таким образом, снижает частоту введения указанных антител или фрагментов антител и/или снижает концентрацию указанных антител или фрагментов антител, подлежащих введению. Антитела или их фрагменты с повышенным периодом полужизни *in vivo* могут быть получены методами, известными специалистам в данной области. Например, антитела или их фрагменты с увеличенным периодом полувыведения *in vivo* могут быть получены путем модификации (например, замены, делеции или добавления) аминокислотных остатков, идентифицированных как участвующие во взаимодействии между Fc-доменом и FcRn-рецептором.

Бельтрамелло с соавт. (Beltramello et al., 2010) ранее сообщали о модификации нейтрализующих моноклональных антител из-за их тенденции усиливать инфекцию, вызванную вирусом денге, путем получения мутаций, в результате которых остатки лейцина в положениях 1.3 и 1.2 домена CH2 (согласно уникальной нумерации IMGT для C-домена) были заменены остатками аланина. Такая модификация, также известная как "LALA" мутация, приводит к потере связывания антител с FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa, как описано в Hessel et al. (2007). Вариант и немодифицированные рекомбинантные мАт сравнивали по способности нейтрализовать и усиливать инфекцию четырех серотипов вируса денге. Варианты LALA сохраняли такую же нейтрализующую активность, что и немодифицированные мАт, но были полностью лишены усиливающей активности. Таким образом, LALA мутации такого характера рассматриваются в контексте антител, раскрытых в настоящем изобретении.

Измененное гликозилирование. Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие по существу гомогенный гликан без сиаловой кислоты, галактозы или фукозы. Моноклональное антитело включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, которые могут быть присоединены к константным областям тяжелой цепи или легкой цепи соответственно. Вышеуказанный по существу гомогенный гликан может быть ковалентно присоединен к константной области тяжелой цепи.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает мАт с новым профилем гликозилирования Fc. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует по существу в гомогенной композиции, представленной гликоформой GNGN или G1/G2. Гликозилирование Fc играет важную

роль в противовирусных и противораковых свойствах терапевтических мАт. Изобретение согласуется с недавним исследованием, которое демонстрирует повышенное антилентивирусное клеточно-опосредованное вирусное ингибирование не содержащего фукозы мАт против ВИЧ *in vitro*. Этот вариант осуществления настоящего изобретения с гомогенными гликанами, не содержащими внутренней фукозы, продемонстрировал больше чем в два раза повышенную защиту от конкретных вирусов. Удаление внутренней фукозы резко усиливает ADCC-активность мАт, опосредованную естественными киллерными (NK) клетками, но, по-видимому, оказывает противоположное влияние на ADCC-активность полиморфноядерных клеток (PMN).

Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие по существу гомогенную композицию, представленную гликоформой GNGN или G1/G2, демонстрируют повышенную аффинность связывания с Fc-гамма RI и Fc-гамма RIII по сравнению с таким же антителом без по существу гомогенной гликоформы GNGN и содержащим гликоформы G0, G1F, G2F, GNF, GNGNF или GNGNFX. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело диссоциирует с Fc-гамма RI с $K_d 1 \times 10^{-8}$ М или меньше и с Fc-гамма RIII с $K_d 1 \times 10^{-7}$ М или меньше.

Гликозилирование Fc-области обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, чаще всего к серину или треонину, хотя также может использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к пептидным последовательностям боковой цепи аспарагина представляют собой аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. Таким образом, присутствие любой из этих пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

Профиль гликозилирования можно изменять, например, путем делеции одного или больше сайтов гликозилирования, присутствующих в полипептиде, и/или путем добавления одного или больше сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в полипептиде. Добавление сайтов гликозилирования в Fc-область антитела можно удобно производить путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или больше вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Иллюстративный вариант гликозилирования содержит аминокислотную замену остатка Asn 297 тяжелой цепи. Изменение также может быть сделано путем добавления или замены одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного полипептида (для сайтов O-связанного гликозилирования). Кроме того, замена Asn 297 на Ala может привести к удалению одного из сайтов гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления антитело экспрессируется в клетках, которые экспрессируют бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT III), в результате GnT III присоединяет GlcNAc к антителу IL-23p19. Способы получения антител таким путем представлены в WO/9954342, WO/03011878, патентной публикации 20030003097A1 и в Umana et al., *Nature Biotechnology*, 17:176-180, February 1999. Линии клеток могут быть изменены для повышения или снижения, или устранения некоторых посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, при использовании технологии редактирования генома, такой как регулярно расположенные кластерами короткие палиндромные повторы (CRISPR). Например, технология CRISPR может использоваться для удаления генов, кодирующих гликозилирующие ферменты в клетках 293 или CHO, используемых для экспрессии рекомбинантных моноклональных антител.

Устранение уязвимых мотивов в белковых последовательностях моноклональных антител. Можно сконструировать последовательности переменных генов антител, полученных из человеческих В-клеток, чтобы улучшить возможность их производства и безопасность. Потенциальные уязвимые сайты в белковых последовательностях могут быть идентифицированы путем поиска в последовательностях мотивов, связанных с сайтами, содержащими:

- 1) Неспаренные остатки Cys,
- 2) N-связанное гликозилирование,
- 3) Дезамидирование Asn,
- 4) Изомеризация Asp,
- 5) Усечение SYE,
- 6) Окисление Met,
- 7) Окисление Trp,
- 8) N-концевой глутамат,
- 9) Связывание интегрин,
- 10) Связывание CD11c/CD18, или
- 11) Фрагментация

Такие мотивы могут быть удалены путем изменения синтетического гена для кДНК, кодирующей рекомбинантные антитела.

Усилия по применению белковой инженерии в области разработки терапевтических антител четко показывают, что некоторые последовательности или остатки ассоциированы с различиями в растворимости (Fernandez-Escamilla et al., *Nature Biotech.*, 22 (10), 1302-1306, 2004; Chennamsetty et al., *PNAS*, 106 (29), 11937-11942, 2009; Voynov et al., *Biocon. Chem.*, 21 (2), 385-392, 2010). Представленные в литературе сообщения о мутациях, изменяющих растворимость, указывают на то, что некоторые гидрофильные остатки, такие как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и серин, вносят значительно больший вклад в растворимость белка, чем другие гидрофильные остатки, такие как аспарагин, глутамин, треонин, лизин и аргинин.

Стабильность. Антитела могут быть сконструированы с целью улучшения

биофизических свойств. Можно использовать повышенную температуру для разворачивания антител, чтобы определить относительную стабильность при использовании средних значений кажущейся температуры плавления. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) позволяет измерять теплоемкость, C_p , молекулы (количество тепла, требуемое для повышения ее температуры на один градус) в зависимости от температуры. ДСК можно использовать для исследования термостабильности антител. Данные ДСК для мАт представляют особый интерес, поскольку иногда они устанавливают разворачивание отдельных доменов в структуре мАт с получением до трех пиков на термограмме (в результате разворачивания Fab, C_{H2} и C_{H3} доменов). Обычно разворачивание Fab-домена дает самый сильный пик. Профили ДСК и относительная стабильность Fc-фрагмента показывают характерные различия для подклассов IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ человека (Garber and Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 751-757, 2007). Также можно определить среднюю кажущуюся температуру плавления с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма (КД), проводимой на КД-спектрометре. Спектры КД в дальнем УФ-диапазоне для антител измеряют в диапазоне от 200 до 260 нм с шагом 0,5 нм. Окончательные спектры можно определить как средние по данным 20 измерений. Значения остаточной эллиптичности можно вычислить после вычитания фона. Термическое разворачивание антител (0,1 мг/мл) можно наблюдать при 235 нм в диапазоне 25-95°C и при скорости нагрева 1°C/мин. Для оценки склонности к агрегации можно использовать динамическое светорассеяние (ДСР). ДСР используют для определения размера различных частиц, включая белки. Если система не является дисперсной по размеру, можно определить средний эффективный диаметр частиц. Это измерение зависит от размера ядра частицы, размера поверхностных структур и концентрации частиц. Поскольку ДСР по существу измеряет колебания интенсивности рассеянного света, обусловленной частицами, можно определить коэффициент диффузии частиц. Программное обеспечение для ДСР в коммерческих приборах DLA отображает популяцию частиц разного диаметра. Исследования стабильности удобно проводить с помощью ДСР. Измерения ДСР образца могут показать, агрегируют ли частицы с течением времени или при изменении температуры, путем определения, увеличивается ли гидродинамический радиус частицы. Если частицы агрегируют, то можно увидеть более крупную популяцию частиц, имеющих больший радиус. Стабильность в зависимости от температуры можно проанализировать, регулируя температуру *in situ*. Методики капиллярного электрофореза (КЭ) включают надежные методы определения показателей стабильности антител. Можно использовать подход iSE для определения зарядовых вариантов белков антител в результате дезамидирования, C-концевых лизинов, сиалилирования, окисления, гликозилирования и любых других изменений в белке, которые могут привести к изменению pI белка. Каждый из экспрессированных белков антител можно оценивать с помощью высокопроизводительного изоэлектрического фокусирования в свободном растворе (ИЭФ) в капиллярной колонке (КИЭФ) с использованием прибора Protein Simple Maurice.

УФ-детектирование по всей длине колонки можно выполнять каждые 30 секунд для мониторинга в реальном времени молекул, фокусирующихся в изоэлектрических точках (pI). Данный подход сочетает в себе высокое разрешение традиционного гель-ИЭФ с преимуществами количественного анализа и автоматизации, характерными для колоночного разделения, с устранением необходимости в этапе мобилизации. Данный метод обеспечивает воспроизводимый количественный анализ профилей идентичности, чистоты и гетерогенности экспрессированных антител. Результаты позволяют определять гетерогенность заряда и молекулярный размер антител в режимах обнаружения по поглощению и по естественной флуоресценции, и с чувствительностью обнаружения до 0,7 мкг/мл.

Растворимость. Можно определить показатель собственной растворимости последовательностей антител. Показатели собственной растворимости можно вычислить с использованием CamSol Intrinsic (Sormanni et al., J Mol Biol 427, 478-490, 2015). Аминокислотные последовательности для остатков 95-102 (нумерация Кэбата) в HCDR3 каждого фрагмента антитела, такого как scFv, можно оценивать с помощью онлайн-программы для расчета показателей растворимости. Растворимость также можно определять с помощью лабораторных методов. Существуют различные методы, включающие добавление лиофилизированного белка в раствор до тех пор, пока раствор не станет насыщенным и не будет достигнут предел растворимости, или концентрирование путем ультрафильтрации в микроконцентраторе с подходящим отсечением по молекулярной массе. Наиболее простым методом является индукция аморфного осаждения, при котором растворимость белка измеряют с помощью метода, включающего осаждение белка при использовании сульфата аммония (Trevino et al., J Mol Biol, 366: 449-460, 2007). Осаждение сульфатом аммония дает быструю и точную информацию о значениях относительной растворимости. Осаждение сульфатом аммония дает осажденные растворы с четко определенными водной и твердой фазами и требует относительно небольших количеств белка. Измерения растворимости, выполненные с использованием индукции аморфного осаждения сульфатом аммония также можно легко проводить при различных значениях pH. Растворимость белка сильно зависит от pH, и pH считается наиболее важным внешним фактором, влияющим на растворимость.

Аутореактивность. Обычно считается, что аутореактивные клоны должны удаляться в онтогенезе при негативной селекции, однако стало ясно, что многие природные человеческие антитела с аутореактивными свойствами сохраняются во взрослых зрелых репертуарах, при этом аутореактивность может усиливать противовирусную функцию многих антител в отношении патогенов. Было отмечено, что петли HCDR3 в антителах во время раннего развития В-клеток часто обогащены положительным зарядом и демонстрируют аутореактивные профили (Wardemann et al., Science 301, 1374-1377, 2003). Можно протестировать каждое антитело на аутореактивность, оценивая уровень связывания с клетками человеческого происхождения при микроскопии (с использованием адгерентных эпителиальных клеток

HeLa или HEp-2) и окрашивании поверхности клеток методом проточной цитометрии (с использованием суспензии Т-клеток Jurkat и эмбриональных клеток почек человека 293S). Аутореактивность также можно исследовать с использованием оценки связывания с тканями на панелях тканевых образцов.

Предпочтительные остатки ("Человеческое подобие"). Глубокое секвенирование репертуара человеческих В-клеток доноров крови проводят в широком масштабе во многих последних исследованиях. Информация о последовательностях значительной части репертуара антител человека облегчает статистическую оценку особенностей последовательностей антител, характерных для здоровых людей. Обладая сведениями о характеристиках последовательностей антител в базе данных рекомбинированных переменных генов человеческих антител, можно оценивать специфическую для каждого положения степень "человеческого подобия" (HL) последовательности антител. Было показано, что HL полезно для разработки антител в целях клинического применения, таких как терапевтические антитела или антитела в качестве вакцин. Цель состоит в увеличении подобия антител с антителами человека, чтобы снизить потенциальные побочные эффекты и иммунные ответы против антител, которые приведут к значительному снижению эффективности препарата на основе антител или могут вызвать серьезные последствия для здоровья. Можно оценивать характеристики антител из комбинированного репертуара антител человека у трех здоровых доноров крови, в общей сложности около 400 миллионов последовательностей, и создать новый индекс "относительного человеческого подобия" (гHL), которая сосредоточена на гипервариабельной области антитела. Индекс гHL позволяет легко различать человеческие (положительные оценки) и нечеловеческие последовательности (отрицательные оценки). Антитела можно сконструировать для удаления остатков, которые не характерны для человеческого репертуара.

Модифицированные антитела могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области, включая экспрессию с применением стандартных методов молекулярной биологии или химический синтез полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии рассматриваются в другой части данного документа.

D. Экспрессия

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению будут кодировать антитела, необязательно соединенные с другими белковыми последовательностями. При использовании в настоящей заявке термин "нуклеиновая кислота, кодирующая антитело MUC1-C" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была выделена в свободном виде из суммарной клеточной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к антителам, которые кодируются любой из последовательностей, представленных в настоящем документе.

ТАБЛИЦА 2 - КОДОНЫ

Аминокислоты			Кодоны
Аланин	Ala	A	GCA GCC GCG GCU

Цистеин	Cys	C	UGC UGU
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC GAU
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенилаланин	Phe	F	UUC UUU
Глицин	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Гистидин	His	H	CAC CAU
Изолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лизин	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метионин	Met	M	AUG
Аспарагин	Asn	N	AAC AAU
Пролин	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамин	Gln	Q	CAA CAG
Аргинин	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонин	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валин	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU

Сегменты ДНК согласно настоящему изобретению включают сегменты, кодирующие биологически функциональные эквиваленты белков и пептидов описанных выше последовательностей. Такие последовательности могут возникать как следствие представленности кодонов и функциональной эквивалентности аминокислот, которые, как известно, обычно присутствуют в последовательностях нуклеиновых кислот и белках, кодируемых таким образом. В альтернативе функционально эквивалентные белки или пептиды могут быть созданы с применением технологии рекомбинантных ДНК, в которой изменения в структуре белка можно ввести с учетом свойств подвергаемых замене аминокислот. Изменения, разработанные человеком, могут быть введены с применением методов сайт-направленного мутагенеза или могут быть введены случайным образом, а позже подвергнуты скринингу на предмет нужной функции, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии используются для экспрессии ловушки лиганда MUC1-C с целью получения и выделения полипептида, экспрессируемого с них. В других вариантах осуществления векторы экспрессии используются в генотерапии. Экспрессия требует присутствия в векторах соответствующих сигналов, которые включают различные регуляторные элементы, такие как энхансеры/промоторы из вирусных и млекопитающих источников, которые направляют экспрессию представляющих интерес генов в клетках-хозяевах. Также определены элементы, предназначенные для оптимизации стабильности и транскрируемости матричной РНК в клетках-хозяевах. Также предоставлены условия для применения ряда доминантных маркеров селекции с лекарственными средствами для создания устойчивых, стабильных клеточных клонов, экспрессирующих продукты, а также элемент, который связывает экспрессию маркеров селекции с лекарственными средствами с экспрессией полипептида.

В тексте настоящей заявки термин "экспрессионная конструкция" включает любой

тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт гена, в котором часть или вся кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты способна транскрибироваться. Транскрипт может транслироваться в белок, но это не обязательно. В некоторых вариантах осуществления экспрессия включает как транскрипцию гена, так и трансляцию мРНК в продукт гена. В других вариантах осуществления экспрессия включает только транскрипцию нуклеиновой кислоты, кодирующей нужный ген.

Термин "вектор" используется для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты-носителя, в которую может быть встроена последовательность нуклеиновой кислоты для введения в клетку, в которой она может реплицироваться. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть "экзогенной", что означает то, что она является чужеродной для клетки, в которую вводят вектор, или что последовательность гомологична последовательности в клетке, но находится в положении внутри нуклеиновой кислоты клетки-хозяина, в котором такая последовательность обычно не присутствует. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC). Специалист в данной области сумеет сконструировать вектор с помощью стандартных рекомбинантных технологий, которые описаны в Sambrook et al. (1989) и Ausubel et al. (1994), которые включены в настоящий документ посредством отсылки.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую, по меньшей мере, часть продукта гена, способную к транскрипции. В некоторых случаях молекулы РНК затем транслируются в белок, полипептид или пептид. В других случаях эти последовательности нетранслируемые, например, при продукции антисмысловых молекул или рибозимов. Векторы экспрессии могут содержать различные "регуляторные последовательности", которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к регуляторным последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы и векторы экспрессии могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и описаны ниже.

1. Регуляторные элементы

"Промотор" представляет собой регуляторную последовательность, которая является областью последовательности нуклеиновой кислоты, в которой регулируются инициация и уровень транскрипции. Он может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. Фразы "функционально расположенный", "функционально связанный", "под контролем" и "под транскрипционным контролем" означают, что промотор находится в правильном функциональном положении и/или ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты для регуляции

инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. Промотор может использоваться или не использоваться в сочетании с "энхансером", который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

Промотор может быть промотором, который обычно связан с геном или последовательностью, что можно обеспечивать при выделении 5' некодирующих последовательностей, расположенных перед кодирующим сегментом и/или экзоном. Такой промотор может называться "эндогенным". Аналогичным образом, энхансер может быть энхансером, который обычно связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной после указанной последовательности или перед ней. В альтернативе определенные преимущества могут быть получены при помещении кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении.

Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любой другой прокариотической, вирусной или эукариотической клетки, а также промоторы или энхансеры, не "встречающиеся в природе", т.е. содержащие различные элементы различных областей регуляции транскрипции и/или мутации, которые изменяют экспрессию. В дополнение к получению последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности могут быть получены при использовании технологий рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР, в сочетании с композициями, раскрытыми в настоящем документе (см. патент США 4,683,202, патент США 5,928,906, которые включены в настоящий документ посредством отсылки). Кроме того, также предусмотрены регуляторные последовательности, которые направляют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

Соответственно, важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в клетке определенного типа, органелле и организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии обычно известно использование промоторов, энхансеров и комбинаций типов клеток для экспрессии белка, например, см. руководство Sambrook et al. (1989), включенное в настоящий документ посредством отсылки. Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцируемыми и/или подходящими в соответствующих условиях для направления высокого уровня экспрессии введенного сегмента ДНК, что представляет преимущество при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть

гетерологичным или эндогенным.

В Таблице 3 перечислены несколько элементов/промоторов, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения для регуляции экспрессии гена. Данный перечень не является исчерпывающим в отношении всех возможных элементов, связанных с индукцией экспрессии, а просто служит в качестве их примера. В Таблице 4 приведены примеры индуцируемых элементов, которые представляют собой области последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут быть активированы в ответ на определенный стимул.

ТАБЛИЦА 3	
Промотор и/или энхансер	
Промотор/Энхансер	Ссылки
Тяжелая цепь иммуноглобулина	Banerji et al., 1983; Gilles et al., 1983; Grosschedl et al., 1985; Atchinson et al., 1986, 1987; Imler et al., 1987; Weinberger et al., 1984; Kiledjian et al., 1988; Porton et al.; 1990
Легкая цепь иммуноглобулина	Queen et al., 1983; Picard et al., 1984
T-клеточный рецептор	Luria et al., 1987; Winoto et al., 1989; Redondo et al.; 1990
HLA DQ α и/или DQ β	Sullivan et al., 1987
β -интерферон	Goodbourn et al., 1986; Fujita et al., 1987; Goodbourn et al., 1988
Интерлейкин 2	Greene et al., 1989
Рецептор интерлейкина 2	Greene et al., 1989; Lin et al., 1990
МНС класса II 5	Koch et al., 1989
МНС класса II HLA-DR α	Sherman et al., 1989
ТАБЛИЦА 3	
Промотор и/или энхансер	
β -актин	Kawamoto et al., 1988; Ng et al.; 1989
Креатинкиназа мышц (МСК)	Jaynes et al., 1988; Horlick et al., 1989; Johnson et al., 1989
Преальбумин (транстиретин)	Costa et al., 1988
Эластаза I	Ornitz et al., 1987
Металлотионеин (МТИ)	Karin et al., 1987; Culotta et al., 1989
Коллагеназа	Pinkert et al., 1987; Angel et al., 1987
Альбумин	Pinkert et al., 1987; Tronche et al., 1989, 1990
α -фетопротеин	Godbout et al., 1988; Campere et al., 1989
t-глобин	Bodine et al., 1987; Perez-Stable et al., 1990
β -глобин	Trudel et al., 1987
c-fos	Cohen et al., 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps et al., 1985
Инсулин	Edlund et al., 1985
Молекула адгезии нервных клеток (NCAM)	Hirsh et al., 1990
α_1 -антитрипсин	Latimer et al., 1990
Гистон H2B (TH2B)	Hwang et al., 1990
Коллаген мышцы и/или I типа	Ripe et al., 1989
Глюкозо-регулируемые белки	Chang et al., 1989

(GRP94 и GRP78)	
Гормон роста крысы	Larsen et al., 1986
Сывороточный амилоид А человека (SAA)	Edbrooke et al., 1989
Тропонин I (TN I)	Yutzey et al., 1989
Фактор роста тромбоцитов (PDGF)	Pech et al., 1989
Миодистрофия Дюшенна	Klamut et al., 1990
SV40	Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981; Sleigh et al., 1985; Firak et al., 1986; Herr et al., 1986; Imbra et al., 1986; Kadesch et al., 1986; Wang et al., 1986; Ondek et al., 1987; Kuhl et al., 1987; Schaffner et al., 1988
Полиома	Swartzendruber et al., 1975; Vasseur et al., 1980; Katinka et al., 1980, 1981; Tyndell et al., 1981; Dandolo et al., 1983; de Villiers et al., 1984; Hen et al., 1986; Satake et al., 1988; Campbell и/или Villarreal, 1988
Ретровирусы	Kriegler et al., 1982, 1983; Levinson et al., 1982; Kriegler et al., 1983, 1984a, b, 1988; Bosze et al., 1986; Miksicsek et al., 1986; Celander et al., 1987; Thiesen et al., 1988; Celander et al., 1988; Choi et al., 1988; Reisman et al., 1989
ТАБЛИЦА 3 Промотор и/или энхансер	
Вирус папилломы	Campo et al., 1983; Lusky et al., 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz et al., 1985; Lusky et al., 1986; Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1987; Hirochika et al., 1987; Stephens et al., 1987; Glue et al., 1988
Вирус гепатита В	Bulla et al., 1986; Jameel et al., 1986; Shaul et al., 1987; Spandau et al., 1988; Vannice et al., 1988
Вирус иммунодефицита человека	Muesing et al., 1987; Hauber et al., 1988; Jakobovits et al., 1988; Feng et al., 1988; Takebe et al., 1988; Rosen et al., 1988; Berkhout et al., 1989; Laspia et al., 1989; Sharp et al., 1989; Braddock et al., 1989
Цитомегаловирус (ЦМВ)	Weber et al., 1984; Boshart et al., 1985; Foecking et al., 1986
Вирус лейкоза гиббонов	Holbrook et al., 1987; Quinn et al., 1989

ТАБЛИЦА 4 Индукцируемые элементы		
Элемент	Индуктор	Ссылки
MT II	Сложный форболовый эфир (ТФА) Тяжелые металлы	Palmiter et al., 1982; Haslinger et al., 1985; Searle et al., 1985; Stuart et al., 1985; Imagawa et al., 1987, Karin et al., 1987; Angel et al., 1987b; McNeall et al., 1989
MMTV (вирус опухоли молочной железы мышей)	Глюкокортикоиды	Huang et al., 1981; Lee et al., 1981; Majors et al., 1983; Chandler et al., 1983; Lee et al., 1984; Ponta et al., 1985; Sakai et al., 1988

β-интерферон	поли-(гI)х поли-(гс)	Tavernier et al., 1983
Аденовирус 5 E2	E1A	Imperiale et al., 1984
Коллагеназа	Сложный форболовый эфир (ТРА)	Angel et al., 1987a
Стромелизин	Сложный форболовый эфир (ТРА)	Angel et al., 1987b
SV40	Сложный форболовый эфир (ТРА)	Angel et al., 1987b
Ген МХ мыши	Интерферон, вирус атипичной чумы	Hug et al., 1988
Ген GRP78	A23187	Resendez et al., 1988
α-2-макроглобулин	IL-6	Kunz et al., 1989
Виментин	Сыворотка	Rittling et al., 1989
Ген МНС класса I H-2kb	Интерферон	Blonar et al., 1989
ТАБЛИЦА 4 Индуклируемые элементы		
HSP70	E1A, большой Т-антиген SV40	Taylor et al., 1989, 1990a, 1990b
Пролиферин	Сложный форболовый эфир-ТРА	Mordacq et al., 1989
Фактор некроза опухоли	РМА	Hensel et al., 1989
Ген тиреотропного гормона α	Гормон щитовидной железы	Chatterjee et al., 1989

Идентичность тканеспецифических промоторов или элементов, а также анализы для характеристики их активности хорошо известны специалистам в данной области. Примеры таких областей включают ген LIMK2 человека (Nomoto et al., 1999), ген рецептора соматостатина 2 (Kraus et al., 1998), ген мышинового эпидидимального ретиноевая кислота-связывающего белка (Lareyre et al., 1999), CD4 человека (Zhao-Emonet et al., 1998), мышинный коллаген альфа 2 (XI) (Tsumaki et al., 1998), ген дофаминового рецептора D1A (Lee, et al., 1997), инсулиноподобный фактор роста II (Wu et al. ., 1997), молекула адгезии эндотелиальных клеток тромбоцитов человека 1 (Almendro et al., 1996). Опухолеспецифические промоторы также находят применение в настоящем изобретении. Некоторые такие промоторы представлены в Таблице 5.

ТАБЛИЦА 5 - КАНДИДАТНЫЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОМОТОРЫ ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ РАКА

Тканеспецифический промотор	Раковые опухоли, в которых активен промотор	Нормальные клетки, в которых активен промотор
Раково-эмбриональный антиген (РЭА)*	Большинство колоректальных карцином; 50% карцином легкого; 40-50% карцином желудка; большинство карцином поджелудочной железы; множество карцином молочной железы	Слизистая оболочка толстой кишки; слизистая оболочка желудка; эпителий легких; экзокринные потовые железы; клетки в яичках

Простатический специфический антиген (ПСА)	Большинство карцином предстательной железы	Эпителий предстательной железы
Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП)	Большинство форм немелкоклеточного рака легкого	Нейроны; лимфоциты; тучные клетки; эозинофилы
Сурфактантный белок А (SP-A)	Множество клеток аденокарцином легких	Пневмоциты II типа; клетки Клара
Гомолог achaete-scute у человека (hASH)	Большинство форм мелкоклеточного рака легкого	Нейроэндокринные клетки в легких
Муцин-1 (MUC1)**	Большинство аденокарцином (происходящих из любой ткани)	Клетки железистого эпителия в молочной железе и в дыхательных путях, желудочно-кишечном тракте и мочеполовой системе
Альфа-фетопроtein	Большинство гепатоцеллюлярных карцином; возможно много форм рака яичка	Гепатоциты (при определенных условиях); яичко
Альбумин	Большинство гепатоцеллюлярных карцином	Гепатоциты
Тирозиназа	Большинство меланом	Меланоциты; астроциты; шванновские клетки; некоторые нейроны
Тирозин-связывающий белок (TRP)	Большинство меланом	Меланоциты; астроциты, шванновские клетки; некоторые нейроны
Кератин 14	Предположительно много плоскоклеточных карцином (например, злокачественные опухоли головы и шеи)	Кератиноциты
LD-2 ВЭБ	Много плоскоклеточных карцином головы и шеи	Кератиноциты верхних отделов желудочно-кишечного тракта
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	Много астроцитом	Астроциты
Основной белок миелина (MBP)	Много глиом	Олигодендроциты
Тестикулярный ангиотензинпревращающий фермент (тестикулярный АПФ)	Возможно много форм рака яичка	Сперматозоиды
Остеокальцин	Возможно много остеогенных сарком	Остеобласты
E2F-регулируемый промотор	Почти все раковые опухоли	Пролиферирующие клетки
HLA-G	Много колоректальных карцином; много меланом; возможно много других форм рака	Лимфоциты; моноциты; сперматоциты; трофобласты

FasL	Большинство меланом; множество карцином поджелудочной железы; большинство астроцитом, возможно много других форм рака	Активированные лейкоциты: нейроны; эндотелиальные клетки; кератиноциты; клетки в иммунопривилегированных тканях; некоторые клетки в легких, яичниках, печени и предстательной железе
Мус-регулируемый промотор	Большинство карцином легких (мелкоклеточных и немелкоклеточных); большинство колоректальных карцином	Пролиферирующие клетки (только некоторые типы клеток): клетки эпителия молочной железы (в том числе непролиферирующие)
MAGE-1	Множество меланом; некоторые немелкоклеточные карциномы легкого; некоторые карциномы молочной железы	Яичко
VEGF	70% всех раковых опухолей (конститутивная оверэкспрессия во многих злокачественных опухолях)	Клетки в участках неоваскуляризации (но, в отличие от опухолей, экспрессия является транзистентной, менее сильной и никогда не бывает конститутивной),
bFGF	Предположительно много различных форм рака, поскольку экспрессия bFGF вызвана ишемическими состояниями	Клетки в участках ишемии (но, в отличие от опухолей, экспрессия является транзистентной, менее сильной и никогда не бывает конститутивной),
ЦОГ-2	Большинство колоректальных карцином; множество карцином легкого; возможно много других форм рака	Клетки в участках воспаления
IL-10	Большинство колоректальных карцином; множество карцином легкого; множество плоскоклеточных карцином головы и шеи; возможно множество других форм рака	Лейкоциты
GRP78/BiP	Предположительно много различных форм рака, поскольку экспрессия GRP78 вызвано опухолеспецифическими состояниями	Клетки на местах ишемии

CarG-элементы из Egr-1	Индукцируются ионизирующим излучением, поэтому, очевидно, большинство опухолей, возникающих при облучении	Клетки, подвергающиеся воздействию ионизирующего излучения; лейкоциты
------------------------	---	---

Для эффективной трансляции кодирующих последовательностей также может потребоваться специфический сигнал инициации. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG или примыкающие последовательности. Могут потребоваться экзогенные сигналы регуляции трансляции, включая иницирующий кодон ATG. Средний специалист в данной области сумеет легко определить их и предоставить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться "в рамке" считывания требуемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Экзогенные сигналы контроля трансляции и старт-кодоны могут быть природными или синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения соответствующих энхансерных элементов транскрипции.

2. IRES

В некоторых вариантах осуществления изобретения элементы участков внутренней посадки рибосомы (IRES) используются для создания мультигенных, или полицистронных, мРНК. Элементы IRES позволяют обойти модель сканирования рибосомы при зависимой от 5'-метилированного кэпа трансляции и начать трансляцию на внутренних участках (Pelletier and Sonenberg, 1988). Были описаны элементы IRES из двух представителей семейства пикорнавирусов (вирусов полиомиелита и энцефаломиокардита) (Pelletier and Sonenberg, 1988), а также IRES из мРНК млекопитающих (Masejak and Sarnow, 1991). Элементы IRES могут быть соединены с гетерологичными открытыми рамками считывания. Несколько открытых рамок считывания могут транскрибироваться вместе, причем каждая отделена IRES, с образованием полицистронных транскриптов. При посредстве элемента IRES каждая открытая рамка считывания становится доступной для рибосом для эффективной трансляции. Множество генов могут эффективно экспрессироваться при использовании одного промотора/энхансера для транскрипции единой мРНК (см. патенты США 5,925,565 и 5,935,819, включенные в настоящий документ посредством отсылки).

3. Универсальные сайты клонирования

Векторы могут включать сайт множественного клонирования (MCS), которое является областью нуклеиновой кислоты, содержащей множественные сайты эндонуклеаз рестрикции, любой из которых может использоваться в сочетании со стандартной рекомбинантной технологией для расщепления вектора. См. Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, и Cosca, 1997, включенные в настоящий документ посредством отсылки. "Расщепление эндонуклеазой рестрикции" относится к каталитическому расщеплению молекулы нуклеиновой кислоты ферментом, который действует только в определенных участках в молекуле нуклеиновой кислоты. Многие из таких рестриктаз доступны в продаже. Использование таких ферментов широко известно специалистам в

данной области. Часто вектор линеаризован или фрагментирован при использовании рестриктазы, которая производит разрез в MCS, что позволяет лигировать экзогенные последовательности в вектор. "Лигирование" относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между двумя фрагментами нуклеиновых кислот, которые могут быть или могут не быть смежными друг с другом. Методы, включающие эндонуклеазы рестрикции и реакции лигирования, известны специалистам в области рекомбинантной технологии.

4. Сайты сплайсинга

Большинство транскрибированных молекул эукариотических РНК подвергаются сплайсингу РНК для удаления интронов из первичных транскриптов. Векторы, содержащие геномные эукариотические последовательности, могут потребовать присутствия донорного и/или акцепторного сайта сплайсинга для обеспечения правильного процессинга транскрипта для экспрессии белка (см. публикацию Chandler et al., 1997, включенную в настоящий документ посредством отсылки).

5. Сигналы терминации

Векторы или конструкции согласно настоящему изобретению обычно включают по меньшей мере один терминирующий сигнал. "Сигнал терминации" или "терминатор" состоит из последовательностей ДНК, участвующих в специфической терминации РНК-транскрипта РНК-полимеразой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предусмотрен сигнал терминации, который останавливает синтез РНК-транскрипта. Терминатор может быть необходим *in vivo* для достижения требуемых уровней мРНК.

В эукариотических системах область терминатора может также включать специфические последовательности ДНК, которые обеспечивают сайт-специфическое расщепление нового транскрипта, открывая доступ к сайту полиаденилирования. Это подает сигнал специализированной эндогенной полимеразе присоединить к 3'-концу транскрипта участок приблизительно из 200 остатков А (полиА). Молекулы РНК, модифицированные таким полиА-хвостом, оказываются более стабильными и транслируются более эффективно. Таким образом, в других вариантах осуществления, включающих эукариоты, предпочтительно, чтобы такой терминатор включал сигнал к расщеплению РНК, и, более предпочтительно, чтобы сигнал терминатора способствовал полиаденилированию транскрипта. Элементы терминатора и/или сайта полиаденилирования могут служить для повышения уровня транскрипта и/или для минимизации сквозного прочтения кассеты с получением других последовательностей.

Терминаторы, предусмотренные для применения в настоящем изобретении, включают любой известный терминатор транскрипции, описанный в настоящем документе или известный специалисту в данной области, включающие, помимо прочего, терминирующие последовательности генов, такие как, например, терминатор бычьего гормона роста или вирусные последовательности терминации, такие как, например, терминатор SV40. В некоторых вариантах осуществления сигналом терминации может служить отсутствие транскрибируемой или транслируемой последовательности,

например, вследствие усечения последовательности.

6. Сигналы полиаденилирования

При экспрессии, особенно эукариотической экспрессии, обычно сигнал полиаденилирования включают для обеспечения правильного полиаденилирования транскрипта. Считается, что природа сигнала полиаденилирования не имеет решающего значения для успешной реализации изобретения на практике, и/или можно использовать любую такую последовательность. Предпочтительные варианты осуществления включают сигнал полиаденилирования SV40 и/или сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, удобные и/или хорошо функционирующие в различных клетках-мишенях. Полиаденилирование может повышать стабильность транскрипта или может способствовать цитоплазматическому транспорту.

7. Точки начала репликации

Чтобы размножения вектора в клетке-хозяине, он может содержать одну или больше точек начала репликации (часто называемых "ori"), которые представляют собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, с которой инициируется репликация. В альтернативе может использоваться автономно реплицирующуюся последовательность (ARS), если клеткой-хозяином являются дрожжи.

8. Селективные и скринируемые маркеры

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, могут быть идентифицированы *in vitro* или *in vivo* путем включения маркера в вектор экспрессии. Такие маркеры будут придавать клетке идентифицируемое изменение, позволяющее легко идентифицировать клетки, содержащие вектор экспрессии. Как правило, селективный маркер - это маркер, который придает свойство, которое позволяет осуществлять отбор. Позитивный селективный маркер - это маркер, присутствие которого позволяет осуществлять его отбор, тогда как негативный селективный маркер - это маркер, присутствие которого препятствует его отбору. Примером позитивного селективного маркера является маркер устойчивости к лекарственному средству.

Обычно включение маркера для селекции в присутствии лекарственного средства помогает при клонировании и идентификации трансформантов, например, гены, которые придают устойчивость к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу, являются подходящими селективными маркерами. В дополнение к маркерам, придающим фенотип, который позволяет различать трансформанты при создании определенных условий, также рассматриваются другие типы маркеров, включая скринируемые маркеры, такие как GFP, применение которых основано на колориметрическом анализе. В альтернативе могут использоваться скринируемые ферменты, такие как тимидинкиназа вируса простого герпеса (tk) или хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Специалисту в данной области также будет известно, как использовать иммунологические маркеры, возможно, в сочетании с FACS анализом. Используемый маркер не считается важным при условии, что он способен

экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Дополнительные примеры селективных и скринируемых маркеров хорошо известны специалистам в данной области.

9. Вирусные векторы

Способность некоторых вирусных векторов эффективно инфицировать или проникать в клетки, интегрироваться в геном клетки-хозяина и стабильно экспрессировать вирусные гены привела к разработке и применению ряда различных вирусных векторных систем (Robbins et al., 1998). В настоящее время разрабатывают вирусные системы для применения в качестве векторов для переноса генов *ex vivo* и *in vivo*. Например, в настоящее время векторы на основе аденовируса, вируса простого герпеса, ретровируса и аденоассоциированного вируса исследуют для лечения таких заболеваний, как рак, кистозный фиброз, болезнь Гоше, заболевание почек и артрит (Robbins and Ghivizzani, 1998; Imai et al., 1998; патент США 5,670,488). Различные вирусные векторы, описанные ниже, обладают специфическими преимуществами и недостатками в зависимости от конкретного генно-терапевтического применения.

Аденовирусные векторы. В конкретных вариантах осуществления для доставки экспрессионных конструкций предусмотрен аденовирусный вектор экспрессии. Подразумевается, что "аденовирусный вектор экспрессии" включает такие конструкции, которые содержат последовательности аденовируса, достаточные для: (а) упаковки конструкции и, (b) в итоге, экспрессии специфической для ткани или клетки конструкции, клонированной в них.

Аденовирусы включают линейную двухцепочечную ДНК с геномом размером от 30 до 35 тпн (Reddy et al., 1998; Morrison et al., 1997; Chillon et al., 1999). Аденовирусный вектор экспрессии в соответствии с настоящим изобретением включает генетически модифицированную форму аденовируса. Преимущества аденовирусного переноса генов включают способность инфицировать самые разнообразные типы клеток, в том числе неделящиеся клетки, геном среднего размера, простоту манипуляций, высокую инфекционность и возможность выращивания до высоких титров (Wilson, 1996). Кроме того, аденовирусная инфекция в клетках-хозяевах не приводит к хромосомной интеграции, поскольку аденовирусная ДНК может реплицироваться эписомно, без потенциальной генотоксичности, связанной с другими вирусными векторами. Аденовирусы также структурно стабильны (Marienfeld et al., 1999), при этом после обширной амплификации не было обнаружено никаких перестроек генома (Parks et al., 1997; Bett et al., 1993).

Характерными признаками генома аденовируса являются ранняя область (гены E1, E2, E3 и E4), промежуточная область (ген pIX, ген Iva2), поздняя область (гены L1, L2, L3, L4 и L5), главный поздний промотор (MLP), инвертированные концевые повторы (ITR) и ψ -последовательность (Zheng, et al., 1999; Robbins et al., 1998; Graham and Prevec, 1995). Ранние гены E1, E2, E3 и E4 экспрессируются с вируса после инфицирования и кодируют полипептиды, которые регулируют экспрессию вирусных генов, экспрессию клеточных

генов, репликацию вируса и ингибирование клеточного апоптоза. Далее в процессе вирусной инфекции происходит активация MLP, которая приводит к экспрессии поздних (L) генов, кодирующих полипептиды, необходимые для капсидирования аденовируса. Промежуточная область кодирует компоненты капсида аденовируса. Аденовирусные инвертированные концевые повторы (ITR; длина 100-200 пн) представляют собой цис-элементы, функционирующие как точки начала репликации, и необходимы для репликации вирусной ДНК. Последовательность ψ необходима для упаковки аденовирусного генома.

Распространенным подходом к получению аденовирусов для применения в качестве векторов для переноса генов является делеция гена E1 (E1-), который участвует в индукции промоторов E2, E3 и E4 (Graham and Prevec, 1995). Впоследствии терапевтический ген или гены могут быть рекомбинантно встроены вместо гена E1, при этом экспрессию терапевтического гена(ов) направляет промотор E1 или гетерологичный промотор. Затем E1⁻, репликационно-дефицитный вирус пролиферирует в "хелперной" клеточной линии, которая предоставляет полипептиды E1 в транс-конфигурации (например, линии эмбриональных клеток почек человека 293). Таким образом, в настоящем описании может оказаться удобным ввести трансформирующую конструкцию в положение, из которого были удалены последовательности, кодирующие E1. Однако положение вставки конструкции в последовательностях аденовируса не имеет решающего значения для изобретения. В альтернативе область E3 и/или части области E4 могут быть удалены, при этом гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты под контролем промотора, функционирующего в эукариотических клетках, встраивается в геном аденовируса для применения в переносе генов (патент США 5,670,488; патент 5,932,210, которые конкретно включены в настоящий документ посредством отсылки).

Хотя векторы на основе аденовирусов предлагают несколько уникальных преимуществ по сравнению с другими векторными системами, они часто ограничены иммуногенностью вектора, ограничениями по размеру вставки рекомбинантных генов и низкими уровнями репликации. Получение рекомбинантного аденовирусного вектора, из которого удалены все открытые рамки считывания, содержащие полноразмерный ген дистрофина и концевые повторы, требуемые для репликации (Haescker et al., 1996), обеспечивает некоторые потенциально перспективные преимущества по сравнению с вышеуказанными недостатками аденовируса. Вектор выращивали до высокого титра с вирусом-помощником в клетках 293, при этом он был способен эффективно трансдуцировать дистрофин у мышей mdx, в мышечных трубочках *in vitro* и мышечных волокнах *in vivo*. Хелпер-зависимые вирусные векторы обсуждаются ниже.

Основной проблемой при использовании аденовирусных векторов является образование репликационно-компетентного вируса в ходе продукции вектора в пакующей клеточной линии или во время генно-терапевтического лечения отдельного лица. Образование репликационно-компетентного вируса может представлять серьезную угрозу случайной вирусной инфекции и патологических последствий для пациента. В

публикации Armentano et al. (1990) описано получение репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который, как утверждается, исключает возможность непредусмотренного образования репликационно-компетентного аденовируса (патент США 5,824,544, специально включенный в настоящее описание посредством отсылки). Способ репликационно-дефектных аденовирусов включает делецию области E1 и релокацию гена белка IX, где вектор экспрессирует гетерологичный ген млекопитающего.

Помимо требования, чтобы аденовирусный вектор был репликационно-дефектным или, по меньшей мере, условно дефектным, считается, что природа аденовирусного вектора не имеет решающего значения для успешной практической реализации настоящего изобретения. Аденовирус может относиться к любым из 42 различных известных серотипов и/или подгрупп А-Ф. Аденовирус 5-го типа подгруппы С является предпочтительным исходным материалом для получения условно репликационно-дефектного аденовирусного вектора для применения в настоящем изобретении. Это связано с тем, что аденовирус 5-го типа является аденовирусом человека, о котором известен большой объем биохимической и генетической информации, и его исторически использовали для большинства конструкций с применением аденовируса в качестве вектора.

Как указано выше, типичный вектор согласно настоящему изобретению является репликационно-дефектным и не имеет области E1 аденовируса. Культивирование и манипуляции с аденовирусом известны специалистам в данной области и демонстрируют широкий спектр хозяев *in vitro* и *in vivo* (патент США 5,670,488; патент США 5,932,210; патент США 5,824,544). Эта группа вирусов может быть получена с высокими титрами, например, от 10^9 до 10^{11} бляшкообразующих единиц в мл, причем они обладают высокой инфекционностью. Жизненный цикл аденовируса не требует интеграции в геном клетки-хозяина. Чужеродные гены, доставляемые аденовирусными векторами, являются эпизомными и, следовательно, обладают низкой генотоксичностью для клеток-хозяев. Многие эксперименты, инновации, доклинические исследования и клинические испытания в настоящее время находятся в стадии исследования применения аденовирусов в качестве векторов для доставки генов. Например, генотерапию на основе аденовирусной доставки генов разрабатывают для лечения заболеваний печени (Han et al., 1999), психических заболеваний (Lesch, 1999), неврологических заболеваний (Smith, 1998; Hermens and Verhaagen, 1998), ишемической болезни сердца (Feldman et al., 1996), мышечных заболеваний (Petrof, 1998), желудочно-кишечных заболеваний (Wu, 1998) и различных форм рака, таких как рак толстой и прямой кишки (Fujiwara and Tanaka, 1998; Dogai et al., 1999), поджелудочной железы, мочевого пузыря (Irie et al. al., 1999), головы и шеи (Blackwell et al., 1999), молочной железы (Stewart et al., 1999), легкого (Batra et al., 1999) и яичника (Vanderkwaak et al., 1999).

Ретровирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрено применение ретровирусов для доставки генов. Ретровирусы

представляют собой РНК-вирусы, включающие РНК-геном. При инфицировании клетки-хозяина ретровирусом геномная РНК подвергается обратной транскрипции в ДНК-интермедиатом, которая интегрируется в хромосомную ДНК инфицированных клеток. Такая интегрированная промежуточная ДНК называется провирусом. Особым преимуществом ретровирусов является то, что они могут стабильно инфицировать делящиеся клетки представляющим интерес геном (например, терапевтическим геном) при интеграции в ДНК хозяина без экспрессии иммуногенных вирусных белков. Теоретически интегрированный ретровирусный вектор будет сохраняться на протяжении всей жизни инфицированной клетки-хозяина, экспрессируя представляющий интерес ген.

Ретровирусный геном и провирусная ДНК содержат три гена: *gag*, *pol* и *env*, которые фланкированы двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Ген *gag* кодирует внутренние структурные (матриксные, капсидные и нуклеокапсидные) белки; ген *pol* кодирует РНК-направленную ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), и ген *env* кодирует гликопротеины вирусной оболочки. 5'- и 3'-LTR способствуют транскрипции и полиаденилированию РНК вирионов. LTR содержит все остальные cis-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса.

Рекомбинантный ретровирус согласно настоящему изобретению может быть генетически модифицирован таким образом, что некоторые структурные инфекционные гены нативного вируса удаляют и заменяют последовательностью нуклеиновой кислоты для доставки в клетку-мишень (патент США 5,858,744; патент США 5,739,018, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки). После заражения клетки вирус вводит в клетку свою нуклеиновую кислоту, при этом генетический материал ретровируса может интегрироваться в геном клетки-хозяина. Затем перенесенный генетический материал ретровируса транскрибируется и транслируется с получением белков в клетке-хозяине. Как и в случае с другими вирусными векторными системами, образование репликационно-компетентного ретровируса в процессе получения вектора или в ходе терапии представляет собой серьезную проблему. Ретровирусные векторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, обычно представляют собой дефектные ретровирусные векторы, которые способны инфицировать клетку-мишень, осуществлять обратную транскрипцию своих геномов РНК и интегрировать обратно транскрибированную ДНК в геном клетки-мишени, но неспособны к репликации внутри клетки-мишени с продукцией инфекционных ретровирусных частиц (например, ретровирусный геном, перенесенный в клетку-мишень, дефектен по гену *gag*, кодирующему структурные белки вириона, и/или по гену *pol*, кодирующему обратную транскриптазу). Таким образом, транскрипция провируса и сборка с получением инфекционного вируса происходит в присутствии соответствующего вируса-помощника или в клеточной линии, содержащей соответствующие последовательности, обеспечивающие капсидирование без одновременной продукции контаминирующего вируса-помощника.

Рост и поддержание ретровирусов известно в уровне техники (патент США

5,955,331; патент США 5,888,502, каждый из которых конкретно включен в настоящий документ посредством отсылки). Нолан и др. описывают получение стабильно высокого титра ретровируса без помощников, содержащего гетерологичный ген (патент США 5,830,725, специально включенный в настоящее описание посредством отсылки). Способы конструирования пакующих клеточных линий, пригодных для продукции рекомбинантных ретровирусов без помощников с наборами амфотропных или экотропных хозяев, а также способы применения рекомбинантных ретровирусов для введения представляющего интерес гена в эукариотические клетки *in vivo* и *in vitro* рассматриваются в настоящем изобретении (патент США 5,955,331).

В настоящее время в большей части всех клинических исследований векторной доставки генов используют доставку генов с помощью ретровирусных векторов на основе вируса лейкоза мышей (MLV) (Robbins et al., 1998; Miller et al., 1993). Недостатки ретровирусной доставки генов включают необходимость непрерывного деления клеток для стабильной инфекции и кодирующую емкость, которая препятствует доставке больших генов. Однако недавняя разработка векторов на основе лентивируса (например, ВИЧ), вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV), которые могут инфицировать некоторые неделящиеся клетки, потенциально позволяет применять ретровирусные векторы *in vivo* в области генотерапии (Amado and Chen, 1999; Klimatcheva et al., 1999; White et al., 1999; Case et al., 1999). Например, векторы на основе ВИЧ были использованы для инфицирования неделящихся клеток, таких как нейроны (Miyatake et al., 1999), островки (Leibowitz et al., 1999) и мышечные клетки (Johnston et al., 1999). Терапевтическую доставку генов посредством ретровирусов в настоящее время оценивают для лечения различных заболеваний, таких как воспалительные заболевания (Moldawer et al., 1999), СПИД (Amado and Chen, 1999; Engel and Kohn, 1999), рак (Clay et al., 1999), цереброваскулярные болезни (Weihl et al., 1999) и гемофилия (Kau, 1998).

Герпесвирусные векторы. Вирус простого герпеса (ВПГ) I типа и II типа содержит двухцепочечный линейный ДНК геном размером приблизительно 150 тпн, кодирующий 70-80 генов. ВПГ дикого типа способны литически инфицировать клетки и устанавливать скрытый период в некоторых типах клеток (например, нейронах). Подобно аденовирусу, ВПГ также может инфицировать различные типы клеток, включая мышцы (Yeung et al., 1999), ухо (Derby et al., 1999), глаз (Kaufman et al., 1999), опухоли (Yoon et al., 1999; Howard et al., 1999), легкое (Kohut et al., 1998), нейроны (Garrido et al., 1999; Lachmann and Efstathiou, 1999), печень (Miyatake et al., 1999; Kooby et al., 1999) и островки Лангерганса (Rabinovitch et al., 1999).

Вирусные гены ВПГ транскрибируются клеточной РНК-полимеразой II и регулируются во времени, что приводит к транскрипции и последующему синтезу продуктов генов примерно в трех различных фазах или кинетических классах. Эти фазы генов называются предранними (IE) или α -генами, ранними (E) или β -генами и поздними (L) или γ -генами. Сразу же после поступления генома вируса в ядро только что

инфицированной клетки происходит транскрипция генов IE. Эффективная экспрессия этих генов не требует предварительного синтеза вирусных белков. Продукты генов IE необходимы для активации транскрипции и регуляции остальной части вирусного генома.

Для использования в терапевтической доставке генов ВПГ должен быть репликационно-дефектным. Описаны методики получения линий клеток, не содержащих репликационно-дефектных вирусов-помощников (патент США 5,879,934; патент США 5,851,826, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством отсылки). Один IE белок, ICP4, также известный как $\alpha 4$ или Vmw175, абсолютно необходим как для инфекционности вируса, так и для перехода от IE к более поздней транскрипции. Таким образом, из-за своей сложной, многофункциональной природы и центральной роли в регуляции экспрессии гена ВПГ, ICP4 обычно служит мишенью генетических исследований ВПГ.

Фенотипические исследования вирусов ВПГ с делецией ICP4 показывают, что такие вирусы потенциально можно применять в целях переноса генов (Krisky et al., 1998a). Одним из свойств вирусов с делецией ICP4, которая делает их предпочтительными для переноса генов, является то, что они экспрессируют только пять остальных IE генов: ICP0, ICP6, ICP27, ICP22 и ICP47 (DeLuca et al., 1985), без экспрессии вирусных генов, кодирующих белки, направляющие синтез вирусной ДНК, а также структурные белки вируса. Это свойство желательно для сведения к минимуму возможного вредного воздействия на метаболизм клетки-хозяина или иммунный ответ после переноса гена. Дальнейшая делеция IE генов, ICP22 и ICP27, в дополнение к ICP4, существенно снижает цитотоксичность ВПГ и предотвращает экспрессию ранних и поздних вирусных генов (Krisky et al., 1998b).

Терапевтический потенциал ВПГ при переносе генов был продемонстрирован в различных модельных системах *in vitro* и *in vivo* при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона (Yamada et al., 1999), ретинобластома (Hayashi et al., 1999), внутримозговые и внутрикожные опухоли (Moriuchi et al., 1998), В-клеточные злокачественные новообразования (Suzuki et al., 1998), рак яичника (Wang et al., 1998) и миодистрофия Дюшенна (Huard et al., 1997).

Векторы на основе аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус (AAV), член семейства парвовирусов, является вирусом человека, который все чаще используют для терапевтической доставки генов. AAV имеет ряд преимуществ, которых не имеют другие вирусные системы. Во-первых, AAV может инфицировать широкий спектр клеток-хозяев, включая неделящиеся клетки. Во-вторых, AAV может инфицировать клетки разных видов. В-третьих, AAV не был связан с какими-либо заболеваниями человека или животных и, по-видимому, не изменяет биологических свойств клетки-хозяина при интеграции. Например, по имеющимся оценкам, 80-85% населения подвергались контакту с AAV. Наконец, AAV стабилен в широком диапазоне физических и химических условий, что соответствует требованиям производства, хранения и транспортировки.

Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, содержащую 4681 нуклеотид. Геном AAV обычно содержит внутренний неповторяющийся геном, фланкированный на каждом конце инвертированными концевыми повторами (ITR) длиной приблизительно 145 пн. ITR выполняют несколько функций, в том числе точек начала репликации ДНК и сигналов упаковки для вирусного генома. Внутренняя, не содержащая повторов часть генома включает две большие открытые рамки считывания, известные как гены репликации (*rep*) и капсида (*cap*) AAV. Гены *rep* и *cap* кодируют вирусные белки, которые позволяют вирусу реплицироваться и упаковывать вирусный геном в вирион. Семейство, состоящее по меньшей мере из четырех вирусных белков, экспрессируется с области *rep* AAV: Rep 78, Rep 68, Rep 52 и Rep 40, которые названы в соответствии с их кажущейся молекулярной массой. Область *cap* AAV кодирует по меньшей мере три белка: VP1, VP2 и VP3.

AAV представляет собой хелпер-зависимый вирус, требующий коинфицирования вирусом-помощником (например, аденовирусом, вирусом герпеса или осповакцины) для образования вирионов AAV. В отсутствие коинфицирования вирусом-помощником, AAV переходит в латентное состояние, при котором вирусный геном встраивается в хромосому клетки-хозяина, но инфекционные вирионы не образуются. Последующее заражение вирусом-помощником "спасает" интегрированный геном, позволяя ему реплицироваться и упаковывать свой геном в инфекционные вирионы AAV. Хотя AAV может инфицировать клетки разных видов, вирус-помощник должен принадлежать тому же виду, что и клетка-хозяин (например, человеческий AAV будет реплицироваться в клетках собаки, коинфицированных аденовирусом собак).

AAV был модифицирован для доставки представляющих интерес генов путем удаления внутренней, не содержащей повторов части генома AAV и вставки гетерологичного гена между ITR. Гетерологичный ген может быть функционально связан с гетерологичным промотором (конститутивным, клеточно-специфическим или индуцируемым), способным направлять экспрессию гена в клетках-мишенях. Для получения инфекционного рекомбинантного AAV (rAAV), содержащего гетерологичный ген, подходящую линию клеток-продуцентов трансфицируют вектором rAAV, содержащим гетерологичный ген. Клетку-продуцента одновременно трансфицируют второй плазмидой, несущей гены *rep* и *cap* AAV под контролем их соответствующих эндогенных промоторов или гетерологичных промоторов. Наконец, клетку-продуцента инфицируют вирусом-помощником.

При объединении этих факторов гетерологичный ген реплицируется и упаковывается, как если бы он был геномом AAV дикого типа. При инфицировании клеток-мишеней полученными вирионами rAAV, гетерологичный ген проникает в клетки-мишени и экспрессируется в них. Поскольку в клетках-мишенях отсутствуют гены *rep* и *cap*, а также хелперные гены аденовируса, rAAV не может больше реплицироваться, упаковываться или образовывать AAV дикого типа.

Однако использование вируса-помощника сопряжено с рядом проблем. Во-первых,

использование аденовируса в системе продукции гAAV заставляет клетки-хозяева продуцировать как гAAV, так и инфекционный аденовирус. Контаминирующий инфекционный аденовирус можно инактивировать термической обработкой (56°C в течение 1 часа). Однако термическая обработка приводит к снижению титра функциональных вирионов гAAV примерно на 50%. Во-вторых, в этих препаратах присутствуют различные количества аденовирусных белков. Например, приблизительно 50% или больше от суммарного белка, полученного в таких препаратах вириона гAAV, представляет собой свободный белок фибера аденовируса. Если их не удалить полностью, эти аденовирусные белки могут вызвать иммунный ответ у пациента. В-третьих, способы получения вектора AAV, в которых используется вирус-помощник, требуют использования и манипуляций большими количествами инфекционного вируса-помощника с высоким титром, что представляет ряд рисков для здоровья и безопасности, особенно в отношении использования герпесвируса. В-четвертых, сопутствующая продукция частиц вируса-помощника в клетках, продуцирующих вирион гAAV, отнимает большое количество клеточных ресурсов хозяина, требуемых для продукции вириона гAAV, что может привести к снижению выхода вириона гAAV.

Лентивирусные векторы. Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые, помимо обычных ретровирусных генов *gag*, *pol* и *env*, содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Более высокая сложность позволяет вирусу регулировать свой жизненный цикл, как в течение латентной инфекции. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вирус иммунодефицита обезьян: SIV. Лентивирусные векторы были созданы путем множественной аттенуации генов вирулентности ВИЧ, например, удаления генов *env*, *vif*, *vpr*, *vpr* и *nef*, что делает вектор биологически безопасным.

Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки и могут использоваться как для переноса генов *in vivo* и *ex vivo*, и для экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Лентивирусный геном и провирусная ДНК содержат три гена, обнаруженные в ретровирусах: *gag*, *pol* и *env*, которые флакированы двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Ген *gag* кодирует внутренние структурные (матриксные, капсидные и нуклеокапсидные) белки; ген *pol* кодирует РНК-направленную ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), протеазу и интегразу; и ген *env* кодирует гликопротеины вирусной оболочки. 5'- и 3'-LTR служат для активации транскрипции и полиаденилирования РНК вирионов. LTR содержит все остальные *cis*-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса. Лентивирусы имеют дополнительные гены, включающие *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpr*, *nef* и *vpx*.

К 5'-LTR примыкают последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания тРНК праймера) и для эффективного капсидирования вирусной РНК в частицы (сайт Psi). Если в вирусном геноме отсутствуют последовательности, необходимые для капсидирования (или упаковки ретровирусной РНК в инфекционные вирионы), *cis*-дефект препятствует капсидированию геномной

РНК. Однако полученный мутант сохраняет способность направлять синтез всех белков вириона.

Лентивирусные векторы известны в уровне техники, см. Naldini et al., (1996); Zufferey et al., (1997); патенты США 6,013,516 и 5,994,136. Как правило, векторы основаны на плазмиде или вирусе и могут нести основные последовательности для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Гены gag, pol и env векторов, представляющих интерес, также известны в данной области. Таким образом, соответствующие гены клонируют в выбранный вектор, а затем используют для трансформации интересующей клетки-мишени.

Рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделяющуюся клетку, где подходящая клетка-хозяин трансфицирована двумя или более векторами, несущими пакующие функциональные гены, а именно gag, pol и env, а также rev и tat, описан в патенте США 5,994,136, включенном в настоящее описание посредством отсылки. В нем описан первый вектор, который может предоставлять нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусные гены gag и pol, и еще один вектор, который может предоставлять нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный env, с получением пакующей клетки. Введение вектора, содержащего гетерологичный ген, такой как ген STAT-1 α в настоящем описании, в такую пакующую клетку дает клетку-продуцента, которая высвобождает инфекционные вирусные частицы, несущие представляющий интерес чужеродный ген. Предпочтительно env представляет собой амфотропный белок оболочки, который обеспечивает трансдукцию клеток человека и других видов.

Рекомбинантный вирус путем связывания белка оболочки с антителом или конкретным лигандом можно направить на рецептор клеток определенного типа. При встраивании представляющей интерес последовательности (включающей регуляторную область) в вирусный вектор вместе с другим геном, который кодирует, например, лиганд рецептора на специфической клетке-мишени, вектор становится мишень-специфическим.

Вектор, предоставляющий последовательность нуклеиновой кислоты вирусного env, функционально связан с регуляторными последовательностями, например, промотором или энхансером. Регуляторная последовательность может быть любым эукариотическим промотором или энхансером, включающим, например, промоторно-энхансерный элемент вируса мышинного лейкоза Молони, энхансер цитомегаловируса человека или промотор вируса осповакцины P7.5. В некоторых случаях, как в случае промоторно-энхансерного элемента вируса мышинного лейкоза Молони, промоторно-энхансерные элементы расположены в последовательностях LTR или примыкают к ним.

Гетерологичная или чужеродная последовательность нуклеиновой кислоты, такая как полинуклеотидная последовательность, кодирующая STAT-1 α , функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты. Предпочтительно гетерологичная последовательность связана с промотором, что приводит к получению химерного гена. Последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты также может

находиться под контролем сигналов промотора-энхансера вирусного LTR, либо внутреннего промотора, при этом сохранившиеся сигналы в ретровирусном LTR все еще могут обеспечивать эффективную экспрессию трансгена. Маркерные гены можно использовать для анализа присутствия вектора и, таким образом, для подтверждения инфицирования и интеграции. Присутствие маркерного гена обеспечивает отбор и рост только тех клеток-хозяев, которые экспрессируют вставки. Типичные селективные гены кодируют белки, придающие устойчивость к антибиотикам и другим токсичным веществам, например, гистидинолу, пурамицину, гигромицину, неомицину, метотрексату и т.д., а также маркеры клеточной поверхности.

Векторы вводят посредством трансфекции или инфекции в паковую клеточную линию. Линия паковых клеток производит вирусные частицы, содержащие векторный геном. Способы трансфекции или инфицирования хорошо известны специалистам в данной области. После котрансфекции паковых векторов и вектора-переносчика в паковую клеточную линию рекомбинантный вирус выделяют из среды культивирования и титруют с помощью стандартных методов, используемых специалистами в данной области. Таким образом, паковые конструкции могут вводить в клеточные линии человека путем трансфекции с фосфатом кальция, липофекции или электропорации, как правило, вместе с доминантным селективным маркером, таким как neo, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующей селекцией в присутствии соответствующего лекарственного средства и выделением клонов. Селективный маркерный ген может быть физически соединен с паковыми генами в конструкции.

Лентивирусные векторы для переноса, описанные в Naldini et al. (1996), были использованы для инфицирования клеток человека с задержкой роста *in vitro* и для трансдукции нейронов после прямой инъекции в мозг у взрослых крыс. Вектор показал эффективность при переносе маркерных генов *in vivo* в нейроны, при этом была достигнута долговременная экспрессия при отсутствии обнаружимой патологии. У животных, обследованных через десять месяцев после однократной инъекции вектора, не наблюдали снижения среднего уровня экспрессии трансгена и признаков тканевой патологии или иммунной реакции (Blomer et al., 1997). Таким образом, в настоящем изобретении можно пересаживать или трансплантировать клетки, инфицированные рекомбинантным лентивирусом *ex vivo*, или инфицировать клетки *in vivo*.

Другие вирусные векторы. Разработка и применение вирусных векторов для доставки генов постоянно совершенствуются и развиваются. Другие вирусные векторы, такие как поксвирус; например, вирус осповакцины (Gnant et al., 1999; Gnant et al., 1999), альфа-вирус; например, вирус синдбис, вирус леса Семлики (Lundstrom, 1999), реовирус (Coffey et al., 1998) и вирус гриппа А (Neumann et al., 1999), рассматриваются для применения в настоящем изобретении и могут быть выбраны в соответствии с определенными свойствами целевой системы.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании рассматриваются векторы на основе вируса осповакцины. Вирус осповакцины является особенно полезной

эукариотической вирусной векторной системой для экспрессии гетерологичных генов. Например, при правильном конструировании рекомбинантного вируса осповакцины белки синтезируются, процессируются и транспортируются в плазматическую мембрану. Недавно было продемонстрировано, что вирусы осповакцины в качестве векторов для доставки генов переносят гены в опухолевые клетки человека, например, ЕМАР-II (Gnant et al., 1999), внутреннего уха (Derby et al., 1999), клетки глиомы, например, р53 (Timiryasova et al., 1999) и различные клетки млекопитающих, например Р450 (патент США 5,506,138). Получение, выращивание и манипуляции с вирусами осповакцины описаны в патенте США 5,849,304 и патенте США 5,506,138 (каждый из которых конкретно включен в настоящий документ посредством отсылки).

В других вариантах осуществления для применения в доставке генов рассматриваются векторы на основе вируса Синдбис. Вирус Синдбис представляет собой вид из рода альфавирусов (Garoff and Li, 1998), который включает такие важные патогены, как вирусы венесуэльского, западного и восточного энцефалита лошадей (Sawai et al., 1999; Mastrangelo et al., 1999). *In vitro* вирус Синдбис поражает различные клетки птиц, млекопитающих, рептилий и амфибий. Геном вируса Синдбис состоит из одной молекулы одноцепочечной РНК длиной 11703 нуклеотида. Геномная РНК является инфекционной, кэпирована на 5'-конце и полиаденилирована на 3'-конце и выступает в качестве мРНК. Трансляция 26S мРНК вируса осповакцины дает полипротеин, который ко- и посттрансляционно расщепляется под воздействием комбинации вирусных и предположительно кодируемых у хозяина протеаз с образованием трех структурных белков вируса: капсидного белка (С) и двух гликопротеинов оболочки (Е1 и РЕ2, предшественников Е2 вириона).

Три особенности вируса Синдбис указывают, что он может быть полезным вектором для экспрессии гетерологичных генов. Во-первых, это широкий спектр хозяев, как в природе, так и в лабораторных условиях. Во-вторых, экспрессия генов происходит в цитоплазме клетки-хозяина и является быстрой и эффективной. В-третьих, существуют температурно-чувствительные мутации при синтезе РНК, которые можно использовать для модуляции экспрессии гетерологичных кодирующих последовательностей путем простого перевода культур в непермиссивную температуру в разное время после инфицирования. Рост и поддержание вируса Синдбис известны из уровня техники (патент США 5,217,879, специально включенный в настоящее описание посредством отсылки).

Химерные вирусные векторы. Химерные или гибридные вирусные векторы разрабатывают для применения в терапевтической доставке генов, и их применение рассматривается в настоящем изобретении. Химерные поксвирусные/ретровирусные векторы (Holzer et al., 1999), аденовирусные/ретровирусные векторы (Feng et al., 1997; Vilbao et al., 1997; Caplen et al., 1999) и аденовирусные/аденоассоциированные вирусные векторы (Fisher et al., 1996; патент США 5,871,982).

В таких "химерных" вирусных системах переноса генов могут использоваться выгодные свойства двух или больше типов исходных вирусов. Например, в публикации

Wilson et al. представлена химерная векторная конструкция, которая включает часть из аденовируса, 5'- и 3'-последовательности ITR AAV и выбранный трансген, описанные ниже (патент США 5,871,983, специально включенный в настоящее описание посредством отсылки).

В химерном вирусе на основе аденовируса/AAV используются последовательности нуклеиновых кислот аденовируса в качестве челнока для доставки рекомбинантного генома AAV/трансгена в клетку-мишень. Последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса, используемые в гибридном векторе, могут варьировать от последовательности минимальной величины, которая требует использования вируса-помощника для получения гибридной вирусной частицы, до лишь отдельных делеций генов аденовируса, причем продукты удаленных генов могут быть предоставлены в процессе продукции гибридного вируса при использовании выбранной пакующей клетки. Как минимум, последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса, используемые в челночном векторе pAdA, представляют собой геномные аденовирусные последовательности, из которых удалены все вирусные гены и которые содержат только те последовательности аденовируса, которые необходимы для упаковки геномной ДНК аденовируса в предварительно сформированную капсидную головку. В частности, используемые аденовирусные последовательности представляют собой цис-действующие 5'- и 3'-последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденовируса (которые функционируют как точки начала репликации) и нативный 5'-пакующий/энхансерный домен, который содержит последовательности, необходимые для упаковки линейных Ad геномов, и энхансерные элементы для E1 промотора. Последовательности аденовируса могут быть модифицированы путем введения требуемых делеций, замен или мутаций при условии, что не будет потеряна требуемая функция.

Последовательности AAV, которые могут использоваться в указанном выше химерном векторе, представляют собой вирусные последовательности, из которых удалены последовательности, кодирующие полипептиды гер и сар. В частности, используемые последовательности AAV представляют собой цис-действующие 5'- и 3'-последовательности инвертированных концевых повторов (ITR). Такие химеры характеризуются доставкой трансгена с высоким титром в клетку-хозяина и способностью стабильно интегрировать трансген в хромосому клетки-хозяина (патент США 5,871,983, специально включенный в настоящее описание посредством отсылки). В гибридной векторной конструкции последовательности AAV фланкированы выбранными аденовирусными последовательностями, описанными выше. Сами 5'- и 3'-последовательности ITR AAV фланкируют последовательность выбранного трансгена и ассоциированные регуляторные элементы, описанные ниже. Таким образом, последовательность, образованная из трансгена и фланкирующих 5'- и 3'-последовательностей AAV, может быть встроена в любой участок делеции в аденовирусных последовательностях вектора. Например, последовательности AAV

предпочтительно встраивать в участок делеции генов E1a/E1b аденовируса. В альтернативе последовательности AAV могут быть встроены в участок делеции E3, делеции E2a и т.д. Если в гибридном вирусе используются только 5'-ITR/пакующие последовательности и 3'-ITR последовательности аденовируса, последовательности AAV встраивают между ними.

Последовательность трансгена в векторе и рекомбинантный вирус могут представлять собой ген, последовательность нуклеиновой кислоты или их обратный транскрипт, гетерологичный последовательности аденовируса, который кодирует представляющий интерес белок, полипептид или пептидный фрагмент. Трансген функционально связан с регуляторными компонентами таким образом, что становится возможной транскрипция трансгена. Состав последовательности трансгена будет зависеть от предполагаемого применения полученного гибридного вектора. Например, один тип трансгенной последовательности включает терапевтический ген, который экспрессирует требуемый продукт гена в клетке-хозяине. Такие терапевтические гены или последовательности нуклеиновых кислот обычно кодируют продукты для введения и экспрессии у пациента *in vivo* или *ex vivo* с целью замены или коррекции наследуемого или ненаследуемого генетического нарушения или лечения эпигенетического нарушения или заболевания.

10. Невирусная трансформация

Считается, что подходящие способы доставки нуклеиновой кислоты для трансформации органеллы, клетки, ткани или организма для применения в настоящем изобретении включают практически любой способ, с помощью которого нуклеиновая кислота (например, ДНК) может быть введена в органеллу, клетку, ткань или организм, как описано в настоящем документе или известно среднему специалисту в данной области. Такие способы включают, без ограничения этим, прямую доставку ДНК, например, путем инъекции (патенты США 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 и 5,580,859, включенные в настоящий документ посредством отсылки), включая микроинъекцию (Harland and Weintraub, 1985; патент США 5,789,215, включенный в настоящий документ посредством отсылки); электропорации (патент США 5384253, включенный в настоящий документ посредством отсылки); осаждения с фосфатом кальция (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); с использованием DEAE-декстрана с последующим добавлением полиэтиленгликоля (Gopal, 1985); прямой загрузки при обработке ультразвуком (Fechheimer et al., 1987); опосредованной липосомами трансфекции (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991); бомбардировки микрочастицами (заявки РСТ WO 94/09699 и 95/06128; патенты США 5,610,042; 5,322,783, 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 и 5,538,880, каждый из которых включен в настоящее описание посредством отсылки); путем перемешивания с волокнами карбида кремния (Kaeppler et al., 1990; патенты США 5,302,523 и 5,464,765, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки); или с

помощью ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов (Omirulleh et al., 1993; патенты США 4,684,611 и 4,952,500, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки); путем опосредованного высыханием/ингибированием захвата ДНК (Potrykus et al., 1985). Благодаря применению таких методов органелла(ы), клетка(и), ткань(и) или организм(ы) могут быть трансформированы стабильно или транзиентно.

Иньекция. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть доставлена в органеллу, клетку, ткань или организм с помощью одной или больше инъекций (т.е. инъекций с помощью иглы), например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно. Способы инъекции вакцин хорошо известны специалистам в данной области (например, инъекция композиции, включающей раствор хлорида натрия). Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают введение нуклеиновой кислоты путем прямой микроинъекции. Прямую микроинъекцию использовали для введения конструкций нуклеиновых кислот в ооциты *Xenopus* (Harland and Weintraub, 1985).

Электропорация. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту вводят в органеллу, клетку, ткань или организм посредством электропорации. Электропорация включает воздействие на суспензию клеток и ДНК высоковольтным электрическим разрядом. В некоторых вариантах этого метода некоторые ферменты, разрушающие клеточную стенку, такие как ферменты, расщепляющие пектин, используются, чтобы сделать реципиентные клетки-мишени более восприимчивыми к трансформации посредством электропорации, чем необработанные клетки (патент США 5,384,253, включенный в настоящий документ посредством отсылки). В альтернативе реципиентные клетки можно сделать более восприимчивыми к трансформации путем механического повреждения.

Трансфекция эукариотических клеток с помощью электропорации оказалась весьма успешной. Пре-В-лимфоциты мыши были трансфицированы генами к-иммуноглобулина человека (Potter et al., 1984), а гепатоциты крысы таким же путем были трансфицированы геном хлорамфениколацетилтрансферазы (Tur-Kaspa et al., 1986).

Для проведения трансформации методом электропорации в клетках, таких как, например, растительные клетки, можно использовать либо рыхлые ткани, такие как суспензионную культуру клеток или эмбриогенный каллус, либо, в альтернативе, можно напрямую трансформировать незрелые эмбрионы или другую организованную ткань. В этом методе можно частично разрушить клеточные стенки выбранных клеток, подвергая их воздействию расщепляющих пектин ферментов (пектолиаз) или контролируемому механическому повреждению. Примеры некоторых видов, трансформированных путем электропорации интактных клеток, включают кукурузу (патент США 5,384,253; Rhodes et al., 1995; D'Halluin et al., 1992), пшеницу (Zhou et al., 1993), томат (Hou and Lin, 1996), сою (Christou et al., 1987) и табак (Lee et al., 1989).

Также для электропорационной трансформации клеток растений можно использовать протопласты (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Например, получение трансгенных

растений сои путем электропорации протопластов, полученных из семядолей, описано Диром и Видхолмом в международной заявке на патент WO 92/17598 (Dhir and Widholm), включенной в настоящее описание посредством отсылки. Другие примеры видов, для которых была описана трансформация протопластов, включают ячмень (Lazzeri, 1995), сорго (Battraw et al., 1991), кукурузу (Bhattacharjee et al., 1997), пшеницу (He et al., 1994) и томат (Tsukada, 1989).

Фосфат кальция. В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту вводят в клетки путем преципитации с фосфатом кальция. Клетки KB человека были трансфицированы ДНК аденовируса 5 (Graham and Van Der Eb, 1973) с использованием этой методики. Таким же способом мышинные клетки L(A9), C127, CHO, CV-1, ВНК, NIH3T3 и HeLa трансфицировали неомициновым маркерным геном (Chen and Okayama, 1987), и гепатоциты крысы трансфицировали различными маркерными генами (Rippe et al., 1990).

ДЭАЭ-декстран. В другом варианте осуществления нуклеиновую кислоту доставляют в клетку с использованием ДЭАЭ-декстрана с последующей обработкой полиэтиленгликолем. Таким способом репортерные плазмиды вводили в мышинные клетки миеломы и эритролейкоза (Gopal, 1985).

Загрузка при обработке ультразвуком. Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают введение нуклеиновой кислоты путем прямой загрузки при обработке ультразвуком. LTK⁻ фибробласты трансфицировали геном тимидинкиназы путем обработки ультразвуком (Fechheimer et al., 1987).

Опосредованная липосомами трансфекция. В другом варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота может быть заключена в липидный комплекс, такой как, например, липосома. Липосомы представляют собой везикулярные структуры, характеризующиеся двухслойной фосфолипидной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке с последующим образованием замкнутых структур и захватом воды и растворенных веществ между липидными бислоями (Ghosh and Bachhawat, 1991). Также рассматривается нуклеиновая кислота в комплексе с липофектаминосом (Gibco BRL) или Superfect (Qiagen).

Опосредованная липосомами доставка нуклеиновой кислоты и экспрессия чужеродной ДНК *in vitro* оказались крайне успешными (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987). Также была продемонстрирована возможность опосредованной липосомами доставки и экспрессии чужеродной ДНК в культивируемых куриных эмбрионах, HeLa и клетках гепатомы (Wong et al., 1980).

В некоторых вариантах осуществления изобретения липосома может образовывать комплекс с гемагглютинирующим вирусом Сендай (HVJ). Было показано, что это облегчает слияние с клеточной мембраной и способствует проникновению в клетку ДНК,

инкапсулированной в липосомах (Kaneda et al., 1989). В других вариантах осуществления липосома может образовывать комплекс или использоваться в сочетании с ядерными негистоновыми хромосомными белками (HMG-1) (Kato et al., 1991). В других вариантах осуществления липосома может образовывать комплекс или использоваться в сочетании как с HIVJ, так и с HMG-1. В других вариантах осуществления носитель для доставки может включать лиганд и липосому.

Рецепторно-опосредованная трансфекция. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть доставлена в клетку-мишень с помощью рецепторно-опосредованных средств доставки. Для этого используется селективный захват макромолекул посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза, который будет происходить в клетке-мишени. Ввиду специфического для конкретного типа клеток распределения различных рецепторов такой способ доставки добавляет еще одну степень специфичности в настоящем изобретении.

Некоторые рецепторно-опосредованные носители для направленной доставки генов содержат специфичный к клеточному рецептору лиганд и средство, связывающее нуклеиновую кислоту. Другие носители содержат лиганд, специфичный к клеточному рецептору, к которому функционально присоединена нуклеиновая кислота, подлежащая доставке. Для рецепторно-опосредованного переноса генов были использованы несколько лигандов (Wu and Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EPO 0273085), что подтверждает эффективность такого метода. Описана специфичная доставка в контексте другого типа клеток млекопитающих (Wu and Wu, 1993; включена в настоящий документ посредством отсылки). В некоторых аспектах настоящего изобретения лиганд выбирают таким образом, чтобы он соответствовал рецептору, специфически экспрессируемому в популяции клеток-мишеней.

В других вариантах осуществления компонент носителя для доставки нуклеиновой кислоты клеточно-специфичного носителя для направленной доставки нуклеиновой кислоты может включать специфичный связывающий лиганд в комбинации с липосомой. Доставляемая нуклеиновая кислота(ы) содержится внутри липосомы, а специфичный связывающий лиганд функционально включен в мембрану липосомы. Таким образом, липосома будет специфично связываться с рецептором(ами) клетки-мишени и доставлять свое содержимое в клетку. Было показано, что такие системы функциональны при использовании таких систем, в которых, например, эпидермальный фактор роста (EGF) используется в рецепторно-опосредованной доставке нуклеиновой кислоты в клетки, которые демонстрируют апрегуляцию рецептора EGF.

В других вариантах осуществления компонент носителя для доставки нуклеиновой кислоты в носителе для направленной доставки сам может представлять собой липосому, которая предпочтительно будет включать один или больше липидов или гликопротеинов, которые направляют клеточно-специфичное связывание. Например, лактозилцерамид, асиалоганглиозид с концевой галактозой, включали в липосомы и наблюдали увеличение захвата гена инсулина гепатоцитами (Nicolau et al., 1987). Предполагается, что

тканеспецифичные трансформирующие конструкции согласно настоящему изобретению можно специфично доставлять в клетку-мишень аналогичным способом.

11. Системы экспрессии

Существуют многочисленные системы экспрессии, которые включают, по меньшей мере, некоторые или все композиции, обсуждаемые выше. Прокариотические и/или эукариотические системы могут применяться согласно настоящему изобретению для получения последовательностей нуклеиновых кислот или их когнатных полипептидов, белков и пептидов. Многие такие системы коммерчески и широко доступны.

Система на основе клеток насекомых/бакуловирусов может давать высокий уровень белковой экспрессии гетерологичного сегмента нуклеиновой кислоты, как описано в патентах США 5,871,986 и 4,879,236, включенных в настоящий документ посредством отсылки, которую можно приобрести, например, под наименованием MaxVac 2.0[®] в Invitrogen[®] и VacPack[™] Vaculovirus Expression System в Clontech[®].

Другие примеры систем экспрессии включают систему экспрессии Complete Control[™] Inducible Mammalian Expression, Stratagene[®], которая включает индуцируемый синтетическими экдизолами рецептор или соответствующую систему экспрессии рЕТ, систему для экспрессии в *E. coli*. Другой пример индуцируемой системы экспрессии, предложенной Invitrogen[®], несет систему T-Rex[™] (тетрациклин-регулируемой экспрессии), индуцируемую систему экспрессии в клетках млекопитающих, в которой используется полноразмерный промотор ЦМВ. Invitrogen[®] также предлагает дрожжевую систему экспрессии, называемую системой экспрессии *Pichia methanolica*, которая предназначена для продукции на высоких уровнях рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах *Pichia methanolica*. Специалисту в данной области будет известно, как экспрессировать вектор, такой как экспрессионную конструкцию, для получения последовательности нуклеиновой кислоты или ее когнатного полипептида, белка или пептида.

Первичные культуры клеток млекопитающих могут быть получены различными способами. Чтобы клетки сохраняли жизнеспособность *in vitro* и при контакте с экспрессионной конструкцией, необходимо обеспечить поддержание контакта клеток с правильным соотношением кислорода, углекислого газа и питательных веществ, но чтобы клетки при этом были защищены от микробной контаминации. Методики культивирования клеток подробно описаны в литературе.

Один из вариантов осуществления вышеизложенного включает применение переноса генов для иммортализации клеток с целью продукции белков. Ген белка, представляющего интерес, можно переносить, как описано выше, в соответствующие клетки-хозяева с последующим культивированием клеток в надлежащих условиях. Таким способом можно использовать ген практически любого полипептида. Создание рекомбинантных векторов экспрессии и элементы, включаемые в них, обсуждались выше. В альтернативе продуцируемым белком может быть эндогенный белок, который обычно

синтезируется рассматриваемой клеткой.

Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются клетки Vero и HeLa и линии клеток яичников китайского хомячка, клетки W138, ВНК, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN и MDCK. Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков. Подходящие линии клеток или системы-хозяева могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка.

Можно использовать ряд систем селекции, включающих, без ограничения этим, гены тимидинкиназы HSV, гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и аденинфосфорибозилтрансферазы в tk-, hgppt- или aprt- клетках соответственно. Кроме того, резистентность к антиметаболитам может использоваться в качестве основы для отбора по dhfr, который придает устойчивость к метотрексату; gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте; neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G418; и hygro, который придает устойчивость к гигромицину.

Е. Очистка

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут быть очищены. Термин "очищенный", при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения композиции, которую можно отделить от других компонентов, где белок очищен до какой-либо степени по сравнению с его обычным состоянием при получении. Таким образом, очищенный белок также относится к белку, свободному от окружения, в котором он может встречаться в природе. В случаях, когда используется термин "по существу очищенный", это обозначение будет относиться к композиции, в которой белок или пептид составляет основной компонент композиции, например, составляет приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или больше от белков в композиции.

Методы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы включают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточной среды с получением полипептидных и неполипептидных фракций. После отделения полипептида от других белков представляющий интерес полипептид может быть дополнительно очищен с помощью хроматографических и электрофоретических методов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические методы, особенно подходящие для получения чистого пептида, включают ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическое фокусирование. Другие способы очистки белка включают

осаждение сульфатом аммония, ПЭГ, антителами и т.п. или термическую денатурацию с последующим центрифугированием; гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, гидроксипатитную и аффинную хроматографию; и комбинации таких и других методов.

При очистке антитела согласно настоящему изобретению может быть предпочтительно экспрессировать полипептид в прокариотической или эукариотической системе экспрессии и выделять белок при использовании денатурирующих условий. Полипептид может быть очищен от других клеточных компонентов при использовании аффинной колонки, которая связывается с меченой частью полипептида. Как общеизвестно в уровне техники, считается, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен, или что некоторые стадии можно исключить, но в результате это все равно будет подходящий способ получения по существу очищенного белка или пептида.

Обычно полные антитела фракционируют с использованием средств (например, белка А), которые связывают Fc-фрагмент антитела. В альтернативе антигены можно использовать для одновременной очистки и отбора подходящих антител. В таких способах часто используют селективное средство, связанное с носителем, таким как колонка, фильтр или гранула. Антитела связываются с носителем, примеси удаляются (например, смываются) и антитела высвобождаются при применении определенных условий (соль, тепло и т.д.).

Различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида будут известны специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения. К ним относятся, например, определение специфической активности активной фракции или оценка количества полипептидов во фракции с помощью анализа методом электрофореза в ДСН-ПААГ. Еще одним методом оценки чистоты фракции является вычисление удельной активности фракции, сравнение ее с удельной активностью исходного экстракта и, таким образом, вычислением степени чистоты. Фактические единицы, используемые для количественного представления активности, будут, конечно, зависеть от конкретного метода анализа, выбранного для последующей очистки, и от того, проявляет ли экспрессируемый белок или пептид обнаружимую активность.

Известно, что подвижность полипептида может изменяться, иногда значительно, при различных условиях электрофореза в ДСН-ПААГ (Capaldi et al., 1977). Поэтому следует понимать, что при различных условиях электрофореза кажущиеся молекулярные массы очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии могут различаться.

Г. Одноцепочечные/однодоменные антитела

Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, соединенных между собой коротким (обычно сериновым, глициновым) линкером. Эта химерная молекула, также известная как однодоменное антитело, сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкерного пептида. Такая модификация обычно сохраняет специфичность без изменения. Эти

молекулы исторически были созданы для упрощения фагового дисплея, в котором очень удобно экспрессировать антигенсвязывающий домен в виде одного пептида. В альтернативе scFv можно создавать непосредственно из субклонированных тяжелых и легких цепей, полученных из гибридомы. В однодоменных или одноцепочечных переменных фрагментах отсутствует константная Fc-область, присутствующая в полных молекулах антител, и, следовательно, общие сайты связывания (например, белка A/G), используемые для очистки антител (одноцепочечные антитела включают Fc-область). Эти фрагменты часто можно очищать/иммобилизовать с использованием белка L, поскольку белок L взаимодействует с переменной областью легких цепей каппа.

Гибкие линкеры обычно состоят из аминокислотных остатков, способствующих образованию спиралей и изгибов, таких как аланин, серин и глицин. Однако такую функцию могут выполнять и другие остатки. Танг с соавт. (Tang et al., 1996) использовали фаговый дисплей как средство быстрого отбора специальных линкеров для одноцепочечных антител (scFv) из библиотек белковых линкеров. Была сконструирована библиотека случайных линкеров, в которой гены переменных доменов тяжелой и легкой цепей были соединены сегментом, кодирующим полипептид из 18 аминокислот переменного состава. Репертуар scFv (примерно 5×10^6 различных членов) был экспонирован на нитчатом фаге и подвергнут аффинной селекции с гаптенем. Популяция отобранных вариантов показала значимое увеличение связывающей активности, но сохраняла существенное разнообразие последовательностей. После скрининга 1054 индивидуальных вариантов был получен каталитически активный scFv, который эффективно продуцировался в растворимой форме. Анализ последовательности выявил консервативный пролин в линкере через два остатка после С-конца V_H и обилие аргининов и пролинов в других положениях как единственные общие признаки выбранных соединителей.

Рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению также могут включать последовательности или фрагменты, которые обеспечивают димеризацию или мультимеризацию рецепторов. Такие последовательности включают последовательности, полученные из IgA, которые обеспечивают образование мультимеров в сочетании с J-цепью. Другим доменом мультимеризации является домен димеризации Gal4. В других вариантах осуществления цепи могут быть модифицированы такими соединениями, как биотин/авидин, что позволяет использовать комбинацию двух антител.

В отдельном варианте одноцепочечное антитело может быть создано путем соединения легкой и тяжелой цепей рецептора с использованием непептидного линкера или химического звена. Как правило, легкая и тяжелая цепи продуцируются в разных клетках, после чего их очищают и соединяют вместе соответствующим образом (т.е. N-конец тяжелой цепи присоединяют к С-концу легкой цепи через соответствующий химический мостик).

Сшивающие реагенты используются для формирования молекулярных мостиков, которые связывают функциональные группы двух разных молекул, например,

стабилизирующего и коагулирующего вещества. Однако предполагается, что могут быть созданы димеры или мультимеры одного и того же аналога, или гетеромерные комплексы, состоящие из разных аналогов. Для постадийного связывания двух разных соединений можно использовать гетеробифункциональные сшивающие агенты, которые исключают образование нежелательного гомополимера.

Примерный гетеробифункциональный сшивающий агент содержит две реакционноспособные группы: одна реагирует с первичной аминогруппой (например, N-гидроксисукцинимид), а другая, реагирует с тиольной группой (например, пиридилдисульфид, малеимиды, галогены и т.д.). Через группу, взаимодействующую с первичным амином, сшивающий агент может реагировать с остатком(ами) лизина одного белка (например, выбранного антитела или его фрагмента), а через группу, взаимодействующую с тиолом, сшивающий агент, который уже связан с первым белком, реагирует с остатком цистеина (свободной сульфгидрильной группой) другого белка (например, селективного агента).

Предпочтительно использовать сшивающий агент, который обладает достаточной стабильностью в крови. Известны многочисленные типы линкеров, содержащих дисульфидную связь, которые можно успешно использовать для конъюгирования направленных и терапевтических/профилактических средств. Линкеры, которые содержат пространственно затрудненную дисульфидную связь, могут обеспечивать более высокую стабильность *in vivo*, предотвращая высвобождение пептида-мишени до того, как он достигнет участка действия. Таким образом, эти линкеры представляют собой одну группу связывающих агентов.

Другим сшивающим реагентом является SMPT, который представляет собой бифункциональный сшивающий агент, содержащий дисульфидную связь, которая "стерически затруднена" соседним бензольным кольцом и метильными группами. Считается, что стерические затруднения дисульфидной связи выполняют функцию защиты связи от воздействия тиолат-анионов, таких как глутатион, которые могут присутствовать в тканях и крови, и тем самым помогают предотвратить разъединение конъюгата перед доставкой присоединенного средства в целевой участок.

Сшивающий реагент SMPT, как и многие другие известные сшивающие реагенты, позволяет сшивать функциональные группы, такие как SH цистеина или первичные амины (например, эpsilon-аминогруппу лизина). Еще один возможный тип сшивающего агента включает гетеробифункциональные фотореактивные фенилазиды, содержащие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дитиопропио-нат. N-гидроксисукцинимидильная группа реагирует с первичными аминогруппами, а фенилазид (при фотолизе) неселективно реагирует с любым аминокислотным остатком.

В дополнение к затрудненным сшивающим агентам в соответствии с настоящим документом также могут использоваться незатрудненные линкеры. Другие полезные сшивающие агенты, которые, как считается, не содержат или не образуют защищенный

дисульфид, включают SATA, SPDP и 2-иминотиолан (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). Применение таких сшивающих агентов хорошо известно в данной области. Другой вариант осуществления включает применение гибких линкеров.

В патенте США 4,680,338 описаны бифункциональные линкеры, пригодные для получения конъюгатов лигандов с аминсодержащими полимерами и/или белками, особенно для создания конъюгатов антител с хелатообразователями, лекарственными средствами, ферментами, детектируемыми метками и т.п. В патентах США 5,141,648 и 5,563,250 раскрыты расщепляемые конъюгаты, содержащие лабильную связь, которая расщепляется при различных мягких условиях. Этот линкер особенно полезен тем, что представляющее интерес вещество может быть связано непосредственно с линкером, при этом расщепление приводит к высвобождению активного вещества. Конкретные применения включают добавление свободной аминогруппы или свободной сульфгидрильной группы в белок, такой как антитело или лекарственное средство.

В патенте США 5,856,456 предложены пептидные линкеры для применения при соединении полипептидных компонентов с получением слитых белков, например, одноцепочечных антител. Линкер имеет длину примерно до 50 аминокислот, содержит по меньшей мере одну заряженную аминокислоту (предпочтительно аргинин или лизин), после которой следует пролин, и отличается более высокой стабильностью и сниженной агрегацией. В патенте США 5,880,270 раскрыты аминокислосодержащие линкеры, которые могут применяться в различных методах иммунодиагностики и разделения.

Г. Модифицированные антитела

1. CAR-рецепторы

Искусственные рецепторы Т-клеток (также известные как химерные рецепторы Т-клеток, химерные иммунорецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR)) представляют собой сконструированные рецепторы, которые придают произвольную специфичность иммунной эффекторной клетке. Как правило, эти рецепторы используют для передачи специфичности моноклонального антитела Т-клетке, при этом перенос их кодирующей последовательности обеспечивают ретровирусными векторами. Таким образом, можно получить большое количество опухолеспецифичных Т-клеток для адоптивного переноса клеток. Клинические исследования фазы I показывают эффективность данного подхода.

Наиболее распространенной формой этих молекул являются слитые конструкции одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), происходящих из моноклональных антител, которые слиты с трансмембранным и эндодоменом CD3-дзета. Такие молекулы приводят к передаче дзета-сигнала в ответ на распознавание scFv своей мишени. Примером такой конструкции является 14g2a-Zeta, который является слитым белком scFv, полученного из гибридомы 14g2a (который распознает дисиамоганглиозид GD2). Когда Т-клетки экспрессируют эту молекулу (обычно это достигается с помощью трансдукции онкоретровирусным вектором), они распознают и убивают клетки-мишени, экспрессирующие GD2 (например, клетки нейробластомы). Для направленного

воздействия на злокачественные В-клетки, исследователи перенаправили специфичность Т-клеток, используя химерный иммунорецептор, специфичный к молекуле В-лимфоцитов, CD19.

Вариабельные части тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина используют для слияния с гибким линкером с получением scFv. Перед scFv расположен сигнальный пептид, направляющий синтезируемый белок в эндоплазматический ретикулум с последующей поверхностной экспрессией (при этом пептид отщепляется). Гибкий спейсер позволяет scFv ориентироваться в разных направлениях для обеспечения связывания антигена. Трансмембранный домен представляет собой типичную гидрофобную альфа-спираль, обычно происходящую из исходной молекулы сигнального эндодомена, который выступает внутрь клетки и передает нужный сигнал.

Белки I типа фактически представляют собой два белковых домена, соединенных между собой трансмембранной альфа-спиралью. Липидный бислой клеточной мембраны, через который проходит трансмембранный домен, изолирует внутреннюю часть (эндодомен) от внешней части (эктодомен). Неудивительно, что присоединение эктодомена одного белка к эндодому другого белка приводит к получению молекулы, которая объединяет в себе распознавание первого домена с сигналом второго.

Эктодомен. Сигнальный пептид направляет синтезируемый белок в эндоплазматический ретикулум. Это важно, если рецептор должен быть гликозилирован и заякорен в клеточной мембране. Любая последовательность эукариотического сигнального пептида обычно работает нормально. Как правило, используется сигнальный пептид, нативно присоединенный к N-концевому компоненту (например, в scFv с ориентацией легкая цепь - линкер - тяжелая цепь используется нативная сигнальная последовательность легкой цепи).

Антигенраспознающий домен обычно представляет собой scFv. Однако существует множество альтернатив. Описан антигенраспознающий домен из одиночных альфа и бета цепей нативного Т-клеточного рецептора (TCR), а также простые эктодомены (например, эктодомен CD4 для распознавания ВИЧ-инфицированных клеток) и более экзотические распознающие компоненты, такие как связанный цитокин (который приводит к распознаванию клеток, несущих цитокиновый рецептор). Фактически почти все, что связывает конкретную мишень с высокой аффинностью, может использоваться в качестве антигенраспознающей области.

Спейсерная область соединяет антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. Он должен быть достаточно гибким, чтобы антигенсвязывающий домен мог ориентироваться в разных направлениях для облегчения распознавания антигена. Простейшей формой является шарнирная область IgG1. Альтернативные варианты включают область CH₂CH₃ иммуноглобулина и фрагменты CD3. Для большинства конструкций на основе scFv достаточно использовать шарнир IgG1. Однако наилучший спейсер часто приходится определять эмпирически.

Трансмембранный домен. Трансмембранный домен представляет собой

гидрофобную альфа-спираль, которая тянется через мембрану. Как правило, используется трансмембранный домен из ближайшего к мембране компонента эндодомена. Примечательно, что использование трансмембранного домена CD3-дзета может привести к включению искусственного TCR в нативный TCR, фактор, который зависит от присутствия заряженного остатка аспарагиновой кислоты в нативном трансмембранном CD3-дзета. Различные трансмембранные домены приводят к разной стабильности рецепторов. Трансмембранный домен CD28 приводит к активно экспрессирующемуся стабильному рецептору.

Эндодомен. Это "рабочий конец" рецептора. После распознавания антигена рецепторы кластеризуются, и сигнал передается в клетку. Наиболее часто используемым компонентом эндодомена является CD3-дзета, который содержит 3 домена ITAM. Он передает сигнал активации Т-клетке после связывания антигена. CD3-дзета может не обеспечивать полностью достаточный сигнал активации, и может требоваться дополнительная костимулирующая сигнализация. Например, химерные CD28 и OX40 можно использовать совместно с CD3-дзета для передачи сигнала пролиферации/выживания, или все три можно использовать вместе.

CAR-рецепторы "первого поколения" обычно содержали внутриклеточный домен из ξ -цепи CD3, которая является основным передатчиком сигналов от эндогенных TCR-рецепторов. В CAR-рецепторы "второго поколения" внутриклеточные сигнальные домены из различных костимулирующих белковых рецепторов (например, CD28, 41BB, ICOS) добавлены на цитоплазматический хвост CAR для передачи дополнительных сигналов Т-клетке. Доклинические исследования показали, что конструкции CAR-рецепторов второго поколения повышают противоопухолевую активность Т-клеток. Более новые CAR-рецепторы "третьего поколения" объединяют в себе несколько сигнальных доменов, таких как CD3z-CD28-41BB или CD3z-CD28-OX40, для еще большего повышения эффективности.

Адоптивный перенос Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы, является многообещающей противоопухолевой терапией, поскольку CAR-модифицированные Т-клетки могут быть сконструированы для направленного взаимодействия практически с любым опухолеассоциированным антигеном. Этот подход обладает большим потенциалом для значительного улучшения пациент-специфической терапии рака. После сбора Т-клеток пациента клетки генетически модифицируют для экспрессии CAR-рецепторов, специфично направленных против антигенов на опухолевых клетках пациента, а затем вводят обратно пациенту. Хотя адоптивный перенос CAR-модифицированных Т-клеток является уникальным и многообещающим методом терапии рака, существуют серьезные риски, связанные с безопасностью. Клинические исследования этой терапии выявили потенциальные токсические эффекты таких CAR-клеток, когда здоровые ткани экспрессируют такие же антигены-мишени, что и опухолевые клетки, что приводит к результатам, аналогичным реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Потенциальным решением этой проблемы является введение с

помощью генно-инженерных методов суицидального гена в модифицированные Т-клетки. Таким образом, введение пролекарства, предназначенного для активации суицидального гена во время РТПХ, запускает апоптоз в CAR Т-клетках с активированным суицидальным геном. Этот метод безопасно и эффективно применяется при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Внедрение терапии с суицидальным геном в клиническом применении адоптивного переноса CAR-модифицированных Т-клеток может снизить тяжесть РТПХ при одновременном повышении общей противоопухолевой эффективности.

2. ADC

Конъюгаты антител-лекарственных средств или ADC представляют собой новый класс высокоактивных биофармацевтических средств, разработанных в качестве таргетной терапии для лечения онкобольных. ADC представляют собой сложные молекулы, состоящие из антитела (цельного mAb или фрагмента антитела, такого как одноцепочечный вариабельный фрагмент или scFv), соединенных, посредством стабильного химического линкера с лабильными связями, с биологически активной цитотоксической (противоопухолевой) полезной нагрузкой или лекарственным соединением. Конъюгаты антитела-лекарственного средства являются примерами биоконъюгатов и иммуноконъюгатов.

Благодаря объединению уникальных направляющих возможностей моноклональных антител со способностью цитотоксических средств уничтожать раковые клетки, конъюгаты антитела-лекарственного средства способны точно различать здоровую и пораженную ткань. Это означает, что, в отличие от традиционных химиотерапевтических средств, конъюгаты антител-лекарственных средств направленно взаимодействуют с раковой клеткой и атакуют ее, при этом здоровые клетки поражаются менее сильно.

При разработке противоопухолевых терапий на основе ADC противоопухолевое средство (например, клеточный токсин или цитотоксин) соединяют с антителом, которое специфично взаимодействует с определенным опухолевым маркером (например, белком, который в идеальном случае должен обнаруживаться только в опухолевых клетках или на их поверхности, в данном случае MUC1). Антитела отслеживают эти белки в организме и прикрепляются к поверхности раковых клеток. Биохимическое взаимодействие между антителом и белком-мишенью (антигеном) инициирует сигнал в опухолевой клетке, которая затем поглощает или интернализирует антитело вместе с цитотоксином. После интернализации ADC цитотоксическое средство высвобождается и убивает раковую клетку. Благодаря такому таргетингу в идеальном случае лекарственное средство имеет меньше побочных эффектов и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие химиотерапевтические средства.

Стабильная связь между антителом и цитотоксическим (противоопухолевым) средством является важным аспектом ADC. Линкеры основаны на химических мотивах, включающих дисульфиды, гидразоны или пептиды (расщепляемые), или тиоэферы

(нерасщепляемые), и контролируют распределение и доставку цитотоксического средства в клетку-мишень. Безопасность расщепляемых и нерасщепляемых линкеров доказана в ходе доклинических и клинических исследований. Brentuximab vedotin включает чувствительный к воздействию ферментов расщепляемый линкер, который доставляет мощное и высокотоксичное антимикротубулиновое средство монометилауристатин Е или ММАЕ, синтетическое противоопухолевое средство, в CD30-положительные злокачественные клетки человека. Из-за своей высокой токсичности ММАЕ, который ингибирует деление клеток, блокируя полимеризацию тубулина, не может использоваться в качестве моноклонального антитела. Однако комбинация ММАЕ, связанного с моноклональным антителом против CD30 (сАС10, белка клеточной мембраны из семейства рецепторов фактора некроза опухоли или ФНО), оказалась стабильной во внеклеточной жидкости, расщепляется катепсином и безопасна для терапии. Трастузумаб эмтанзин, другой одобренный ADC, представляет собой комбинацию ингибитора образования микротрубочек мертанзина (DM-1), производного майтанзина, и антитела трастузумаба (Герцептин®/Genentech/Roche), соединенных стабильным нерасщепляемым линкером.

Доступность улучшенных и более стабильных линкеров привела к изменению функции химической связи. Тип линкера, расщепляемого или нерасщепляемого, придает специфические свойства цитотоксическому (противоопухолевому) средству. Например, нерасщепляемый линкер удерживает лекарственное средство внутри клетки. В результате все антитело, линкер и цитотоксическое (противоопухолевое) средство попадает в раковую клетку-мишень, где антитело расщепляется до уровня аминокислот. Образующийся в результате комплекс аминокислоты, линкера и цитотоксического средства становится теперь активным лекарственным соединением. В отличие от этого, расщепляемые линкеры подвергаются катализу ферментов в раковой клетке, где они высвобождают цитотоксическое средство. Различие состоит в том, что цитотоксическая полезная нагрузка, доставляемая при посредстве расщепляемого линкера, может покидать клетку-мишень и в процессе неспецифического лизиса, называемом "убийством свидетелей", атаковать соседние раковые клетки.

В еще одном типе расщепляемого линкера, разрабатываемого в настоящее время, между цитотоксическим средством и сайтом расщепления добавляют дополнительную молекулу. Эта линкерная технология позволяет исследователям создавать ADC конъюгаты с большей гибкостью, не беспокоясь об изменении кинетики расщепления. Исследователи также разрабатывают новый метод расщепления пептидов, основанный на расщеплении по Эдману, методе секвенирования аминокислот в пептиде. Будущее направление в разработке ADC также включает разработку сайт-специфического конъюгирования (TDC) для дополнительного повышения стабильности и терапевтического индекса, а также α -испускающих иммуноконъюгатов и наночастиц, конъюгированных с антителами.

3. BitES

Биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE) представляют собой класс искусственных биспецифических моноклональных антител, которые исследуют на предмет применения в качестве противоопухолевых средств. Они направляют иммунную систему хозяина, в частности, цитотоксическую активность Т-клеток, против раковых клеток. BiTE является зарегистрированной торговой маркой Micromet AG.

BiTE представляют собой слитые белки, состоящие из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) разных антител или аминокислотных последовательностей четырех разных генов на одной пептидной цепи длиной около 55 килодальтон. Один из scFv связывается с Т-клетками через рецептор CD3, а другой - с опухолевой клеткой через опухолеспецифическую молекулу, в данном случае MUC1.

Подобно другим биспецифическим антителам и в отличие от обычных моноклональных антител, BiTE образуют связь между Т-клетками и опухолевыми клетками. Это заставляет Т-клетки проявлять цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток с продукцией таких белков, как перфорин и гранзимы, независимо от присутствия МНС I или костимулирующих молекул. Эти белки проникают в опухолевые клетки и инициируют их апоптоз. Это действие воспроизводит физиологические процессы, наблюдаемые во время атаки Т-клеток против опухолевых клеток.

BiTE, которые проходили клинические испытания по состоянию на июль 2010 года, включают Блинатумомаб (MT103) для лечения неходжкинской лимфомы и острого лимфобластного лейкоза, направленный против CD19, поверхностной молекулы, экспрессируемой на В-клетках; и MT110 для лечения рака желудочно-кишечного тракта и рака легкого, направленный против антигена ЕрСАМ.

При использовании такой же технологии можно направленно воздействовать на меланому (с применением MCSP-специфичных BiTE) и острый миелоидный лейкоз (с применением CD33-специфичных BiTE). Исследования в этой области в настоящее время продолжаются. Еще одним направлением для разработки новых противоопухолевых терапий является реконструирование некоторых из применяемых в настоящее время обычных антител, таких как трастузумаб (против HER2/neu), цетуксимаб и панитумумаб (оба против рецептора EGF), с применением подхода BiTE. Также разрабатываются BiTE против CD66e и EphA2.

4. ADCC

Терапевтические антитела применялись для лечения злокачественных новообразований различными способами, такими как конъюгат антитела-лекарственного средства (ADC), индукция антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) представляет собой механизм клеточно-опосредованной иммунной защиты, в котором эффекторная клетка иммунной системы активно лизует клетку-мишень, поверхностные антигены мембраны которой были связаны специфичными антителами.

За последние десятилетия ADCC идентифицировали как один из важнейших механизмов, лежащих в основе клинической эффективности терапевтических

противоопухолевых антител. Это - ключевой эффекторный механизм, с помощью которого терапевтические антитела, направленные против мишеней клеточной поверхности на раковых клетках, проявляют свое клиническое действие. Этот процесс опосредуется связыванием IgG с Fc-рецепторами на эффекторных клетках иммунной системы, включая естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, макрофаги и эозинофилы. Fc IgG связывается с FCRI, FcRII и преимущественно FcRIIIa

Fc-область IgG содержит консервативный сайт гликозилирования в положении Asn-297 каждого из C_H2 доменов. N-связанные олигосахариды, экспрессируемые в этом сайте, оказывают значительное влияние на эффекторные функции IgG. Что касается клинического применения гликомодифицированных антител, удаление внутреннего остатка фукозы в N-гликанах IgG-Fc приводит к значительному усилению (больше чем в 50 раз) антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в результате улучшения связывания IgG с FcR рецептором IIIa (FcRIIIa) (Ymane-Ohnuki et al., 2004; Iida et al., 2009). Несколько исследований показали, что присутствие остатков фукозы может привести к серьезному снижению эффективности ADCC. Несколько академических групп и фармацевтических компаний в настоящее время сосредоточены на разработке новых клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные моноклональные антитела, таких как линии клеток CHO с делецией гена FUT8, кодирующего фермент α-1,6-фукозилтрансферазу, или с повышенной экспрессией рекомбинантной β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, что приводит к получению антител, богатых бисекторными и нефукозилированными олигосахаридами.

III. Фармацевтические составы и лечение заболеваний

A. Онкологические заболевания

Рак возникает в результате разрастания клональной популяции клеток из ткани. Развитие рака, называемое канцерогенезом, можно моделировать и характеризовать различными способами. Связь между развитием рака и воспалением была давно отмечена. Воспалительный ответ связан с защитой хозяина от микробной инфекции, а также способствует восстановлению и регенерации тканей. Многочисленные данные указывают на связь между воспалением и риском развития рака, т.е. хроническое воспаление может привести к дисплазии.

Раковые клетки, в отношении которых могут применяться способы согласно настоящему изобретению, включают, в целом, любые клетки, которые экспрессируют MUC1, и, в частности, клетки с сверхэкспрессией MUC1. Подходящей раковой клеткой может быть клетка рака молочной железы, рака легкого, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака почки, рака желудка, рака печени, рака костей, гемобластоза (например, лейкоза или лимфомы), рака из нервной ткани, меланомы, рака яичника, рака яичка, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака влагалища или рака мочевого пузыря. Кроме того, способы настоящего изобретения могут применяться к широкому кругу биологических видов, например, к человеку, приматам кроме человека (например, обезьянам, бабуинам или шимпанзе), лошадям, крупному рогатому скоту, свиньям, овцам,

козам, собакам, кошкам, кроликам, морским свинкам, песчанкам, хомякам, крысам и мышам. Рак также может быть рецидивирующим, метастатическим и/или полирезистентным, и способы согласно настоящему изобретению могут, в частности, применяться к таким формам рака, чтобы сделать их резектабельными, продлить или повторно вызвать ремиссию, ингибировать ангиогенез, предотвратить или ограничить метастазирование, и/или лечить формы рака с множественной лекарственной резистентностью. На клеточном уровне это может привести к уничтожению раковых клеток, ингибированию роста раковых клеток или иной реверсии или уменьшению злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

В. Воспалительные заболевания и состояния

Роль MUC1 в патологических состояниях помимо рака хорошо известна. Недавно Куфе с соавт. (Kufe et al., JCI Insight, 5(12):137112, 2020) сообщили о роли MUC1 при колите и прогрессировании колоректального рака, а Алимова с соавт. сообщили о роли MUC1 при инфекциях SARS-CoV-2 и повреждении легких (Alimova et al., doi: 10.1101/2020.06.30.180380, 2020). Ниже приводится общее обсуждение возможных воспалительных патологических состояний и нарушений, при которых могут применяться описанные в настоящем документе антитела и их фрагменты.

1. Сепсис

Сепсис - это серьезное патологическое состояние, характеризующееся воспалительным процессом во всем организме, вызванным инфекцией. Традиционно термин сепсис используется взаимозаменяемо с септициемией ("заражением крови"). Однако эти термины больше не считаются синонимами; септицемия считается разновидностью сепсиса.

Симптомы сепсиса часто связаны с основным инфекционным процессом. Когда инфекция переходит в сепсис, возникают симптомы синдрома системного воспалительного ответа (ССВО): общее воспаление, лихорадка, повышение количества лейкоцитов (лейкоцитоз), увеличение частоты сердечных сокращений (тахикардия) и частоты дыхания (тахипноэ). В дополнение к перечисленному выше симптомы также включают гриппоподобный озноб.

Иммунологический ответ, который вызывает сепсис, представляет собой системный воспалительный ответ, вызывающий обширную активацию путей воспаления и активации свертывания крови. Такое состояние может прогрессировать до дисфункции системы кровообращения и даже при оптимальном лечении может привести к синдрому полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти.

Считается, что сепсис присутствует, если имеется обоснованное подозрение или доказано наличие инфекции, и присутствуют два или больше из следующих критериев синдрома системного воспалительного ответа (ССВО):

частота сердечных сокращений >90 ударов в минуту

температура тела <36 (96,8°F) или >38°C (100,4°F)

гипервентиляция (высокая частота дыхания или тахипноэ) >20 вдохов в минуту

или, по содержанию газов в крови, P_aCO_2 меньше 32 мм рт.ст.

количество лейкоцитов <4000 клеток/ mm^3 или >12000 клеток/ mm^3 ($<4 \times 10^9$ или $>12 \times 10^9$ клеток/л) или больше 10% палочкоядерных нейтрофилов (незрелых лейкоцитов).

Однако консенсусные определения продолжают развиваться, и в последнее время список признаков и симптомов сепсиса расширяется, чтобы отразить клинический опыт, полученный при уходе за больными.

Наиболее опасными подтипами сепсиса являются тяжелый сепсис (сепсис с острой органной недостаточностью) и септический шок (сепсис с рефрактерной артериальной гипотензией). В альтернативе, когда соблюдены два или более критериев синдрома системного воспалительного ответа без признаков инфекции, пациентам может быть поставлен простой диагноз "ССВО". Пациентов с ССВО и острой органной недостаточностью можно назвать "тяжелым ССВО".

Пациенты определяются как имеющие "тяжелый сепсис", если у них присутствует сепсис с признаками системной гипоперфузии; ишемическая дисфункция органов или уровень лактата в сыворотке выше 4 ммоль/дл. Считается, что у пациента септический шок, если у него развился сепсис с гипотензией после соответствующего болюсного введения жидкости (обычно 20 мл/кг кристаллоида). Критерии диагностики сепсиса у взрослых не применяются у грудных детей возрастом до одного месяца. У грудных детей для постановки диагноза требуется только присутствие инфекции плюс "комплекс" признаков и симптомов, согласующихся с системным ответом на инфекцию.

Терапия сепсиса основывается на применении антибиотиков, хирургическом дренировании скоплений инфицированной жидкости, восполнении потерь жидкости и соответствующей поддержке при органной недостаточности. Это может включать гемодиализ при почечной недостаточности, искусственную вентиляцию легких при легочной недостаточности, переливание препаратов крови, лекарственную и инфузионную терапию при нарушении кровообращения. Обеспечение адекватного питания, при необходимости парентерального питания, важно при длительном течении заболевания.

Проблемой адекватного ведения пациентов с сепсисом является задержка в применении терапии после того, как сепсис был диагностирован. Опубликованные исследования показали, что каждый час задержки при назначении соответствующей антибиотикотерапии приводит к увеличению смертности на 7%. Было организовано крупное международное сотрудничество для консультаций по сепсису и улучшения результатов лечения пациентов с сепсисом под названием "Кампания по выживанию при сепсисе" (Surviving Sepsis Campaign). Кампания опубликовала основанный на подтвержденных данных обзор стратегий лечения при тяжелом сепсисе с целью опубликовать полный набор руководств в последующие годы.

Большинство методов терапии, направленных непосредственно на сам воспалительный процесс, не улучшали результаты лечения, однако было показано, что дротрекогин альфа (активированный белок С, один из факторов свертывания крови)

снижает смертность приблизительно на 31% и до приблизительно 25% при тяжелом сепсисе. Для наличия показания к назначению дротрекогина альфа пациент должен иметь тяжелый сепсис или септический шок с оценкой по шкале APACHE II 25 баллов или выше и низкий риск кровотечения. Лечение низкими дозами гидрокортизона показало многообещающие результаты у пациентов с септическим шоком и относительной недостаточностью надпочечников, определяемой с помощью теста стимуляции АКТГ.

Стандартное лечение грудных детей с подозрением на сепсис состоит из поддерживающей терапии, поддержания баланса жидкости путем внутривенного введения жидкости и комбинации β -лактамовых антибиотиков (таких как ампициллин) с аминогликозидами, такими как гентамицин.

2. Травма

Физическая травма - это серьезное и изменяющее анатомию или физиологию тела физическое повреждение, такое как ампутация конечности. Тупая травма, тип физической травмы, вызванной ударом или другой силой, приложенной от или посредством тупого предмета, тогда как проникающая травма - это тип физической травмы, при которой кожа или ткани прокалываются предметом. Травму также можно охарактеризовать как случайную, например несчастный случай, или запланированную, в случае хирургического вмешательства. Оба варианта могут характеризоваться повреждением тканей, от легкого до тяжелого, кровопотерей и/или шоком, и оба могут привести к последующей инфекции, в том числе сепсису. В настоящем изобретении предложено лечение травмы, включающее предварительную обработку (в случае медицинской процедуры) и лечение, когда травматическое повреждение уже произошло.

Хирургическое вмешательство. В хирургии используются оперативные мануальные и инструментальные методы для исследования и/или лечения у пациента патологического состояния, такого как заболевание или травма, для улучшения функции организма или внешнего вида тела, а иногда также по какой-либо другой причине. Настоящее изобретение может быть направлено на лечение травмы, полученной в результате хирургического вмешательства, как дополнительно определено ниже.

Как правило, процедура считается хирургической, когда она включает разрез тканей пациента или закрытие ранее полученной раны. Другие процедуры, которые не обязательно подпадают под эту категорию, такие как ангиопластика или эндоскопия, могут считаться хирургическим вмешательством, если они включают обычные хирургические процедуры или условия, такие как использование стерильной среды, анестезии, антисептических условий, типичных хирургических инструментов и наложения швов или скоб. Все формы хирургии считаются инвазивными процедурами; так называемая неинвазивная хирургия обычно относится к иссечению, которое не проникает в затрагиваемую структуру (например, лазерная абляция роговицы), или к радиохирургической процедуре (например, облучению опухоли). Операция может длиться от нескольких минут до часов.

Хирургические процедуры обычно классифицируют по срочности, типу

процедуры, подвергаемой вмешательству системе организма, степени инвазивности и специальным техническим средствам. Плановую операцию проводят для коррекции состояния, не угрожающего жизни, и проводят по желанию пациента, при условии наличия хирурга и хирургического помещения. Неотложная хирургия - это хирургическое вмешательство, которое необходимо выполнить быстро, чтобы спасти жизнь, конечность или функциональную способность. Диагностическую хирургию проводят, чтобы способствовать установлению или подтверждению диагноза. Терапевтическая хирургия направлена на лечение ранее диагностированного состояния.

Ампутация включает в себя отсечение части тела, обычно конечности или пальца. Реплантиция предполагает повторное приживление отрезанной части тела. Реконструктивная хирургия включает реконструкцию поврежденной, изуродованной или деформированной части тела. Косметическую хирургию проводят для улучшения внешнего вида нормальной структуры. Резекция - это изъятие органа, ткани или другой части тела пациента. Трансплантационная хирургия - это замена органа или части тела путем приживления другого органа или части тела другого человека (или животного) пациенту. Изъятие органа или части тела у живого человека или животного для использования в трансплантации также является разновидностью хирургии.

Когда хирургическое вмешательство проводят на одной системе органов или структуре, его можно классифицировать по подвергаемому вмешательству органу, системе органов или ткани. Примеры включают кардиохиргию (проводят на сердце), хирургию желудочно-кишечного тракта (проводят на пищеварительном тракте и его вспомогательных органах) и ортопедическую хирургию (проводят на костях и/или мышцах).

Малоинвазивная хирургия включает создание наружных разрезов меньшего размера для введения миниатюрных инструментов в полость или структуру тела, как при лапароскопической хирургии или ангиопластике. В отличие от этого, открытое хирургическое вмешательство требует создания большого разреза для доступа к интересующей области. Лазерная хирургия предполагает применение лазера для разреза ткани вместо скальпеля или аналогичных хирургических инструментов. Микрохирургия включает в себя применение операционного микроскопа, чтобы хирург мог видеть малые структуры. В роботизированной хирургии используется хирургический робот, такой как хирургические системы Da Vinci или Zeus, для управления инструментами под руководством хирурга.

Травматическая геморрагия. Травматическое кровоизлияние составляет наиболее распространенное во всем мире последствие повреждения, вызывающее наибольшую долю смертей и приводящее к тяжелым состояниям у пострадавших. Несмотря на различия в догоспитальной помощи, неотложная помощь при травматической геморрагии во всем мире одинакова и следует общепринятым опубликованным рекомендациям. Уход за тяжело травмированным пациентом состоит из четырех, часто перекрывающихся компонентов: фазы реанимации, оперативного

вмешательства и интенсивной терапии. Диагностика и остановка кровотечения должны иметь высокий приоритет на всех этапах оказания помощи при травмах, и это особенно важно у пациентов с геморрагическим шоком. Первичные попытки остановки кровотечения включают прямую остановку видимых источников сильного кровотечения с помощью прямого приложения давления, наложения давящих повязок или жгутов; стабилизацию переломов длинных костей и таза; и поддержание пациента в тепле. Во время реанимационной фазы обеспечивают внутривенное введение подогретых жидкостей, реанимацию при допустимой гипотензии перед хирургической остановкой кровотечения и соответствующее переливание крови и препаратов крови. В операционной фазе обеспечивают хирургическую остановку кровотечения и устранение других повреждений, и дополнительную трансфузию. Наконец, фаза интенсивной терапии обеспечивает послеоперационную поддержку и перфузию тканей.

3. Острый панкреатит

Острый панкреатит - это быстроразвивающееся воспаление поджелудочной железы. В зависимости от своей тяжести, он может вызвать серьезные осложнения и приводить к высокой смертности, несмотря на лечение. Тогда как легкие случаи часто успешно поддаются лечению консервативными мерами или лапароскопией, тяжелые случаи требуют инвазивной хирургии (часто более одного вмешательства) для сдерживания патологического процесса.

4. Острый респираторный дистресс-синдром

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), также известный как респираторный дистресс-синдром (РДС) или респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ, в отличие от РДСН), представляет собой серьезную реакцию на различные формы повреждений легких. Это наиболее опасное нарушение, приводящее к отеку при повышенной проницаемости легких.

ОРДС представляет собой тяжелое заболевание легких, вызванное различными прямыми и непрямыми повреждениями. Он характеризуется воспалением паренхимы легких, приводящим к нарушению газообмена с сопутствующим системным высвобождением медиаторов воспаления, что вызывает воспаление, гипоксемию и часто приводит к полиорганной недостаточности. Это состояние опасно для жизни и часто приводит к летальному исходу, обычно требуя искусственной вентиляции легких и госпитализации в отделение интенсивной терапии. Менее тяжелая форма называется острым повреждением легких (ОПЛ).

ОРДС может развиваться в течение 24-48 часов после повреждения или острого начала заболевания. В таком случае у пациента обычно наблюдаются одышка, тахипноэ и симптомы, связанные с первопричиной, т.е. шок. Его также могут спровоцировать заболевания с длительным течением, такие как малярия. Также ОРДС может возникать через некоторое время после возникновения особо острого случая инфекции.

Исследование газового состава артериальной крови и рентгенография грудной клетки позволяют поставить формальный диагноз на основании вышеупомянутых

критериев. Хотя обычно включают тяжелую гипоксемию, соответствующее пороговое значение, определяющее отклонение от нормы PaO_2 , никогда систематически не исследовали. Нужно исключить любую кардиогенную причину отека легких. Это можно сделать, установив катетер в легочную артерию для измерения давления заклинивания в легочной артерии. Однако в этом нет необходимости, и в настоящее время это делают редко, поскольку появилось множество доказательств, демонстрирующих, что применение катетеризации легочной артерии не приводит к улучшению результатов у пациентов с критическими состояниями, включая ОРДС. Простой рентгенографии грудной клетки в большинстве случаев достаточно для документирования двусторонних альвеолярных инфильтратов. Хотя КТ дает более точные изображения паренхимы легких при ОРДС, она малоэффективна при клиническом ведении пациентов с ОРДС и остается в основном исследовательским инструментом.

Лечение острого респираторного дистресс-синдрома обычно проводят с применением искусственной вентиляции легких в отделении интенсивной терапии. Вентиляцию обычно проводят путем оротрахеальной интубации или трахеостомии, если считается неизбежной длительная вентиляция (≥ 2 недели). Возможности неинвазивной вентиляции ограничены только ранним периодом заболевания или, что лучше, профилактикой у лиц, подверженных риску развития заболевания (атипичные пневмонии, ушиб легкого, больные после обширных операций). Лечение первопричины является обязательным, поскольку оно имеет тенденцию сохранения картины ОРДС. Должна быть назначена соответствующая антибиотикотерапия, как только становятся доступными результаты микробиологического посева. Эмпирическая терапия может быть целесообразной при эффективном микробиологическом контроле в учреждении. Более 60% пациентов с ОРДС переносят (нозокомиальную) легочную инфекцию либо до, либо после поражения легких. Источник инфекции, если ее можно лечить хирургическим путем, необходимо оперировать. При подтвержденном диагнозе сепсиса надлежит задействовать соответствующие протоколы, действующие в учреждении.

5. Ишемическое реперфузионное повреждение

Реперфузионное повреждение относится к повреждению ткани, вызванному восстановлением кровоснабжения ткани после периода ишемии. Отсутствие кислорода и питательных веществ, поступающих с кровью, создает состояние, при котором восстановление кровообращения приводит к воспалению и окислительному повреждению в результате индукции окислительного стресса, но не к восстановлению нормальной функции.

Нарушение при реперфузионном повреждении частично связано с воспалительным ответом поврежденных тканей. Лейкоциты, переносимые в эту область с возвратом кровоснабжения, выделяют множество воспалительных факторов, таких как интерлейкины, а также свободные радикалы в ответ на повреждение тканей. Восстановление кровоснабжения возвращает в клетки кислород, который повреждает клеточные белки, ДНК и плазматическую мембрану. Повреждение клеточной мембраны, в

свою очередь, может вызвать высвобождение еще большего количества свободных радикалов. Такие активные формы также могут ненапрямую действовать в передаче окислительно-восстановительных сигналов, включая апоптоз. Лейкоциты также могут накапливаться в мелких капиллярах, закупоривая их и приводя к еще большей ишемии.

Реперфузионное повреждение играет роль в ишемическом каскаде головного мозга, который связан с инсультом и поражением головного мозга. Повторяющиеся эпизоды ишемического и реперфузионного повреждения также считаются фактором, ведущим к образованию и плохому заживлению хронических ран, таких как пролежни и язвы при синдроме диабетической стопы. Постоянное давление ограничивает кровоснабжение и вызывает ишемию, а при реперфузии возникает воспаление. Поскольку этот процесс повторяется, он в конечном итоге повреждает ткани настолько, что вызывает образование раны.

При длительной ишемии (60 мин и дольше) в качестве продукта расщепления АТФ образуется гипоксантин. Фермент ксантиндегидрогеназа превращается в ксантинооксидазу в результате повышения доступности кислорода. Это окисление приводит к превращению молекулярного кислорода в высокореакционноспособные супероксидные и гидроксильные радикалы. Ксантинооксидаза также участвует в образовании мочевой кислоты, которая может действовать как прооксидант и как акцептор активных радикалов, таких как пероксинитрит. Избыток оксида азота, образующийся во время реперфузии, реагирует с супероксидом с образованием высокоактивного аниона пероксинитрита. Такие радикалы и активные формы кислорода атакуют липиды, белки и гликозаминогликаны клеточных мембран, вызывая еще большее повреждение. Они также могут инициировать специфические биологические процессы посредством передачи окислительно-восстановительных сигналов.

6. Сердечно-сосудистые заболевания

Сердечно-сосудистые заболевания относятся к классу заболеваний, поражающих сердце или кровеносные сосуды (артерии и вены). Хотя технически данный термин относится к любому заболеванию, поражающему сердечно-сосудистую систему, обычно его используют для обозначения заболеваний, связанных с атеросклерозом (заболеванием артерий). Эти состояния имеют сходные причины, механизмы и методы лечения. Лечение сердечно-сосудистых заболеваний зависит от конкретной формы заболевания у каждого пациента, однако эффективное лечение всегда включает превентивные изменения образа жизни, обсуждаемые выше. Может быть эффективным применение лекарственных средств, таких как гипотензивные препараты, аспирин и гипохолестеринемические средства из группы статинов. В некоторых случаях может потребоваться хирургическое вмешательство или ангиопластика для реканализации, восстановления или замены поврежденных кровеносных сосудов.

Большинство западных стран сталкиваются с высокими и растущими уровнями сердечно-сосудистых заболеваний. Ежегодно болезни сердца убивают больше жителей США, чем рак. Одни только болезни сердца вызывают 30% всех случаев смерти, а другие

болезни сердечно-сосудистой системы привели к значительному увеличению смертности и инвалидности. Вплоть до 2005 года они были главной причиной смерти и инвалидности в США и большинстве европейских стран. Большое гистологическое исследование (PDAY) показало, что сосудистые повреждения накапливаются с подросткового возраста, что требует проведения первичной профилактики с детства.

Считается, что некоторые биомаркеры более точно определяют риск сердечно-сосудистых заболеваний. Однако клиническое значение этих биомаркеров сомнительно. В настоящее время биомаркеры, которые могут отражать повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний, включают:

повышенные концентрации фибриногена и PAI-1 в крови

повышенный уровень гомоцистеина, или даже выше половины диапазона нормальных значений

повышенный уровень асимметричного диметиларгинина в крови

сильное воспаление согласно измерению С-реактивного белка

повышенный уровень натрийуретического пептида типа В (BNP) в крови

Различные формы сердечно-сосудистых заболеваний включают аневризмы, стенокардию, аритмию, атеросклероз, кардиомиопатию, цереброваскулярные заболевания, врожденные пороки сердца, хроническую сердечную недостаточность, миокардиты, аномалии клапанов, ишемическую болезнь сердца, дилатационную кардиомиопатию, диастолическую дисфункцию, эндокардит, повышенное артериальное давление (гипертензию), гипертрофическую кардиомиопатию, пролапс митрального клапана, инфаркт миокарда и венозную тромбоэмболию.

7. Аутоиммунное/воспалительное заболевание

Настоящее изобретение предусматривает лечение различных аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, таких как спондилоартропатия, анкилозирующий спондилоартрит, псориазический артрит, реактивный артрит, энтеропатический артрит, язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, семейная средиземноморская лихорадка, боковой амиотрофический склероз, синдром Шегрена, ранний артрит, вирусный артрит, рассеянный склероз, идиопатический легочный фиброз или псориаз. Диагностика и лечение этих заболеваний хорошо описаны в литературе.

8. Токсичность химиотерапии, лучевой терапии и цитокиновой терапии

Различные формы терапии рака, включающие химиотерапию, радиацию и цитокины, связаны с токсическими явлениями, иногда тяжелыми, у онкобольных. В той степени, в какой токсичность вызвана, по меньшей мере частично, внеклеточным воздействием гистонов, настоящее изобретение направлено на снижение такого токсического действия с применением фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, тем самым уменьшая или облегчая дискомфорт у пациента, а также позволяя применять более высокие дозы терапии.

9. Ожоги

В медицине ожог может быть повреждением, вызванным теплом, холодом, электричеством, химическими веществами, трением или излучением. Ожоги первой степени обычно ограничены покраснением (эритемой), белым налетом и незначительной болью в участке повреждения. Эти ожоги обычно распространяются только на эпидермис. Ожоги второй степени дополнительно заполнены прозрачной жидкостью, характеризуются присутствием поверхностных волдырей на коже и могут сопровождаться более или менее интенсивной болью в зависимости от уровня поражения нервов. Ожоги второй степени затрагивают поверхностный (папиллярный) слой дермы, и также могут поражать глубокий (ретикулярный) слой дермы. Ожоги третьей степени дополнительно сопровождаются обугливанием кожи и образованием твердых, жестких струпов. Струп - это корка, отделяется от непораженной части тела. Часто также присутствует пурпурная жидкость. Эти типы ожогов часто безболезненны, так как в обожженных участках повреждены нервные окончания. Серьезные ожоги, особенно если они покрывают большую площадь тела, могут привести к смерти; любое подозрение на ожог легких (например, при вдыхании дыма) требует неотложной медицинской помощи.

Ожоги, которые повреждают ткани, лежащие под кожей, такие как мышцы или кости, иногда классифицируются как ожоги четвертой степени. Эти ожоги подразделяются на три дополнительные степени: ожоги четвертой степени приводят к безвозвратной потере кожи, ожоги пятой степени приводят к безвозвратной потере мышц, а ожоги шестой степени приводят к обуглению костей.

Более новая классификация "Поверхностная толщина", "Частичная толщина" (которая подразделена на поверхностные и глубокие категории) и "Полная толщина" более точно описывают эпидермис, дерму и подкожные слои кожи и используется для руководства при лечении и прогнозировании результатов.

Химические ожоги обычно вызываются химическими соединениями, такими как гидроксид натрия (щелочь), нитрат серебра, и более опасными соединениями (например, серная кислота). Большинство химических веществ (но не все), которые могут вызывать химические ожоги средней и тяжелой степени, представляют собой сильные кислоты или основания. Азотная кислота, как окислитель, возможно, является одним из самых опасных химических веществ, вызывающих ожоги. Плавиковая кислота может разъедать ткани до кости, и ее ожоги часто не сразу заметны. Большинство химических веществ, которые могут вызывать химические ожоги средней и тяжелой степени, называются едкими.

Электрические ожоги, как правило, являются симптомами поражения электрическим током, удара молнии, дефибрилляции или кардиоверсии без токопроводящего геля и т.д. Полученные внутренние повреждения могут быть непропорциональны размеру видимых "ожогов", поскольку это только входные и выходные раны при поражении электрическим током.

Ожоги оценивают относительно общей площади поверхности тела (ОППТ), которая представляет собой процент площади поражения частичными или полными

ожогами (ожоги поверхностных слоев не учитываются). Правило девяток используется как быстрый и удобный способ оценки пораженной площади от ОППТ. Первым этапом при лечении лица с ожогом является остановка процесса горения. При ожогах сухим порошком сначала следует стряхнуть порошок. При других ожогах пораженный участок следует промыть большим количеством чистой воды, чтобы удалить инородные тела и помочь остановить процесс горения. Ни в коем случае нельзя применять холодную воду у лиц с обширными ожогами, так как это может серьезно ухудшить температурный статус пострадавшего от ожога. На этом этапе так же важно оценить состояние дыхательных путей. Если пациент испытал воздействие огня, то следует предположить, что он или она получил поражение дыхательных путей, пока не подтверждено обратное, и лечение следует вести соответствующим образом.

После того, как процесс горения был остановлен, и подтверждено состояние дыхательных путей, пациенту следует провести восполнение объема жидкости по формуле Паркланда. Эта формула указывает, что количество лактированного раствора Рингера, которое нужно ввести в первые двадцать четыре часа после поражения, составляет:

$$\text{жидкость} = 4 \text{ мл} \times \% \text{ ОППТ} \times \text{вес в кг}$$

% ОППТ исключает ожоги первой степени

Половину объема этой жидкости нужно ввести в первые восемь часов после поражения, а оставшуюся часть - в следующие шестнадцать часов. Формула является приближенной, и инфузии нужно корректировать по диурезу и центральному венозному давлению. Недостаточная инфузионная поддержка вызывает почечную недостаточность и смерть. Сильный отек при ожогах полной толщины можно лечить с помощью эшаротомии.

С. Инфекционное заболевание

Еще одной категорией воспалительных заболеваний являются инфекции, включая вирусные, бактериальные, грибковые и патогенные. Конкретными инфекционными заболеваниями, при которых MUC1, как было показано, играет некую роль, являются инфекции, вызванные SARS-CoV-2, вирусом папилломы человека и *H. pylori*.

D. Состав и введение

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, включающие антитела против MUC1-C. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для ветеринарного и, в частности, медицинского применения. Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п.

Другие подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, раствор хлорида натрия, декстрозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерилмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п.

Композиции могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как анионы, образующиеся из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как катионы, образующиеся из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Антитела согласно настоящему изобретению могут включать классические фармацевтические препараты. Введение таких композиций в соответствии с настоящим изобретением будут осуществлять любым обычным путем при условии, что ткань-мишень доступна для такого пути. Он включает пероральный, назальный, трансбуккальный, ректальный, вагинальный или наружный. В альтернативе введение могут производить путем внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекции. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, описанных выше. Особый интерес представляет прямое внутриопухолевое введение, перфузия опухоли или местное или регионарное введение в опухоль, например, в местную или регионарную сосудистую или лимфатическую систему или в ложе удаленной опухоли.

Активные соединения также могут вводить парентерально или внутрибрюшинно. Растворы активных соединений в форме свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения такие препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Е. Комбинированная терапия рака

В контексте настоящего описания также предполагается, что антитела против MUC1-C, описанные в настоящем документе, могут применяться аналогичным образом в сочетании с химио- или радиотерапевтическим вмешательством или другими видами лечения. Также может оказаться эффективным, в частности, комбинирование антител против MUC1-C/ECD с другими формами терапии, которые воздействуют на другие аспекты функции MUC1, такими как пептиды и малые молекулы, направленно взаимодействующие с цитоплазматическим доменом MUC1.

Чтобы уничтожить клетки, ингибировать рост клеток, ингибировать метастазирование, ингибировать ангиогенез или иным образом вызвать реверсию или уменьшить злокачественный фенотип опухолевых клеток с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению, обычно клетку "мишень" можно

подвергнуть контакту с антителом против MUC1-C согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одним другим средством. Эти композиции могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клеток. Этот процесс может включать одновременный контакт клеток с антителом против MUC1-C в соответствии с настоящим изобретением и другим средством(ами) или фактором(ами). Это может быть достигнуто при контакте клетки с одной композицией или фармакологическим составом, включающим оба средства, или при контакте клетки с двумя разными композициями или составами одновременно, где одна композиция включает антитело против MUC1-C согласно настоящему изобретению, а другая включает другое средство.

В альтернативе терапия антителом против MUC1-C может предшествовать лечению другим средством или следовать после него, с интервалами от минут до недель. В вариантах осуществления, где другое средство и антитело против MUC1 применяют к клетке по отдельности, обычно нужно гарантировать, чтобы между моментом каждой доставки не прошел значительный период времени, чтобы средство и экспрессионная конструкция все еще были способны с преимуществом оказывать комбинированное воздействие на клетку. В таких случаях предполагается, что контакт клетки с обоими средствами можно производить в течение приблизительно 12-24 часов друг после друга, и более предпочтительно в пределах приблизительно 6-12 часов друг после друга, при этом наиболее предпочтительно время задержки составляет всего приблизительно 12 часов. Однако в некоторых ситуациях может быть предпочтительным значительно увеличить период лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Также может потребоваться выполнить больше одного введения либо антитела против MUC1, либо другого средства. Могут использоваться различные комбинации, в которых антитело против MUC1-C в соответствии с терапией согласно настоящему изобретению обозначено "А", а другая терапия обозначено "В", как показано ниже:

A/V/A V/A/V V/V/A A/A/V V/A/A A/V/V V/V/V/A V/V/A/V

A/A/V/V A/V/A/V A/V/V/A V/V/A/A V/A/V/A V/A/A/V V/V/V/A

A/A/A/V V/A/A/A A/V/A/A A/A/V/A A/V/V/V V/A/V/V V/V/A/V

Предусмотрены другие комбинации. Опять же, для обеспечения уничтожения клеток оба средства доставляют в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки.

Средства или факторы, подходящие для лечения рака, включают любое химическое соединение или способ лечения, которые вызывают повреждение ДНК при воздействии на клетку. Такие средства и факторы включают излучение и волны, вызывающие повреждение ДНК, такие как облучение, микроволны, электронное излучение и т.п. Можно использовать различные химические соединения, также называемые "химиотерапевтическими" или "генотоксическими средствами". Это может быть достигнуто путем облучения локализованного очага опухоли; в альтернативе

опухолевые клетки могут быть подвергнуты контакту со средством путем введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

Различные классы химиотерапевтических средств рассматриваются для применения в соответствии с настоящим изобретением. Например, селективные антагонисты эстрогеновых рецепторов ("SERM"), такие как тамоксифен, 4-гидрокситамоксифен (афимоксфен), фазлодекс, ралоксифен, базедоксифен, кломифен, фемарель, лазофоксифен, ормелоксифен и торемифен.

Химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения, включают, например, камптотecin, актиномицин-D, митомицин С. Настоящее изобретение также охватывает применение комбинации одного или больше ДНК-повреждающих средств, независимо от того, основаны ли они на радиации или являются соединениями, такие как применение рентгеновского излучения с цисплатином или применение цисплатина с этопозидом. Средство можно приготавливать и применять в виде комбинированной терапевтической композиции или набора путем комбинирования его с пептидом MUC1, как описано выше.

Белок теплового шока 90 является регуляторным белком, обнаруженным во многих эукариотических клетках. Было показано, что ингибиторы HSP90 можно применять при лечении рака. Такие ингибиторы включают гелданамицин, 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин, PU-H71 и рифабутин.

Также предусмотрены средства, которые непосредственно сшивают ДНК или образуют аддукты. Можно применять такие средства, как цисплатин и другие алкилирующие ДНК средства. Цисплатин широко применяется для лечения рака, при этом в клинических применениях используются эффективные дозы 20 мг/м^2 в течение 5 дней раз в три недели, в общей сложности три курса. Цисплатин не всасывается при приеме внутрь и поэтому его нужно вводить внутривенно, подкожно, внутриопухолево или внутривентриально.

Средства, которые повреждают ДНК, также включают соединения, нарушающие репликацию ДНК, митоз и хромосомную сегрегацию. Такие химиотерапевтические соединения включают адриамицин, также известный как доксорубин, этопозид, верапамил, подофиллотоксин и т.п. Эти соединения, широко используемые в клинических условиях для лечения новообразований, вводят болюсными инъекциями внутривенно в дозах от $25\text{-}75 \text{ мг/м}^2$ с интервалом в 21 день в случае доксорубина до $35\text{-}50 \text{ мг/м}^2$ в случае этопозидов внутривенно или двойную внутривенную дозу перорально. Также рассматриваются ингибиторы микротрубочек, такие как таксаны. Эти молекулы представляют собой дитерпены, продуцируемые растениями рода *Taxus*, и включают паклитаксел и доцетаксел.

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста, такие как Иресса, mTOR, мишень рапамицина у млекопитающих, также известный как FK506-связывающий белок 12-рапамицин-ассоциированный белок 1 (FRAP1), представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, которая регулирует рост клеток, пролиферацию клеток, подвижность

клеток, выживание клеток, синтез белка и транскрипцию. Таким образом, рапамицин и его аналоги ("рапалоги") рассматриваются для применения в терапии рака в соответствии с настоящим изобретением.

Другой возможной терапией является ФНО- α (фактор некроза опухоли-альфа), цитокин, участвующий в системном воспалении, член группы цитокинов, стимулирующих ответ острой фазы. Основная роль ФНО заключается в регуляции иммунных клеток. ФНО также способен вызывать апоптотическую гибель клеток, вызывать воспаление и ингибировать онкогенез и репликацию вирусов.

Средства, которые нарушают синтез и точность предшественников и субъединиц нуклеиновых кислот, также приводят к повреждению ДНК. Таким образом, был разработан ряд предшественников нуклеиновых кислот. Особенно полезными являются средства, которые прошли всестороннее исследование и легко доступны. Таким образом, средства, такие как 5-фторурацил (5-ФУ), предпочтительно используются неопластической тканью, что делает это средство особенно полезным для направленного воздействия на опухолевые клетки. Хотя 5-ФУ довольно токсичен, его можно применять с широким спектром носителей, в том числе наружно, однако обычно применяют внутривенное введение в дозах от 3 до 15 мг/кг/сутки.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко применяются, включают так называемое γ -излучение, рентгеновское излучение и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Также рассматриваются другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволновое излучение и УФ-излучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы вызывают целый ряд разнообразных повреждений ДНК, воздействуя на предшественников ДНК, репликацию и репарацию ДНК, а также на сборку и поддержку хромосом. Диапазон доз для рентгеновское излучения варьирует от суточных доз 50-200 рентген в течение длительных периодов времени (3-4 недели) до однократных доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз радиоизотопов изменяются в широких пределах и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения и поглощения опухолевыми клетками.

Кроме того, также предполагается, что может применяться иммунотерапия, гормональная терапия, токсинотерапия и хирургическое вмешательство. В частности, могут применяться средства таргетной терапии, такие как Авастин, Эрбитукс, Гливек, Герцептин и Ритуксан.

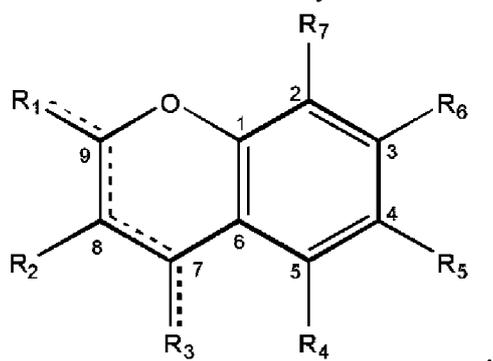
Одним из особенно выгодных подходов к комбинированной терапии является выбор в качестве второго средства такого средства, которое направленно взаимодействует с MUC1. В одновременно находящейся на рассмотрении заявке, поданной авторами настоящего изобретения, раскрыты способы ингибирования MUC1-положительной опухолевой клетки у субъекта, включающие введение указанному субъекту пептида MUC1 по меньшей мере из 4 последовательных остатков MUC1 и не больше чем 20 последовательных остатков MUC1, и включающего последовательность CQC, где N-концевой цистеин в CQC закрыт на своем NH₂-конце по меньшей мере одним

аминокислотным остатком, который не должен обязательно соответствовать нативной трансмембранной последовательности MUC-1. Пептид может включать по меньшей мере 5 последовательных остатков MUC1, по меньшей мере 6 последовательных остатков MUC1, по меньшей мере 7 последовательных остатков MUC1, по меньшей мере 8 последовательных остатков MUC1, и последовательность может, в частности, включать CQCR (SEQ ID NO: 31), CQCRR (SEQ ID NO: 32), CQCRRR (SEQ ID NO: 33), CQCRRRR (SEQ ID NO: 34), CQCRRK (SEQ ID NO: 35), CQCRRKN (SEQ ID NO: 36) или RRRRRRRRCQCRRKN (SEQ ID NO: 37). Пептид может содержать не больше 10 последовательных остатков, 11 последовательных остатков, 12 последовательных остатков, 13 последовательных остатков, 14 последовательных остатков, 15 последовательных остатков, 16 последовательных остатков, 17 последовательных остатков, 18 последовательных остатков или 19 последовательных остатков MUC1. Пептид может быть слит с доменом для доставки в клетку, таким как поли-D-R, поли-D-P или поли-D-K. Пептид может включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот. См. патент США 8,524,669.

Вариант этой технологии описан в заявке на патент США под номером 13/026,858. В этой заявке раскрыты способы ингибирования MUC1-положительной раковой клетки, включающие контакт клетки с пептидом MUC1, состоящим по меньшей мере из 4 последовательных остатков MUC1 и не больше чем 20 последовательных остатков MUC1, и включающим последовательность CQC, где: (i) N-концевой цистеин CQC закрыт на своем NH₂-конце по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не должен обязательно соответствовать нативной трансмембранной последовательности MUC1; и (ii) пептид включает 3-5 последовательных положительно заряженных аминокислотных остатка в дополнение к положительно заряженным аминокислотным остаткам, соответствующим нативным остаткам MUC1. MUC1-положительная клетка может быть клеткой солидной опухоли, такой как клетка рака легкого, клетка рака головного мозга, клетка рака головы и шеи, клетка рака молочной железы, клетка рака кожи, клетка рака печени, клетка рака поджелудочной железы, клетка рака желудка, клетка рака толстой кишки, клетка рака прямой кишки, клетка рака матки, клетка рака шейки матки, клетка рака яичника, клетка рака яичка, клетка рака кожи или клетка рака пищевода. MUC1-положительная клетка может быть клеткой лейкоза или миеломы, таких как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома. Пептид может быть скрепленным пептидом, циклизированным пептидом, пептидомиметиком или пептоидом. Способ может дополнительно включать контакт клетки со вторым противоопухолевым средством, например, когда контакт со вторым противоопухолевым средством происходит до пептида, после пептида или одновременно с пептидом. Ингибирование может включать ингибирование роста раковых клеток, пролиферации раковых клеток или индукцию гибели раковых клеток, например, путем апоптоза.

Еще одна технология, предложенная авторами изобретения (см. заявку на патент

США 13/045,033), включает способы ингибирования воспалительной сигнализации в клетке, включающие контакт указанной клетки с флавоном, имеющим структуру:



или его солью, где:

R_1 представляет собой H, -ОН, =О, замещенный или незамещенный алкил(C_{1-8}), алкокси(C_{1-8}), галогеналкил(C_{1-8}), замещенный фенил или незамещенный фенил, где в случае, если R_1 представляет собой =О, C_7-C_8 является двойной связью;

R_2 представляет собой H, -ОН, алкил(C_{1-8}), замещенный фенил, незамещенный фенил, фенил, фенилтиазол, имидазол, пиразол или фуран;

R_3 представляет собой H, -ОН, =О, галоген, галогеналкил(C_{1-8}), замещенный или незамещенный алкил(C_{1-8}), замещенный фенил или незамещенный фенил, где в случае, если R_3 представляет собой =О, C_8-C_9 является двойной связью;

R_4 представляет собой H или -ОН;

R_5 представляет собой H, -ОН, замещенный или незамещенный алкил(C_{1-8}) или алкокси(C_{1-8}), или OR_8 , где R_8 представляет собой алкил(C_{1-8}), сложный эфир или амид;

R_6 представляет собой H, -ОН, замещенный или незамещенный алкил(C_{1-8}) или алкокси(C_{1-8}), или OR_8 , где R_8 представляет собой алкилом(C_{1-8}), сложный эфир или амид;

и

R_7 представляет собой H, -ОН или замещенный или незамещенный алкил(C_{1-8}), при условии, что R_1 и R_3 не могут быть одновременно =О.

R_1 может быть =О. R_3 может быть =О. Флавоны содержатся в морине, апигенине, кемпфероле, фисетине, PD98059, 7-(бензилокси)-4-(трифторметил)-2Н-хромен-2-оне или 7-[(3-оксобутан-2-ил)окси]-4-фенил-2Н-хромен-2-оне, или соли любого из перечисленных выше.

Специалист может обратиться к 15-му изданию "Remington's Pharmaceutical Sciences", Главе 33, в частности, страницам 624-652. Некоторое изменение дозы непременно потребуется в зависимости от состояния субъекта, проходящего лечение. Лицо, ответственное за введение, в любом случае, определит подходящую дозу для отдельного субъекта. Кроме того, в случае медицинского применения, препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, установленным Департаментом стандартов биологических препаратов FDA.

IV. Конъюгаты антител

Антитела могут быть соединены по меньшей мере с одним средством с получением

конъюгата антитела. Для повышения эффективности молекул антител в качестве диагностических или терапевтических средств их часто соединяют или ковалентно связывают или получают их комплексы по меньшей мере с одной требуемой молекулой или фрагментом. Такой молекулой или фрагментом может быть, без ограничения этим, по меньшей мере одна эффекторная или репортерная молекула. Эффекторные молекулы включают молекулы, обладающие требуемой активностью, например, иммуносупрессорной/противовоспалительной активностью. Неограничивающие примеры таких молекул представлены выше. Такие молекулы необязательно присоединяют посредством расщепляемых линкеров, предназначенных для обеспечения высвобождения молекул на участке-мишени или рядом с ним.

В отличие от этого, репортерная молекула определена как любой фрагмент, который можно обнаружить с помощью анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, которые были конъюгированы с антителами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, фотоаффинные молекулы, цветные частицы или лиганды, такие как биотин.

Конъюгаты антител обычно предпочтительны для применения в качестве диагностических средств. Диагностические средства на основе антител обычно подразделяются на два класса: средства для применения в диагностике *in vitro*, например, в различных иммуноанализах, и средства для применения в диагностических протоколах *in vivo*, обычно известных как "антителонаправленная визуализация". Многие подходящие визуализационные средства, а также способы их присоединения к антителам известны в уровне техники (см., например, патенты США 5,021,236, 4,938,948 и 4,472,509). Используемые визуализационные фрагменты могут быть парамагнитными ионами, радиоактивными изотопами, флуорохромами, ЯМР-детектируемыми веществами и рентгеноконтрастными веществами.

В случае парамагнитных ионов в качестве примера могут быть указаны такие ионы, как хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), неодим (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III) и/или эрбий (III), при этом особенно предпочтительным является гадолиний. Ионы, используемые в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают, без ограничения, лантан (III), золото (III), свинец (II) и особенно висмут (III).

В случае радиоактивных изотопов для терапевтического и/или диагностического применения можно указать астат²¹¹, ¹⁴углерод, ⁵¹хром, ³⁶хлор, ⁵⁷кобальт, ⁵⁸кобальт, медь⁶⁷, ¹⁵²Еу, галлий⁶⁷, ³водород, иод¹²³, иод¹²⁵, иод¹³¹, индий¹¹¹, ⁵⁹железо, ³²фосфор, рений¹⁸⁶, рений¹⁸⁸, ⁷⁵селен, ³⁵сера, техний^{99m} и/или иттрий⁹⁰. Часто в некоторых вариантах осуществления предпочтительнее использовать ¹²⁵I, а техний^{99m} и/или индий¹¹¹ также часто предпочтительнее из-за своей низкой энергии и пригодности для обнаружения на большом расстоянии. Радиоактивно меченные моноклональные антитела могут быть

получены в соответствии с хорошо известными способами. Например, моноклональные антитела можно иодировать при контакте с иодидом натрия и/или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окислителем, таким как лактопероксидаза. Моноклональные антитела могут быть помечены технецием^{99m} в процессе замены лиганда, например, путем восстановления пертехната раствором двухвалентного олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесения антитела на эту колонку. В альтернативе можно использовать методики прямого мечения, например, путем инкубирования пертехната, восстановителя, такого как SNCl_2 , буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия, и антитела. Промежуточные функциональные группы часто используются для связывания радиоизотопов с антителами и существуют в виде ионов металлов, таких как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Флуоресцентные метки, рассматриваемые для применения в конъюгатах, включают Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, флуоресцеинизотиоцианат, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, родаминовый зеленый, родаминовый красный, Renographin, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или Texas Red.

Еще одним рассматриваемым типом конъюгатов антител являются конъюгаты, предназначенные в первую очередь для применения *in vitro*, где антитело соединено с вторичным связывающим лигандом и/или с ферментом (ферментной меткой), которые образуют окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу (хрена) или глюкозооксидазу. Предпочтительными вторичными связывающими лигандами являются соединения биотина и авидина и стрептавидина. Применение таких меток хорошо известно специалистам в данной области и описано, например, в патентах США 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 и 4,366,241.

Еще один известный способ сайт-специфического присоединения молекул к антителам включает реакцию антител с аффинными метками на основе гаптен. По существу, аффинные метки на основе гаптен реагируют с аминокислотами в антигенсвязывающем участке, нарушая этот участок и блокируя специфичную реакцию с антигеном. Однако это может быть невыгодно, поскольку приводит к потере связывания антигена конъюгатом антитела.

Молекулы, содержащие азидогруппы, также могут использоваться для образования ковалентных связей с белками с образованием реакционноспособных промежуточных соединений с нитреновыми группами, которые образуются под воздействием ультрафиолетового излучения низкой интенсивности (Potter and Haley, 1983). В частности, 2- и 8-азидоаналоги пуриновых нуклеотидов были использованы в качестве сайт-направленных фотозондов для идентификации нуклеотидсвязывающих белков в

неочищенных клеточных экстрактах (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). 2- и 8-азидонуклеотиды также использовались для картирования нуклеотидсвязывающих доменов очищенных белков (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989) и могут применяться в качестве соединений, связывающих антитела.

В уровне техники известно несколько способов присоединения или конъюгирования антитела и конъюгируемой с ним молекулы. Некоторые способы присоединения включают применение металлохелатного комплекса с использованием, например, органического хелатообразователя, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА); этилентриаминтетрауксусная кислота; N-хлор-п-толуолсульфонамид; и/или тетрахлор-3 α -6 α -дифенилгликоурил-3, присоединенного к антителу (патенты США 4,472,509 и 4,938,948). Моноклональные антитела могут также реагировать с ферментом в присутствии сшивающего агента, такого как глутаровый альдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии таких сшивающих агентов или в реакции с изотиоцианатом. В патенте США 4,938,948 визуализация опухолей молочной железы достигается с применением моноклональных антител, при этом детектируемые визуализационные молекулы связывают с антителом при помощи линкеров, таких как метил-п-гидроксibenзимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

В других вариантах осуществления предусмотрена дериватизация иммуноглобулинов путем селективного введения сульфгидрильных групп в Fc-область иммуноглобулина при использовании таких условий реакции, которые не вызывают изменения связывающего участка антитела. Было раскрыто, что конъюгаты антител, полученные в соответствии с такой методикой, демонстрируют улучшенные период существования, специфичность и чувствительность (патент США 5,196,066, включенный в настоящее описание посредством отсылки). Сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, где репортерная или эффекторная молекула конъюгирована с углеводным остатком в Fc-области, также описано в литературе (O'Shannessy et al., 1987). Такой подход, как сообщали, позволяет получать диагностически и терапевтически перспективные антитела, которые в настоящее время проходят клиническую оценку.

V. Способы иммуноанализа

В дополнительных вариантах осуществления представлены способы иммуноанализа для связывания, очистки, удаления, количественного определения и иного общего обнаружения MUC1 и ассоциированных с ним антигенов. Некоторые способы иммуноанализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА), иммунорадиометрический анализ, иммунофлуоресцентный анализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ, Вестерн-блоттинг и другие. В частности, также предложен конкурентный анализ для обнаружения и количественного определения антител к MUC1-С. Этапы различных полезных методов иммуноанализа описаны в научной литературе, например, Doolittle and Ben-Zeev (1999),

Gulbis and Galand (1993), De Jager et al. (1993) и Nakamura et al. (1987). Как правило, способы иммунного связывания включают получение образца и контакт образца с первым антителом в соответствии с вариантами осуществления, обсуждаемыми в настоящем документе, в зависимости от обстоятельств, при условиях, эффективных для образования иммунных комплексов.

Контакт выбранного биологического образца с антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), как правило, заключается в простом добавлении композиции антитела к образцу и инкубировании смеси в течение определенного периода времени, достаточно длительного, чтобы антитела могли образовать иммунные комплексы, т.е. связались с присутствующим MUC1. По истечении этого времени композицию образца-антитела, такую как срез ткани, планшет для ИФА, дот-блот или Вестерн-блот, обычно промывают для удаления любых не связавшихся специфично молекул антител, при этом остаются только те антитела, которые специфично связаны с первичными иммунными комплексами, подлежащими обнаружению.

В целом, обнаружение образования иммунных комплексов хорошо известно в уровне техники и может быть достигнуто с применением многочисленных подходов. Эти методы обычно основаны на обнаружении метки или маркера, такого как любая из радиоактивных, флуоресцентных, биологических или ферментативных меток. Патенты, связанные с применением таких меток, включают патенты США 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 и 4,366,241. Конечно, можно найти дополнительные преимущества в случае применения вторичного связывающего лиганда, такого как второе антитело и/или система связывания лигандов биотина/авидина, как известно в уровне техники.

Антитело, используемое при детектировании, может быть само связано с детектируемой меткой, при этом можно просто детектировать эту метку, что позволит определить количество первичных иммунных комплексов в композиции. В альтернативном варианте первое антитело, которое связывается с первичными иммунными комплексами, можно детектировать с помощью второго связывающего лиганда, обладающего аффинностью связывания в отношении антитела. В этих случаях второй связывающий лиганд может быть соединен с детектируемой меткой. Вторым связывающим лигандом часто сам является антителом, которое, таким образом, можно назвать "вторичным" антителом. Первичные иммунные комплексы подвергают контакту с меченым вторичным связывающим лигандом или антителом в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования вторичных иммунных комплексов. Затем вторичные иммунные комплексы обычно промывают для удаления любых специфично не связавшихся меченых вторичных антител или лигандов, после чего определяют оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

Другие методы включают обнаружение первичных иммунных комплексов с помощью двухстадийного метода. Вторым связывающим лигандом, такой как антитело,

которое обладает аффинностью связывания с антителом, используется для образования вторичных иммунных комплексов, как описано выше. После промывания вторичные иммунные комплексы подвергают контакту с третьим связывающим лигандом или антителом, которое обладает аффинностью связывания со вторым антителом, опять же в эффективных условиях и в течение периода времени, достаточного для образования иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или антитело соединены с детектируемой меткой, что позволяет обнаруживать образовавшиеся в результате третичные иммунные комплексы. Эта система может обеспечивать возможность амплификации сигнала, если это необходимо.

В одном методе иммуноанализа используются два разных антитела. Первое биотинилированное антитело используется для детектирования антигена-мишени, а второе антитело затем используется для детектирования биотина, присоединенного к биотину в комплексе. В этом методе тестируемый образец сначала инкубируют в растворе, содержащем антитело первой стадии. В случае присутствия антигена-мишени некоторая часть антитела связывается с антигеном с образованием биотинилированного комплекса антитела/антигена. Затем комплекс антитела/антигена амплифицируют путем инкубирования в последовательных растворах стрептавидина (или авидина), биотинилированной ДНК и/или комплементарной биотинилированной ДНК, при этом на каждой стадии в комплекс антитела/антигена добавляют дополнительные сайты биотина. Стадии амплификации повторяют до тех пор, пока не будет достигнут подходящий уровень амплификации, после чего образец инкубируют в растворе, содержащем антитело второй стадии против биотина. Это второе антитело помечено, например, ферментом, который можно использовать для обнаружения присутствия комплекса антитела/антигена с помощью гистоэнзимологии при использовании хромогенного субстрата. При подходящей амплификации можно получить конъюгат, видимый невооруженным глазом.

В другом известном методе иммуноанализа используется методика иммуно-ПЦР (полимеразной цепной реакции). Метод ПЦР аналогичен методу Кантора вплоть до инкубирования с биотинилированной ДНК, однако вместо использования нескольких циклов инкубирования стрептавидина и биотинилированной ДНК комплекс ДНК/биотина/стрептавидина/антитела промывают буфером с низким рН или высокой концентрацией соли с высвобождением антитела. Полученный после промывки раствор затем используют для проведения реакции ПЦР с подходящими праймерами и соответствующими контролями. По меньшей мере, теоретически, огромные возможности амплификации и специфичность ПЦР могут использоваться для обнаружения одной молекулы антигена.

А. ИФА

Иммуноанализы, в самом простом смысле, являются анализами связывания. Некоторыми предпочтительными иммуноанализами являются различные типы твердофазных иммуноферментных анализов (ИФА) и радиоиммуноанализов (РИА), известных в уровне техники. Иммуногистохимическое обнаружение при использовании

срезов тканей также является особенно полезным. Однако легко понять, что обнаружение не ограничено такими методами, и также можно использовать Вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, FACS-анализ и т.п.

В одном иллюстративном ИФА, антитела согласно настоящему изобретению иммобилизованы на выбранной поверхности, обладающей аффинностью к белку, такой как лунка в полистирольном микротитровальном планшете. Затем в лунки добавляют тестируемую композицию, предположительно содержащую MUC1. После связывания и промывки для удаления не связавшихся специфично иммунных комплексов может быть обнаружен связанный антиген. Детектирование может быть достигнуто при добавлении другого антитела против MUC1-С, которое соединено с детектируемой меткой. Данный тип ИФА представляет собой простой "сэндвич-ИФА". Детектирование также может быть достигнуто при добавлении второго антитела против MUC1-С с последующим добавлением третьего антитела, обладающего аффинностью связывания в отношении второго антитела, при этом третье антитело связывается с детектируемой меткой.

В еще одном иллюстративном ИФА образцы, предположительно содержащие антиген MUC1, иммобилизируют на поверхности лунки, а затем подвергают контакту с антителом против MUC1-С. После связывания и промывания для удаления не связавшихся специфично иммунных комплексов детектируют связанные антитела против MUC1-С. Когда исходные антитела против MUC1-С соединены с детектируемой меткой, иммунные комплексы можно детектировать напрямую. Опять же, иммунные комплексы могут быть обнаружены при использовании второго антитела, обладающего аффинностью связывания по отношению к первому антителу против MUC1-С, при этом второе антитело связано с детектируемой меткой.

Независимо от используемого формата, методы ИФА имеют некоторые общие признаки, такие как покрытие, инкубирование и связывание, промывка для удаления не связавшихся молекул и обнаружение связанных иммунных комплексов. Они описаны ниже.

При покрытии планшета антигеном или антителом лунки планшета обычно инкубируют с раствором антигена или антитела либо в течение ночи, либо в течение некоторого периода времени. Затем лунки планшета промывают для удаления не полностью адсорбированного материала. Любые оставшиеся доступные поверхности лунок затем "покрывают" неспецифическим белком, который является антигенно нейтральным по отношению к тестируемым антисывороткам. К таким белкам относятся бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин или растворы сухого молока. Покрытие позволяет блокировать сайты неспецифической адсорбции на иммобилизующей поверхности и, таким образом, снижает фоновый сигнал, вызванный неспецифическим связыванием антисывороток на поверхности.

В ИФА, вероятно, более часто используются способы вторичного или третичного детектирования, а не прямая процедура. Таким образом, после связывания белка или антитела с лункой, покрытия нереактивным материалом для снижения фона и промывки

для удаления несвязавшегося материала, иммобилизующую поверхность подвергают контакту с тестируемым биологическим образцом в условиях, эффективных для образования иммунного комплекса (антигена/антитела). Затем для детектирования иммунного комплекса требуется меченый вторичный связывающий лиганд или антитело и вторичный связывающий лиганд или антитело в сочетании с меченым третичным антителом или третьим связывающим лигандом.

Фраза "в условиях, эффективных для образования иммунного комплекса (антигена/антитела)" означает, что условия предпочтительно включают разведение антигенов и/или антител растворами, такими как BSA, бычий гамма-глобулин (BGG) или фосфатно-солевой буфер (PBS)/Tween. Такие добавляемые вещества также способствуют снижению неспецифического фона.

"Подходящие" условия также означают, что инкубирование проводят при температуре или в течение периода времени, достаточных для обеспечения эффективного связывания. Стадии инкубирования обычно длятся от 1 до 2-4 часов или около этого, при температурах предпочтительно порядка от 25°C до 27°C, или могут длиться в течение ночи при температуре приблизительно 4°C.

После всех стадий инкубирования в ИФА поверхность контакта промывают для удаления материала, не связавшегося в комплекс. Предпочтительная процедура промывки включает промывку раствором, таким как PBS/Tween, или боратым буфером. После образования специфических иммунных комплексов между тестируемым образцом и первоначально связавшимся материалом и последующей промывки можно определить присутствие даже очень малых количеств иммунных комплексов.

Для обеспечения средств детектирования, второе или третье антитело будет иметь ассоциированную метку, позволяющую проводить детектирование. Предпочтительно это - фермент, вызывающий проявление окраски при инкубировании с подходящим хромогенным субстратом. Так, например, желательно проводить контакт или инкубировать первый и второй иммунные комплексы с антителами, конъюгированными с уреазой, глюкозооксидазой, щелочной фосфатазой или пероксидазой, в течение периода времени и при условиях, которые обеспечивают проявление при последующем образовании иммунных комплексов (например, инкубирование в течение 2 часов при комнатной температуре в растворе, содержащем PBS, таком как PBS-Tween).

После инкубирования с меченым антителом и последующей промывки для удаления несвязавшегося материала количество метки определяют количественно, например, при инкубировании с хромогенным субстратом, таким как мочевиная, бромкрезоловый пурпурный или 2,2'-азино-ди-(3-этил-бензтиазолин-6-сульфоная кислота (ABTS), или H₂O₂ в случае пероксидазы в качестве ферментной метки. Затем производят количественное определение путем измерения степени окрашивания, например, при использовании спектрофотометра видимой области спектра.

В. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг (альтернативно называемый белковый иммуоблот) - это

аналитический метод, используемый для определения специфических белков в заданном образце тканевого гомогената или экстракта. На первом этапе используют гель-электрофорез для разделения нативных или денатурированных белков по длине полипептида (в денатурирующих условиях) или по трехмерной структуре белка (в нативных/неденатурирующих условиях). Затем белки переносят на мембрану (обычно из нитроцеллюлозы или PVDF), где их метят (детектируют) с использованием антител, специфичных к белку-мишени.

Образцы могут быть получены из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев твердые ткани сначала разрушают механически с использованием блендера (для образцов больших объемов), с использованием гомогенизатора (меньшие объемы) или при обработке ультразвуком. Клетки также могут быть разрушены при использовании одного из вышеперечисленных механических способов. Впрочем, следует отметить, что бактерии, вирусы или образцы из окружающей среды могут быть источником белка, поэтому Вестерн-блоттинг не ограничивается только клеточными исследованиями. Различные детергенты, соли и буферы могут использоваться для улучшения лизиса клеток и растворения белков. Для предотвращения расщепления образцов содержащимися в них ферментами часто добавляют ингибиторы протеаз и фосфатаз. Подготовку тканей часто проводят при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка.

Белки в образце разделяют при помощи гель-электрофореза. Разделение белков можно осуществлять по изоэлектрической точке (pI), молекулярной массе, электрическому заряду или комбинации этих факторов. Характер разделения зависит от обработки образца и природы геля. Это очень удобный способ определения белка. Также можно использовать двумерный (2-D) гель, в котором разделение белков из одного образца производят в двух направлениях. Белки разделяют в соответствии с изоэлектрической точкой (pI, при котором они имеют нейтральный суммарный заряд) в первом направлении и в соответствии с их молекулярной массой во втором направлении.

Чтобы сделать белки доступными для детектирования антителами, их перемещают из геля на мембрану из нитроцеллюлозы или поливинилидендифторида (ПВДФ). Мембрану накладывают поверх геля, и поверх нее кладут стопку фильтровальной бумаги. Всю стопку помещают в буферный раствор, который под действием капиллярных сил движется вверх по бумаге, унося за собой белки. Другой метод переноса белков называется электроблоттингом и использует электрический ток для переноса белков из геля на мембрану из ПВДФ или нитроцеллюлозы. Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения, которое они имели в геле. В результате этого процесса блоттинга (от англ. blotting - промакивание) белки становятся доступными для детектирования на тонком поверхностном слое мембраны (см. ниже). Оба типа мембран используют из-за их свойств неспецифичного связывания белков (т.е. они одинаково хорошо связывают все белки). Связывание с белком основано на гидрофобных взаимодействиях, а также на электростатических взаимодействиях между мембраной и

белком. Мембраны из нитроцеллюлозы дешевле, чем ПВДФ, но гораздо более хрупкие и плохо выдерживают повторное мечение белков. Единообразие и общую эффективность переноса белка из геля на мембрану можно проверять при окрашивании мембраны красителями Coomassie blue или Ponceau S. После переноса белки детектируют при использовании меченых первичных антител или немеченых первичных антител с последующим непрямым детектированием с использованием меченого белка А или вторично меченых антител, связывающихся с Fc-областью первичных антител.

С. Иммуногистохимия

Антитела также можно использовать в сочетании со свежемороженными и/или фиксированными в формалине блоками тканей, залитыми в парафин, подготовленными для исследования с помощью иммуногистохимии (ИГХ). Метод приготовления блоков ткани из таких измельченных образцов успешно использовался в предыдущих исследованиях ИГХ различных прогностических факторов и хорошо известен специалистам в данной области (Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990).

Вкратце, замороженные срезы можно приготовить путем регидратации 50 мг замороженной "измельченной" ткани при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (PBS) в небольших пластиковых капсулах; осаждение частиц центрифугированием; ресуспендирование их в вязкой среде для заливки (ОСТ); переворачивание капсулы и/или повторное осаждение центрифугированием; мгновенное замораживание в изопентане -70°C ; разрез пластиковой капсулы и/или удаление замороженного столбика ткани; закрепление столбика ткани в держателе микротомакриостата; и/или вырезание из капсулы 25-50 последовательных срезов. В альтернативе образцы цельной замороженной ткани могут использоваться для получения последовательных срезов.

Перманентные срезы можно приготовить аналогичным методом, включающим регидратацию 50 мг образца в пластиковой микроцентрифужной пробирке; центрифугирование; ресуспендирование с фиксацией в 10% формалине в течение 4 часов; промывку/центрифугирование; ресуспендирование в теплом 2,5% агаре; центрифугирование; охлаждение в воде со льдом для затвердевания агара; извлечение блока ткани/агара из пробирки; пропитку и/или заливку блока парафином; и/или нарезку до 50 последовательных перманентных срезов. Опять же, образцы цельной ткани могут быть заменены.

D. Наборы для иммуноанализа

В других вариантах осуществления присутствуют наборы для иммуноанализа для применения с описанными выше способами иммуноанализа. Таким образом, наборы для иммуноанализа будут включать, в подходящем контейнере, первое антитело, которое связывается с антигеном MUC1, и, необязательно, реагент для иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления антитело MUC1-C может быть предварительно связано с твердой подложкой, такой как матрица колонки и/или лунка

микротитровального планшета. Реагенты для иммуноанализа в наборе могут иметь любую из множества форм, включая детектируемые метки, которые ассоциированы или соединены с конкретным антителом. Также предусмотрены детектируемые метки, которые ассоциированы или соединены с вторичным связывающим лигандом. Примерами вторичных лигандов являются такие вторичные антитела, которые обладают аффинностью связывания в отношении первого антитела.

Дополнительные реагенты для иммуноанализа, подходящие для применения в настоящих наборах, включают двухкомпонентный реагент, который включает вторичное антитело, обладающее аффинностью связывания в отношении первого антитела, вместе с третьим антителом, обладающим аффинностью связывания со вторым антителом, при этом третье антитело соединено с детектируемой меткой. Как отмечено выше, в уровне техники известен ряд иллюстративных меток, и все такие метки могут использоваться в отношении вариантов осуществления, обсуждаемых в настоящем документе.

Наборы могут дополнительно включать подходящую, поделенную на аликвоты композицию антигена MUC1, меченого или немеченого, которую можно использовать для получения стандартной кривой для анализа детектирования. Наборы могут содержать конъюгаты антитела-метки либо в полностью конъюгированной форме, либо в виде промежуточных соединений, либо в виде отдельных молекул, которые пользователю набора потребуется конъюгировать. Компоненты наборов могут быть упакованы как в водной среде, так и в лиофилизированной форме.

Контейнерные средства наборов, как правило, будут включать по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнерные средства, в которые может быть помещено антитело или, что предпочтительнее, соответствующим образом поделено на аликвоты. Наборы также будут включать приспособления для хранения антител, антигенов и любых других контейнеров с реагентами в ограниченном пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные методом литья под давлением или выдувным формованием, в которые помещены требуемые флаконы.

VI. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления. Для специалистов в данной области будет очевидным, что способы, раскрытые в примерах, которые приведены далее, представляют собой методики, разработанные авторами изобретения, которые хорошо работают при практической реализации вариантов осуществления, и, таким образом, могут рассматриваться как представляющие предпочтительные варианты их практического применения. Тем не менее, специалисты в данной области техники, с учетом настоящего изобретения, должны понимать, что в конкретные раскрытые варианты осуществления могут быть внесены различные изменения, и при этом все же будет получен подобный или аналогичный результат, без отступления от сущности и объема изобретения.

ПРИМЕР 1 - МЕТОДЫ

Метод секвенирования. Суммарную РНК выделяли из клеток гибридомы в соответствии с техническим руководством к реагенту TRIzol®. Затем суммарную РНК подвергали обратной транскрипции с получение кДНК при использовании либо изотип-специфичных антисмысловых праймеров, либо универсальных праймеров, следуя техническому руководству к набору для синтеза 1-й цепи кДНК PrimeScript™. Фрагменты тяжелой и легкой цепи антител амплифицировали в соответствии со стандартной методикой (SOP) быстрой амплификации концов кДНК (RACE) GenScript. Амплифицированные фрагменты антител клонировали в стандартный клонирующий вектор по отдельности. ПЦР колоний проводили для скрининга клонов со вставками правильного размера. Была получена консенсусная последовательность.

Материалы и оборудование для гуманизации. Вектор экспрессии рТТ5 и клетка НЕК293-6Е (производства GenScript); CO₂-инкубатор с температурой 37°C (Thermo Scientific, модель 3951); бокс биологической безопасности (Thermo Scientific, модель 1384); орбитальный шейкер (Thermo Scientific, модель 416); полиэтиленимин (Polysciences, номер по кат. 23966); среда FreeStyle 293 (Life Technologies, номер по кат. 12338-018); TN1 (Organotechnie, номер по кат. 19553); качалочная колба объемом 125 мл (Corning, номер по кат. 430421); качалочная колба объемом 500 мл (Corning, номер по кат. 421145); смола с белком А (GenScript, номер по кат. L00210); буфер для связывания: 0,15 М NaCl, 20 мМ Na₂HPO₄, pH 7,0; элюирующий буфер: 0,1 М глицин-HCl, pH 3,2; нейтрализующий буфер: 1 М Tris-HCl, pH 9,0; Biacore T200 (GE Healthcare); сенсорный чип серии S CM5 (GE Healthcare, номер по кат.: BR-1005-30); HBS-EP: 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% Tween 20, pH 7,4; захватывающее антитело: специфичное антитело против Fc-гамма человека (Jackson ImmunoResearch, номер по кат. 109-005; NHS: 100 мМ N-гидроксисукцинимид в H₂O; EDC: 400 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в H₂O; Этаноламин: 1М этаноламина гидрохлорид, доведенный до pH 8,5 с использованием NaOH; 10 мМ ацетат натрия, pH 4,5; 50 мМ HCl; покрывающий буфер: 0,05 М NaHCO₃, pH 9,6; блокирующий буфер: PBS с 5% обезжиренным молоком; тетраметилбензидин (TMB, GenScript); 1М HCl (GenScript); линия клеток HCT116/MUC1 (U0920DE100-A); Образец: очищенное антитело (разведенное с 300 нМ, 3*разведение, 10 разведение); Изотипический контроль: человеческий IgG (разведенный с 300 нМ, 3*разведение, 10 разведение); Вторичное антитело: козье антитело против человеческого IgG(H+L) iFluor 647 (3 мкг/мл).

Гуманизация антител путем пересадки CDR: выбор акцепторных каркасных последовательностей. Поиск последовательностей переменных доменов исходного антитела проводили в базе данных зародышевых линий человека с использованием NCBI Ig-Blast. Было выбрано пять различных акцепторных последовательностей человека (т.е. переменных доменов человека с высокой степенью гомологии с исходным антителом) для каждой тяжелой цепи и легкой цепи. CDR-области акцепторных последовательностей человека были заменены соответствующими мышинными аналогами, в результате чего были получены гуманизированные последовательности переменных доменов.

Гуманизированные вариабельные домены легких цепей были обозначены VL1, VL2, VL3, VL4 и VL5. Аналогично, гуманизированные вариабельные домены тяжелых цепей были обозначены VH1, VH2, VH3, VH4 и VH5. Последовательности гуманизированных легких цепей показаны в Приложении I.

Подтверждение связывания химерного антитела. Аффинность связывания антитела с Ag MUC1-ECD определяли при использовании биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) Biacore T200 (GE Healthcare). Антитело было иммобилизовано на сенсорном чипе методом Fc захвата. В качестве анализа использовали антиген MUC1-ECD. Данные значений констант скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) были получены при использовании программы для оценки данных Biacore T200. Кажущиеся равновесные константы диссоциации (KD) вычисляли по отношению k_d к k_a .

Конструирование и продукция гуманизированных антител. Последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи гуманизированного IgG, синтезировали и встраивали в вектор pTT5 для конструирования экспрессионных плазмид полноразмерных IgG. Двадцать пять гуманизированных антител экспрессировали в культуре клеток НЕК 293 и очищали. Подтверждение связывания и ранжирование по аффинности проводили с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при использовании Biacore T200.

Ранжирование гуманизированных антител по аффинности. Специфичное антитело против Fc-гамма человека иммобилизовали на сенсорном чипе при использовании метода связывания по аминокислотной группе. Двадцать пять гуманизированных антител, секретированных в среду культивирования, плюс исходное антитело вводили и по отдельности захватывали антителом против Fc человека по Fc (фаза захвата). После уравнивания вводили Ag MUC1-ECD в течение 200 секунд (фаза ассоциации) с последующим введением рабочего буфера в течение 600 с (фаза диссоциации). Ответы с референсной проточной кюветой (проточная кювета 1) вычитали из ответов проточных кювет с гуманизированными антителами во время каждого цикла. Поверхность регенерировали перед вводом других гуманизированных антител. Процесс повторяли до тех пор, пока не были проанализированы все антитела. Показатели диссоциации гуманизированных антител были получены путем локальной аппроксимации экспериментальных данных к модели взаимодействия 1:1 при использовании программного обеспечения для оценки данных Biacore T200. Антитела ранжировали по константе скорости диссоциации (скорости диссоциации, k_d). Были отобраны связывающие молекулы, которые взаимодействуют с Ag MUC1-ECD с аффинностью, аналогичной аффинности исходного антитела.

Получение и измерение аффинности отобранных антител. Для экспрессии в культуре клеток НЕК293 были отобраны 7 лучших связывающих молекул. Рекомбинантные IgG, секретированные в среду, очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. Аффинности очищенных антител, связывающихся с MUC1-

ECD, определяли при использовании биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) Biacore T200. Антитела были иммобилизованы на сенсорном чипе с помощью метода связывания по аминок группам. В качестве анализа использовали антиген MUC1-ECD. Константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) были получены с использованием программного обеспечения для оценки данных Biacore T200. Константы равновесия (KD) вычисляли по соотношению k_d к k_a .

Титрование гуманизированных антител с помощью FACS. Для ранжирования по аффинности гуманизированных антител к клеткам HCT116/MUC1 (линии клеток рака толстой кишки человека, модифицированной для экспрессии MUC1) очищенные антитела подвергали титрованию с помощью FACS. Вкратце, клетки HCT116/MUC1 культивировали и собирали центрифугированием. Примерно $2,5 \times 10^5$ клеток на лунку два раза промывали PBS и инкубировали в 200 мкл серийных разведений антител в течение 30 мин при 4°C . После промывки PBS вторичное антитело (3 мкг козьего антитела против человеческого IgG(H+L) I, конъюгированного с Fluor 647) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C . После промывки PBS клетки анализировали на связывание (EC_{50}) при использовании FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA) и программы Flowjo.

ПРИМЕР 2 - РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и измерение аффинности отобранных антител. Экспрессировали и очищали семь отобранных гуманизированных антител. В обычных условиях наблюдали осаждение небольшого количества белка. При оценке с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ чистота гуманизированных IgG во всех случаях превышала 90%. Значения выхода семи очищенных IgG перечислены в Таблице 6.

Данные по связыванию каждого антитела обрабатывали и аппроксимировали к модели взаимодействия 1:1 с использованием программы для оценки данных Biacore T200. Все экспериментальные данные могут быть хорошо приспособлены к модели (ФИГ. 4). Как перечислено в Таблице 7, семь гуманизированных антител сохраняли антигенсвязывающие аффинности, сопоставимые с исходным химерным антителом.

Титрование гуманизированных антител с помощью FACS. Каждое из 7 антител титровали на способность связывания с клетками HCT116/MUC1 при различных концентрациях, результаты приведены в Таблице 8 и представлены графически на ФИГ. 5.

Выводы. В этом проекте исходное антитело было успешно гуманизировано. Пять гуманизированных тяжелых цепей и пять гуманизированных легких цепей были сконструированы, синтезированы и встроены в вектор экспрессии. Гуманизированные антитела экспрессировали, и затем использовали для теста ранжирования по аффинности. Наконец, три гуманизированных антитела с аффинностью связывания, аналогичной химерному антителу, очищали для доставки.

Таблица 6 - Чистота и выход очищенных IgG

Образец	Конц. (мг/мл)	Количество (мг)	Чистота
VH1+VH3	0,570	1,25	97%

VH1+VH4	1,342	2,95	98%
VH2+VH3	0,711	1,56	98%
VH5+VH1	1,243	2,73	95%
VH5+VH2	0,374	0,82	90%
VH5+VH3	0,414	0,91	91%
VH5+VH4	0,267	0,59	99%

Таблица 7 - Измерение аффинности химерных и гуманизированных антител

Лиганд	Аналит	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
Химерный IgG		5,93E+05	3,85E-04	6,49E-10	31,5	0,0218
VH1+VH3		5,45E+05	8,44E-04	1,55E-09	23,21	0,0103
VH1+VH4		4,39E+05	1,18E-03	2,68E-09	41,99	0,0177
VH2+VH3	MUC1-ECD	4,36E+05	1,20E-03	2,75E-09	47,31	0,0238
VH5+VH1		4,55E+05	1,25E-03	2,75E-09	35,67	0,0153
VH5+VH2		4,04E+05	1,45E-03	3,60E-09	25,87	0,0118
VH5+VH3		4,25E+05	2,22E-03	5,23E-09	37,14	0,0287
VH5+VH4		4,42E+05	3,15E-03	7,13E-09	42,92	0,0638

Таблица 8. Анализ связывания химерных и гуманизированных антител при титровании с помощью FACS

Конц. (нМ)	Log (нМ)	#3	#4	#8	#21	#22	#23	#24	химерный	IgG человека
300	2,477121	42,00	53,90	44,10	52,10	46,30	56,70	68,30	49,40	8,68
100	2,000000	41,70	56,20	43,80	56,50	48,90	56,30	68,60	49,20	6,06
33,33333	1,522879	41,00	57,80	43,00	55,70	48,10	56,00	67,50	50,20	5,57
11,11111	1,045757	20,20	32,30	21,50	44,00	33,40	30,40	36,50	41,70	5,35
3,703704	0,568636	10,40	16,60	13,90	20,10	17,30	15,50	19,80	19,80	5,53
1,234568	0,091515	7,09	7,61	10,60	12,20	11,80	11,40	13,20	13,30	5,74
0,411523	-0,385610	6,22	10,10	6,48	9,70	9,71	10,60	11,20	10,60	6,12
0,137174	-0,862730	9,47	5,50	9,04	6,80	9,20	10,10	10,40	10,20	9,22
0,045725	-1,339850	8,96	5,99	5,46	10,00	6,76	10,10	9,81	9,83	6,46
0,015242	-1,816970	5,76	5,73	8,96	4,98	5,88	9,64	9,62	9,42	5,70
	EC50	13,23	9,804	13,31	6,162	7,689	12,17	11,73	6,084	~0,2919

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть изготовлены и выполнены без излишних экспериментов с учетом настоящего описания. Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны посредством предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет очевидно, что в композиции и способы, в стадии или последовательность стадий согласно изобретению могут быть внесены изменения без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. В частности, будет очевидно, что некоторые средства, которые являются химически и физиологически родственными, могут быть заменены средствами, описанными в настоящем документе, и при этом будут достигнуты такие же или аналогичные результаты. Считается, что все такие подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области, входят в рамки сущности, объема и концепции изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

VII. Источники

Следующие источники, в такой степени, в какой они предоставляют иллюстративные процедурные или другие подробности, дополнительные по отношению к представленному в настоящем документе, специально включены в настоящем документе посредством отсылки.

Патент США 3,817,837
Патент США 3,850,752
Патент США 3,939,350
Патент США 3,996,345
Патент США 4,196,265
Патент США 4,275,149
Патент США 4,277,437
Патент США 4,366,241
Патент США 4,472,509
Патент США 4,554,101
Патент США 4,680,338
Патент США 4,683,202
Патент США 4,684,611
Патент США 4,816,567
Патент США 4,867,973
Патент США 4,879,236
Патент США 4,938,948
Патент США 4,952,500
Патент США 5,021,236
Патент США 5,141,648
Патент США 5,196,066
Патент США 5,217,879
Патент США 5,302,523

Патент США 5,322,783
Патент США 5,384,253
Патент США 5,464,765
Патент США 5,506,138
Патент США 5,538,877
Патент США 5,538,880
Патент США 5,550,318
Патент США 5,563,055
Патент США 5,563,250
Патент США 5,565,332
Патент США 5,580,859
Патент США 5,589,466
Патент США 5,610,042
Патент США 5,656,610
Патент США 5,670,488
Патент США 5,702,932
Патент США 5,736,524
Патент США 5,739,018
Патент США 5,780,448
Патент США 5,789,215
Патент США 5,824,544
Патент США 5,830,725
Патент США 5,849,304
Патент США 5,851,826
Патент США 5,856,456
Патент США 5,858,744
Патент США 5,871,982
Патент США 5,871,983
Патент США 5,871,986
Патент США 5,879,934
Патент США 5,880,270
Патент США 5,888,502
Патент США 5,925,565
Патент США 5,928,906
Патент США 5,932,210
Патент США 5,935,819
Патент США 5,945,100
Патент США 5,955,331
Патент США 5,981,274
Патент США 5,994,136

- Патент США 5,994,624
 Патент США 6,013,516
 Заявка на патент США 12/789,127
 Заявка на патент США 13/026,858
 Заявка на патент США 13/045,033
 "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Abbondanzo et al., *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.
 Allred et al., *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.
 Almendro et al., *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.
 Amado and Chen, *Science*, 285(5428):674-676, 1999.
 Angel et al., *Cell*, 49:729, 1987a.
 Angel et al., *Cell*, 49:729, 1987b.
 Armentano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(16):6141-6145, 1990.
 Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
 Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
 Atherton et al., *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- Baldus et al., *Clin. Cancer Res.*, 10(8):2790-2796, 2004.
 Banerji et al., *Cell*, 27:299, 1981.
 Banerji et al., *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
 Bates, *Mol. Biotechnol.*, 2(2):135-145, 1994.
 Batra et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 21(2):238-245, 1999.
 Battraw and Hall, *Theor. App. Genet.*, 82(2):161-168, 1991.
 Beidler et al., *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.
 Berkhout et al., *Cell*, 59:273-282, 1989.
 Bett et al., *J. Virology*, 67(10):5911-5921, 1993.
 Bhattacharjee et al., *J. Plant Bioch. Biotech.*, 6(2):69-73, 1997.
 Bilbao et al., *FASEB J.*, 11(8):624-634, 1997.
 Blackwell et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 125(8):856-863, 1999.
 Blonar et al., *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
 Blomer et al., *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.
 Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
 Boshart et al., *Cell*, 41:521, 1985.
 Bosze et al., *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
 Braddock et al., *Cell*, 58:269, 1989.
 Brown et al., *J. Immunol. Meth.*, 12:130(1), :111-121, 1990.
 Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
 Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.

Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.

Campo et al., *Nature*, 303:77, 1983.

Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

Caplen et al., *Gene Ther.*, 6(3):454-459, 1999.

Carbonelli et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.

Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(6):2988-2993, 1999.

Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.

Celander et al., *J. Virology*, 62:1314, 1988.

Chandler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.

Chang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.

Chatterjee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.

Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.

Chillon et al., *J. Virol.*, 73(3):2537-2540, 1999.

Choi et al., *J. Mol. Biol.*, 262(2):151-167, 1996.

Christou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(12):3962-3966, 1987.

Clay et al., *J. Immunol.*, 162:1749, 1999.

Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.

Coffey et al., *Science*, 282(5392):1332-1334, 1998.

Cohen et al., *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.

Costa et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:81-90, 1988.

Cripe et al., *EMBO J.*, 6:3745, 1987.

Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376-1380, 1989.

D'Halluin et al., *Plant Cell*, 4(12):1495-1505, 1992.

Dandolo et al., *J. Virology*, 47:55-64, 1983.

De Jager et al., *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.

DeLuca et al., *J. Virol.*, 56(2):558-570, 1985.

Derby et al., *Hear Res*, 134(1-2):1-8, 1999.

Deschamps et al., *Science*, 230:1174-1177, 1985.

Dholakia et al., *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.

Dorai et al., *Int. J. Cancer*, 82(6):846-52, 1999.

Duraisamy et al., *Gene*, 373:28-34, 2006.

Edbrooke et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908-1916, 1989.

Edlund et al., *Science*, 230:912-916, 1985.

Engel and Kohn, *Front Biosci*, 4:e26-33, 1999.

Заявка EP 125,023

Заявка EP 171,496

- Заявка EP 173,494
Заявка EP 184,187
EPO 0273085
Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
Feldman et al., Cardiovasc. Res., 32(2):194-207, 1996.
Feldman et al., Semin. Interv. Cardiol., 1(3):203-208, 1996.
Feng and Holland, Nature, 334:6178, 1988.
Feng et al., Nat. Biotechnol., 15(9):866-870, 1997.
Firak and Subramanian, Mol. Cell. Biol., 6:3667, 1986.
Fisher et al., Hum. Gene Ther., 7(17):2079-2087, 1996.
Foeking and Hofstetter, Gene, 45(1):101-105, 1986.
Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
Fujita et al., Cell, 49:357, 1987.
Fujiwara and Tanaka, Nippon Geka Gakkai Zasshi, 99(7):463-468, 1998.
Garoff and Li, Curr. Opin. Biotechnol., 9(5):464-469, 1998.
Garrido et al., J. Neurovirol., 5(3):280-288, 1999.
Gefter et al., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.
Gendler et al., J. Biol. Chem., 263:12820-12823, 1988.
Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
Gillies et al., Cell, 33:717, 1983.
Gloss et al., EMBO J., 6:3735, 1987.
Gnant et al., Cancer Res., 59(14):3396-403, 1999.
Gnant et al., J. Natl. Cancer Inst., 91(20):1744-1750, 1999.
Godbout et al., Mol. Cell. Biol., 8:1169, 1988.
Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
Goodbourn and Maniatis, Cell, 41(2):509-520, 1985.
Goodbourn et al., Cell, 45:601, 1986.
Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.
Graham and Prevec, Mol Biotechnol, 3(3):207-220, 1995.
Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
Greene et al., Immunology Today, 10:272, 1989.
Grosschedl and Baltimore, Cell, 41:885, 1985.
Gulbis and Galand, Hum. Pathol. 24(12), 1271-1285, 1993.
Haecker et al., Hum. Gene Ther., 7(15):1907-1914, 1996.
Han et al., J. Infect. Dis., 179:230-233, 1999.
Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
Haslinger and Karin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8572, 1985.
Hauber and Cullen, J. Virology, 62:673, 1988.

- Hayashi et al., *Neurosci. Lett.*, 267(1):37-40, 1999.
- He et al., *Plant Cell Reports*, 14 (2-3):192-196, 1994.
- Hen et al., *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel et al., *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermens and Verhaagen, *Prog. Neurobiol.*, 55(4):399-432, 1998.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hirochika et al., *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook et al., *Virology*, 157:211, 1987.
- Holzer et al. *Virology*, 253(1):107-114, 1999.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Hou and Lin, *Plant Physiology*, 111:166, 1996.
- Howard et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 880:352-365, 1999.
- Huang et al., *Cell*, 27:245, 1981.
- Huard et al., *Neuromuscul Disord*, 7(5):299-313, 1997.
- Hug et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065-3079, 1988.
- Hwang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Iida et al., *BMC Cancer*. 9: 58, 2009.
- Imagawa et al., *Cell*, 51:251, 1987.
- Imai et al., *Nephrologie*, 19(7):397-402, 1998.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Irie et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9(4):341-349, 1999.
- Jakobovits et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9(8):3393-3399, 1989.
- Johnston et al., *J. Virol.*, 73(6):4991-5000, 1999.
- Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaepler et al., *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka et al., *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka et al., *Nature*, 290:720, 1981.
- Kato et al, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kaufman et al., *Arch. Ophthalmol.*, 117(7):925-928, 1999.
- Kawamoto et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.

- Kay, *Haemophilia*, 4(4):389-392, 1998.
- Khatoun et al., *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- Kiledjian et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- King et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kinlough et al., *J. Biol. Chem.*, 279(51):53071-53077, 2004.
- Kinoshita et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394:205-210, 2010.
- Klamut et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Klimatcheva et al., *Front Biosci*, 4:D481-496, 1999.
- Koch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kohut et al., *Am. J. Physiol.*, 275(6Pt1):L1089-1094, 1998.
- Kooby et al., *FASEB J*, 13(11):1325-34, 1999.
- Kraus et al. *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler et al., *Cell*, 38:483, 1984a.
- Kriegler et al., In: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude et al. eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Krisky et al., *Gene Ther*, 5(11):1517-1530, 1998a.
- Krisky et al., *Gene Ther*, 5(12):1593-1603, 1998b.
- Kuhl et al., *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kunz et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lachmann and Efstathiou, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1(5):622-632, 1999.
- Lareyre et al., *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8283, 1986.
- Laspia et al., *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lazzeri, *Methods Mol. Biol.*, 49:95-106, 1995.
- Lee et al., *Environ. Mol. Mutagen.*, 13(1):54-59, 1989.
- Lee et al., *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Lee et al., *DNA Cell Biol.*, 16(11):1267-1275, 1997.
- Leibowitz et al., *Diabetes*, 48(4):745-753, 1999.
- Lesch, *Biol Psychiatry*, 45(3):247-253, 1999.
- Levenson et al., *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Li et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2:187-193, 2003b.
- Lin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Lundstrom, *J. Recept Signal Transduct. Res.*, 19(1-4):673-686, 1999.
- Luria et al., *EMBO J.*, 6:3307, 1987.

- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Macao et al., *Nat Struct Mol Biol.* 13(1):71-76, 2006.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Marienfeld et al., *Gene Ther.*, 6(6):1101-1113, 1999.
- Mastrangelo et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 65(3):298-305, 1999.
- McNeall et al., *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek et al., *Cell*, 46:203, 1986.
- Miller et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264:11-16, 1993.
- Miyatake et al., *Gene Ther.*, 6:564-572, 1999.
- Moldawer et al., *Shock*, 12(2):83-101, 1999.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau et al., *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Moriuchi et al., *Cancer Res*, 58(24):5731-5737, 1998.
- Morrison et al., *J. Gen. Virol.*, 78(Pt 4):873-878, 1997.
- Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
- Muesing et al., *Cell*, 48:691, 1987.
- Nakamura et al., In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- Naldini et al., *Science*, 272(5259):263-267, 1996.
- Neuberger et al., *Nucleic Acids Res.*, 16(14B):6713-6724, 1988.
- Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(16):9345-9350, 1999.
- Ng et al., *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nomoto et al., *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Omitz et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- Ondek et al., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- O'Shannessy et al., *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259, 14843-14848, 1987.
- Palmiter et al., *Cell*, 29:701, 1982.
- Parks et al., *J. Virol.*, 71(4):3293-8, 1997.
- Заявка PCT PCT/US86/02269
- Заявка PCT WO 86/01533
- Заявка PCT WO 92/17598
- Заявка PCT WO 94/09699
- Заявка PCT WO 95/06128
- Pech et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.

- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Petrof, *Eur Respir J*, 11(2):492-497, 1998.
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pinkert et al., *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Posner et al., *Hybridoma* 6, 611-625, 1987.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Potter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Rabinovitch et al., *Diabetes*, 48(6):1223-1229, 1999.
- Reddy et al., *Virology*, 251(2):414-26, 1998.
- Redondo et al., *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., 33:624-652, 1990.
- Resendez Jr. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131, 1995.
- Rippe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9(5):2224-2227, 1989.
- Rippe, et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Robbins and Ghivizzani, *Pharmacol Ther*, 80(1):35-47, 1998.
- Robbins et al., *Trends Biotechnol.*, 16(1):35-40, 1998.
- Sambrook et al., In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sawai et al. *Mol. Genet. Metab.*, 67(1):36-42, 1999.
- Schaffner et al., *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
- Sherman et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith et al., *Neuron*, 20:1093-1102, 1998.
- Spalholz et al., *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.

- Stewart et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 365:71-74; 1999.
- Stuart et al., *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- Suzuki et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 252(3):686-90, 1998.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takebe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier et al., *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor et al., *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen et al., *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Timiryasova et al., *Int. J. Oncol.*, 14(5):845-854, 1999.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche et al., *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Tronche et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:4759, 1989.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tsukada et al., *Plant Cell Physiol.*, 30(4):599-604, 1989.
- Tsumaki et al., *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-22864, 1998.
- Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Tyndall et al., *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Vanderkwaak et al., *Gynecol Oncol*, 74(2):227-234, 1999.
- Vasseur et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Verhoeven et al., *Science*, 239(4847):1534-1536, 1988.
- Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Wang et al., *Infect. Immun.*, 66:4193-202, 1998.
- Wawrzynczak & Thorpe, *Cancer Treat Res.*, 37:239-51, 1988.
- Weber et al., *Cell*, 36:983, 1984.
- Wei et al., *Cancer Cell*, 7:167-178, 2005.
- Weihl et al., *Neurosurgery*, 44(2):239-252, 1999.
- Wen et al., *J. Biol. Chem.*, 278:38029-38039, 2003.
- White et al. *J. Virol.*, 73(4):2832-2840, 1999.
- Wilson, *J. Clin. Invest.*, 98(11):2435, 1996.
- Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wood et al., *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233(1):221-226, 1997.

- Wu et al., *Cancer Res.*, 58(8): 1605-8, 1998.
- Yamada et al., *Brain Res.*, 833(2):302-307, 1999.
- Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng* 87: 614-622, 2004.
- Yeung et al., *Gene Ther.*, 6(9):1536-1544, 1999.
- Yoon et al., *J. Gastrointest. Surg.*, 3(1):34-48, 1999.
- Yutzey et al. *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zhao-Emonet et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.
- Zheng et al., *J. Gen. Virol.*, 80(Pt 7):1735-1742, 1999.
- Zhou et al., *Nature*, 361(6412):543-547, 1993.
- Zufferey et al., *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875, 1997.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, которые селективно связываются с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD) определенным в SEQ ID NO:1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, включающие переменную область тяжелой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19, и переменную область легкой цепи, обладающую 80% или большей гомологией с SEQ ID NO: 16, 18, или 20/25/26, соответственно.

3. Антитело или его фрагмент по п.1, включающие переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27, и переменную область легкой цепи, кодируемую нуклеиновой кислотой, обладающей 70% или большей гомологией с SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30, соответственно.

4. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело является одноцепочечным антителом, однодоменным антителом, биспецифичным антителом или химерным антителом.

5. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанным фрагментом антитела является Fab-фрагмент.

6. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело является рекомбинантным антителом, обладающим специфичностью в отношении MUC1-C/ECD и определенного поверхностного антигена раковой клетки.

7. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанным антителом является мышинное антитело.

8. Антитело или его фрагмент по п.7, где указанным мышинным антителом является IgG.

9. Антитело или его фрагмент по п.1, где антителом является гуманизированное антитело.

10. Антитело или его фрагмент по п.9, где указанным гуманизированным антителом является IgG.

11. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело или его фрагмент дополнительно включают метку.

12. Антитело или его фрагмент по п.11, где указанная метка является пептидной меткой, ферментом, магнитной частицей, хромофором, флуоресцентной молекулой, хемилюминесцентной молекулой или красителем.

13. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело дополнительно включает противоопухолевое средство, соединенное с ним.

14. Антитело или его фрагмент по п.13, где указанное противоопухолевое средство

соединено с указанным антителом или его фрагментом через фотолabileный линкер.

15. Антитело или его фрагмент по п.13, где указанное противоопухолевое средство соединено с указанным антителом или его фрагментом через ферментативно расщепляемый линкер.

16. Антитело или его фрагмент по п.13, где указанное противоопухолевое средство является токсином, радиоизотопом, цитокином или ферментом.

17. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанные тяжелые и легкие цепи обладают 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26 соответственно.

18. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанные тяжелые и легкие цепи кодируются нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30 соответственно.

19. Антитело или его фрагмент по п.1, где указанное антитело или его фрагмент конъюгированы с наночастицей или липосомой.

20. Антитело или его фрагмент по п.1, где индукция гибели клетки включает антителозависимую клеточную цитотоксичность или комплемент-опосредованную цитотоксичность.

21. Способ лечения рака, включающий контакт MUC1-положительной раковой клетки у субъекта с антителом или его фрагментом по пп.1-20.

22. Способ по п.21, где указанная MUC1-положительная раковая клетка является клеткой солидной опухоли.

23. Способ по п.22, где указанная клетка солидной опухоли является клеткой рака легкого, клеткой рака головного мозга, клеткой рака головы и шеи, клеткой рака молочной железы, клеткой рака кожи, клеткой рака печени (такого как гепатоцеллюлярная карцинома), клеткой рака поджелудочной железы, клеткой рака желудка, клеткой рака толстой кишки, клеткой рака прямой кишки, клеткой рака матки, клеткой рака шейки матки, клеткой рака яичника, клеткой рака яичка, клеткой рака кожи или клеткой рака пищевода.

24. Способ по п.21, где указанная MUC1-положительная раковая клетка является клеткой лейкоза или клеткой миеломы, такой как клетка острого миелоидного лейкоза, клетка хронического миелогенного лейкоза или клетка множественной миеломы.

25. Способ по п.21, где указанная раковая клетка является клеткой рака шейки матки, вызванного вирусом папилломы человека, или клеткой рака желудка, вызванного *H. pylori*.

26. Способ по п.21, дополнительно включающий контакт указанной MUC1-положительной раковой клетки со вторым противоопухолевым средством или терапией.

27. Способ по п.26, где указанным вторым противоопухолевым средством или терапией являются химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, гормональная терапия или токсинотерапия.

28. Способ по п.26, где указанное второе противоопухолевое средство или терапия

ингибируют внутриклеточную функцию MUC1.

29. Способ по п.26, где указанное второе противоопухолевое средство или терапию применяют одновременно с указанным первым средством.

30. Способ по п.26, где указанное второе противоопухолевое средство или терапию применяют до и/или после указанного первого средства.

31. Способ по п.21, где указанная MUC1-положительная раковая клетка является метастатической раковой клеткой, раковой клеткой с множественной лекарственной резистентностью или рецидивировавшей раковой клеткой.

32. Способ по п.21, где указанное антитело является одноцепочечным антителом.

33. Способ по п.21, где указанное антитело является однодоменным антителом.

34. Способ по п.21, где указанное антитело является химерным антителом.

35. Способ по п.21, где указанным фрагментом антитела является Fab-фрагмент.

36. Способ по п.21, где указанное антитело является рекомбинантным антителом, обладающим специфичностью в отношении MUC1-C/ECD и определенного поверхностного антигена раковой клетки.

37. Способ диагностики MUC1-положительного рака у субъекта, включающий контакт субъекта или образца, содержащего клетку субъекта, с антителом или его фрагментом по пп.1-20.

38. Способ по п.37, где указанный MUC1-положительный рак является солидной злокачественной опухолью.

39. Способ по п.38, где указанная солидная злокачественная опухоль является раком легкого, раком головного мозга, раком головы и шеи, раком молочной железы, раком кожи, раком печени, раком поджелудочной железы, раком желудка, раком толстой кишки, раком прямой кишки, раком матки, раком шейки матки, раком яичника, раком яичка, раком кожи или раком пищевода.

40. Способ по п.37, где указанный MUC1-положительный рак является лейкозом или миеломой, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома.

41. Способ по п.37, где указанный MUC1-положительный рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному или рак шейки матки, вызванный вирусом папилломы человека.

42. Способ по п.37, дополнительно включающий введение указанному субъекту противоопухолевого средства или терапии.

43. Способ по п.42, где указанное противоопухолевое средство или терапия являются химиотерапией, лучевой терапией, иммунотерапией, гормональной терапией или токсинотерапией.

44. Способ по п.37, где указанная MUC1-положительная раковая клетка представляет собой метастатический рак, рак с множественной лекарственной резистентностью или рецидивирующий рак.

45. Способ по п.37, где указанный содержащий клетку образец является образцом

твердой ткани, таким как биопсия.

46. Способ по п.37, где указанный содержащий клетку образец является жидким образцом, таким как моча, сперма, мокрота, слюна, аспират из соска или кровь.

47. Фармацевтический состав, включающий антитело или его фрагмент по пп.1-20 и фармацевтически приемлемый носитель, буфер или разбавитель.

48. Фармацевтический состав по п.47, где указанный состав представляет собой состав вакцины против рака, необязательно дополнительно включающий адъювант.

49. Фармацевтический состав по п.47, где указанный состав представляет собой иммуногистохимический реагент или радиовизуализационное вещество.

50. Фармацевтический состав по пп.47-49, дополнительно включающий дополнительное терапевтическое средство.

51. Слитый белок, включающий:

(i) первое одноцепочечное антитело, которое селективно связывается с MUC1-С/внеклеточным доменом (ECD), определенным в SEQ ID NO:1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14, соответственно; и

(ii) второе одноцепочечное антитело, которое связывается с Т или В-клеткой.

52. Слитый белок по п.51, где указанное второе одноцепочечное антитело связывается с CD3, CD16, PD1, PD-L1, CD33, Her-2, EGFR, CTLA-4, OX40, FcγRI (CD64), FcγRIIIa (CD16A), FcαRI (CD89), CD163, CD68, mAb к CD89.

53. Слитый белок по п.51, где указанный слитый белок дополнительно включает метку или терапевтический фрагмент.

54. Слитый белок по п.51, где указанные тяжелые и легкие цепи обладают 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26 соответственно.

55. Слитый белок по п.51, где указанные тяжелые и легкие цепи кодируются нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30 соответственно.

56. Химерный антигенный рецептор, включающий:

(i) эктодомен, включающий переменную область одноцепочечного антитела, которая селективно связывается с MUC1-С/внеклеточным доменом (MUC1-С/ECD), определенным в SEQ ID NO:1, где указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области SEQ ID NO: 3, 4 и 5 или 6, 7 и 8, и переменную область легкой цепи, включающую CDR1, CDR2 и CDR3 области, включающие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 или 12, 13 и 14 соответственно, с гибкой шарнирной областью, присоединенной на С-конце указанной переменной области одноцепочечного антитела;

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) эндодомен,

где указанный эндодомен включает функцию сигнальной трансдукции, когда указанная вариабельная область одноцепочечного антитела связана с MUC1.

57. Рецептор по п.56, где сказал трансмембранный домен и эндодомен происходят из одной и той же молекулы.

58. Рецептор по п.56, где указанный эндодомен включает домен CD3-дзета или высокоаффинный FcεRI.

59. Рецептор по п.56, где гибкая шарнирная область происходит из CD8α или Ig.

60. Рецептор по п.56, где указанные тяжелые и легкие цепи обладают 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 15, 17 или 19 и SEQ ID NO: 16, 18 или 20/25/26 соответственно.

61. Рецептор по п.56, где указанные тяжелые и легкие цепи кодируются нуклеиновыми кислотами, обладающими 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 21, 23 или 27 и SEQ ID NO: 22, 24 или 28/29/30 соответственно.

62. Клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор по п.56, 60 или 61.

63. Клетка по п.62, где указанный трансмембранный домен и эндодомен происходят из одно и той же молекулы.

64. Клетка по п.62, где указанный эндодомен включает домен CD3-дзета или высокоаффинный FcεRI.

65. Клетка по п.62, где гибкая шарнирная область происходит из CD8α или Ig.

По доверенности

ФИГ.1А

Тяжелая цепь GO-701m: последовательность ДНК (414 пн)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTTTTTGGTAGCAACAGCTACAGATGTCGACTCCCAGGT
CCAАСТGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGAGAAGCTGTCCTGCA
AGGCTTCTGGGCACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAA
GGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAACGGTCTACTTACTACAATGAGAACTT
CAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATATTCAGCTCAGCCTCCATGCAACTCCGCA
GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGTGATGGTGACTACGTCTCGGGC
TTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 21)

Тяжелая цепь GO-701m: аминокислотная последовательность (138 ак)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWSYIILFLVATATDVDSQVQLQQPGAELVKPGASEKLSCKASGHTFTSYWMHWVKQRPQG
GLEWIGEINPSNGRITYNENFKTKATLTVDKYSSASMQLRSLTSEDSAVYYCASDGDYVSG
FAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 15)

Легкая цепь GO-701m: последовательность ДНК (381 пн)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATACTGCTCTGGTTATATGGTGCTGATGGGAA
CATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGA
CCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGGTACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAG
TCTCCTAAACTACTGATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCAATCGCTTCAC
AGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTG
CAGATTATTACTGTGGACAGAGTTACAGCTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAAA (SEQ ID NO: 22)

Легкая цепь GO-701m: аминокислотная последовательность (127 ак)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MESQTLVFIISILLWLYGADGNIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVGTYVSWYQQKPEQ
SPKLLIYGASNRYTGVPNRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYYCGQSYSPWTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO: 16)

ФИГ.1В

Белковая последовательность тяжелой цепи GO-702m

FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAI**GFTFN**YFWIEWVKQRPGHGLEWIGE**ILPGTG**
STNYNEKFKGKAIFTADTSSNTAYMQLRSLTSEDSA VYYCV**RYD**Y**TSSMDY**WGQG
 TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 17)

Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи GO-702m

Caggctccagctgcagcagctctggagctgagctgatgaagcctggggcctcagtgaaaatttc
 ctgcaaggctattggcttcacattcaattacttctggatagagtgggtaaaacagaggcctg
 ggcatggccttgagtgattggagagattttacctggaactggtagtactaactacaatgag
 aagttcaagggcaaggccatattcactgcagatacatcctccaacacagcctacatgcaact
 ccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtgtaagatacactatacctctt
 ctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcacagctctcctca (SEQ ID NO: 23)

Белковая последовательность легкой цепи GO-702m

FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

DIVLTQSPGSLAVSLGQSVTIS**CRASESVQYSGTSLMH**WYQQKPGQPPLLIIY**GASN**
VETGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC**QQNWKVPWT**FGGGTKLEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
 18)

Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи GO-702m

Gacattgtgctcacccaatctccaggttctttggctgtgtctctagggcagagtgctcacat
 ctctctgcagagccagtgaaagtggttcaatattctggcactagtttaatgcactgggatcaac
 agaaaccaggacagccacccaactcctcatctatgggtgcatccaacgtagagactggggtc
 cctgccaggttagtgagcagtggtctgggacagacttcagcctcaacatccatcctgtgga
 ggaggatgatattgcaatgtatttctgtcagcaaaattggaaggttccttgagcgttccggtg
 gaggcaccgaagctggaatAaaa (SEQ ID NO: 24)

ФИГ.1С

Последовательность тяжелой цепи (VH5) GO-702h

Сигнальный пептид-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MGWSWILLFLLSVTAGVHSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFN~~Y~~FWIEWVRQMPGKGLEWMG
EILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY~~Y~~CARYDYTSSMDYWGQGTLTVVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~G~~VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF
EVT~~C~~VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSV~~M~~HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

Последовательность легкой цепи (VL3) GO-702h

Сигнальный пептид-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MGWSWILLFLLSVTAGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGQAPRL
LIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTIS~~S~~LEPEDFAVYYCQQNWKVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
FIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFY~~P~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLS~~P~~VT~~K~~SFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

Последовательность легкой цепи (VL4) GO-702h

Сигнальный пептид-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MGWSWILLFLLSVTAGVHSDIQMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTITCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGKAPK
LLIYGASNVETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS~~S~~LQPEDFATYYCQQNWKVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFY~~P~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLS~~P~~VT~~K~~SFNRGEC (SEQ ID NO: 25)

Последовательность легкой цепи (VL1) GO-702h

Сигнальный пептид-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MGWSWILLFLLSVTAGVHSDIQMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTITCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGKAPK
LLIYGASNVETGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~S~~LQPEDFATYYCQQNWKVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFY~~P~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLS~~P~~VT~~K~~SFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

ФИГ.1D

Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи (VH5) GO-702h

ATGGGGCTGGAGCTGGATCCTGCTGTTCCCTCCTGAGCGTGACAGCAGGAGTGCACAGCGA
 GGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGCCAGTCTCTGAAGATCA
 GCTGCAAGGGCTCCGGCTTACCTTTAACTACTTCTGGATCGAGTGGGTGCGGCAGATGC
 CAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGAGAGATCCTGCCTGGCACCCGGCTCTACAAACTAC
 AATGAGAAGTTTAAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCCGACAAGAGCATCTCCACAGCCTA
 TCTGCAGTGGAGCTCCCTGAAGGCCTCTGATACCGCCATGTACTATTGTGCCAGATACGA
 CTATACATCTAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCT (SEQ
 ID NO: 27)

Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи (VL3) GO-702h

ATGGGGCTGGAGCTGGATCCTGCTGTTCCCTCCTGAGCGTGACAGCAGGAGTGCACAGCGA
 GATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGGGCCAC
 CCTGAGCTGCAGAGCCTCCGAGTCTGTGCAGTACAGCGGCACATCCCTGATGCACTG
 GTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAACGT
 GGAGACAGGAATCCCAGCACGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGCACAGACTTTACCCT
 GACAATCAGCTCCCTGGAGCCTGAGGATTTCCCGTGTACTATTGTCAGCAGAATTG
 GAAGGTGCCATGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:
 28)

Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи (VL4) GO-702h

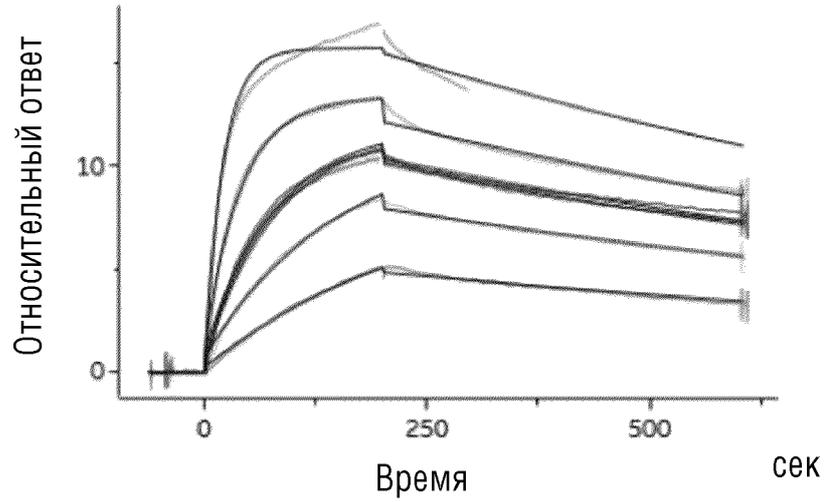
ATGGGGCTGGAGCTGGATCCTGCTGTTCCCTCCTGAGCGTGACAGCAGGAGTGCACAGCGA
 CATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATCGGGTGACCAT
 CACATGCAGAGCCAGCGAGTCCGTGCAGTACTCTGGCACAAAGCCTGATGCACTGGTATC
 AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCATCCAACGTGGAGACA
 GGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGCACAGACTTACCTTTACAATCTCT
 AGCCTGCAGCCAGAGGATATCGCCACCTACTATTGTCAGCAGAATTGGAAGGTGCCCTG
 GACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 29)

Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи (VL1) GO-702h

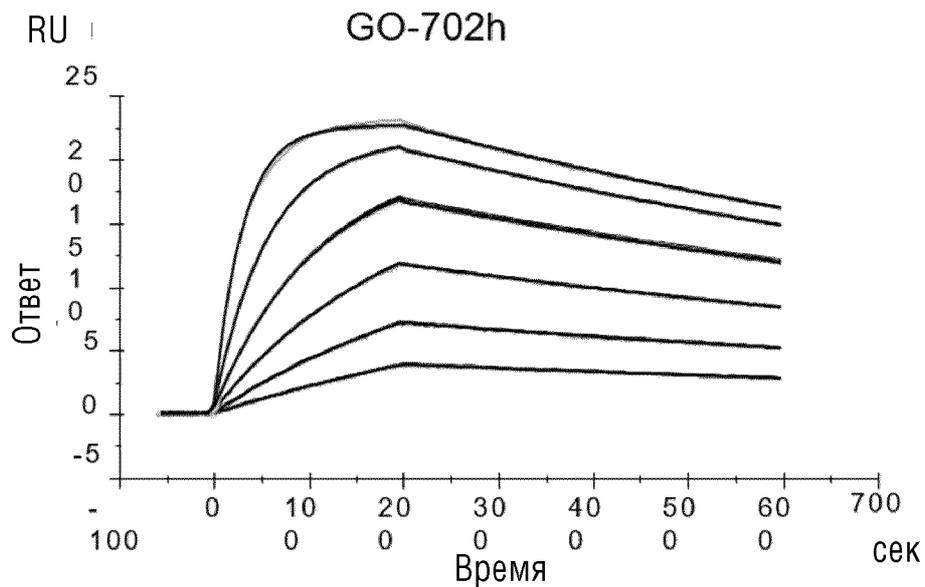
ATGGGGCTGGAGCTGGATCCTGCTGTTCCCTCCTGAGCGTGACAGCAGGAGTGCACAGCGA
 CATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATCGGGTGACCAT
 CACATGCAGAGCCAGCGAGTCCGTGCAGTACTCTGGCACAAAGCCTGATGCACTGGTATC
 AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCATCCAACGTGGAGACA
 GGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGCACAGACTTACCTTGACAATCTCT
 AGCCTGCAGCCAGAGGATTTCCGCCACCTACTATTGTCAGCAGAATTGGAAGGTGCCCTGG
 ACCTTTGGCGGGCGGCACAAAGGTGG AGATCAAG (SEQ ID NO: 30)

ФИГ.2

RU MUC1-ECD; химерное GO-702m, связывание 1:1

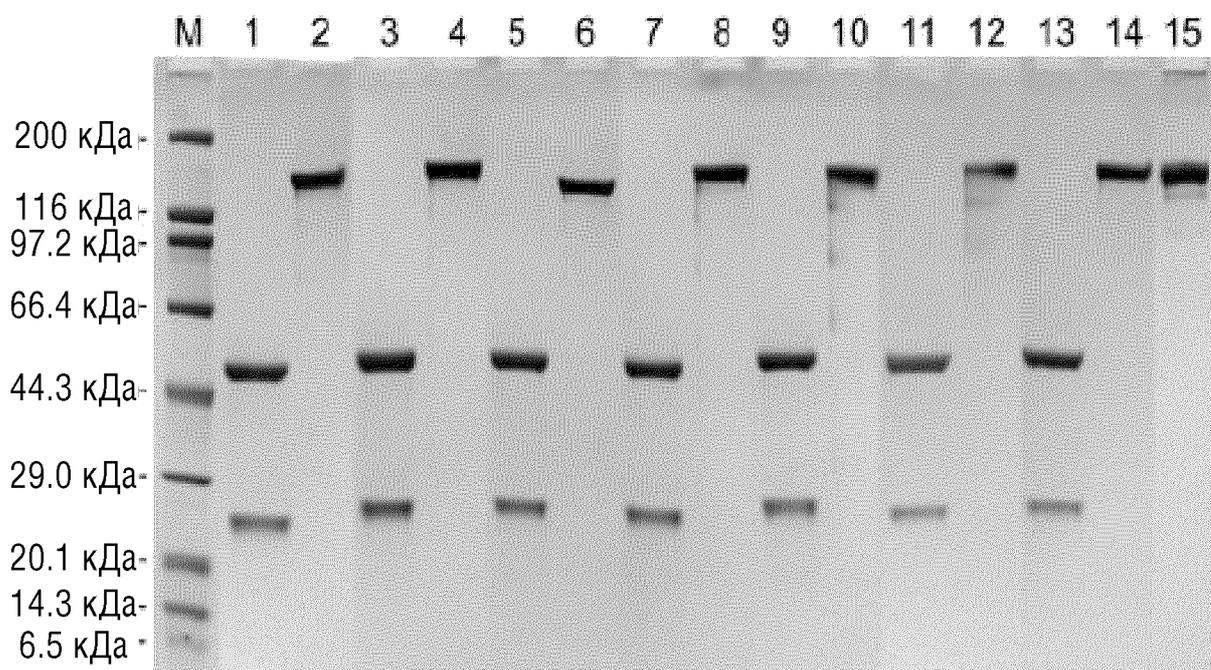


Лиганд	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
Химерный IgG	MUC1-SEA-NIS	9.43E+05	8.55E-04	9.06E-10	15.8	5.18E-02

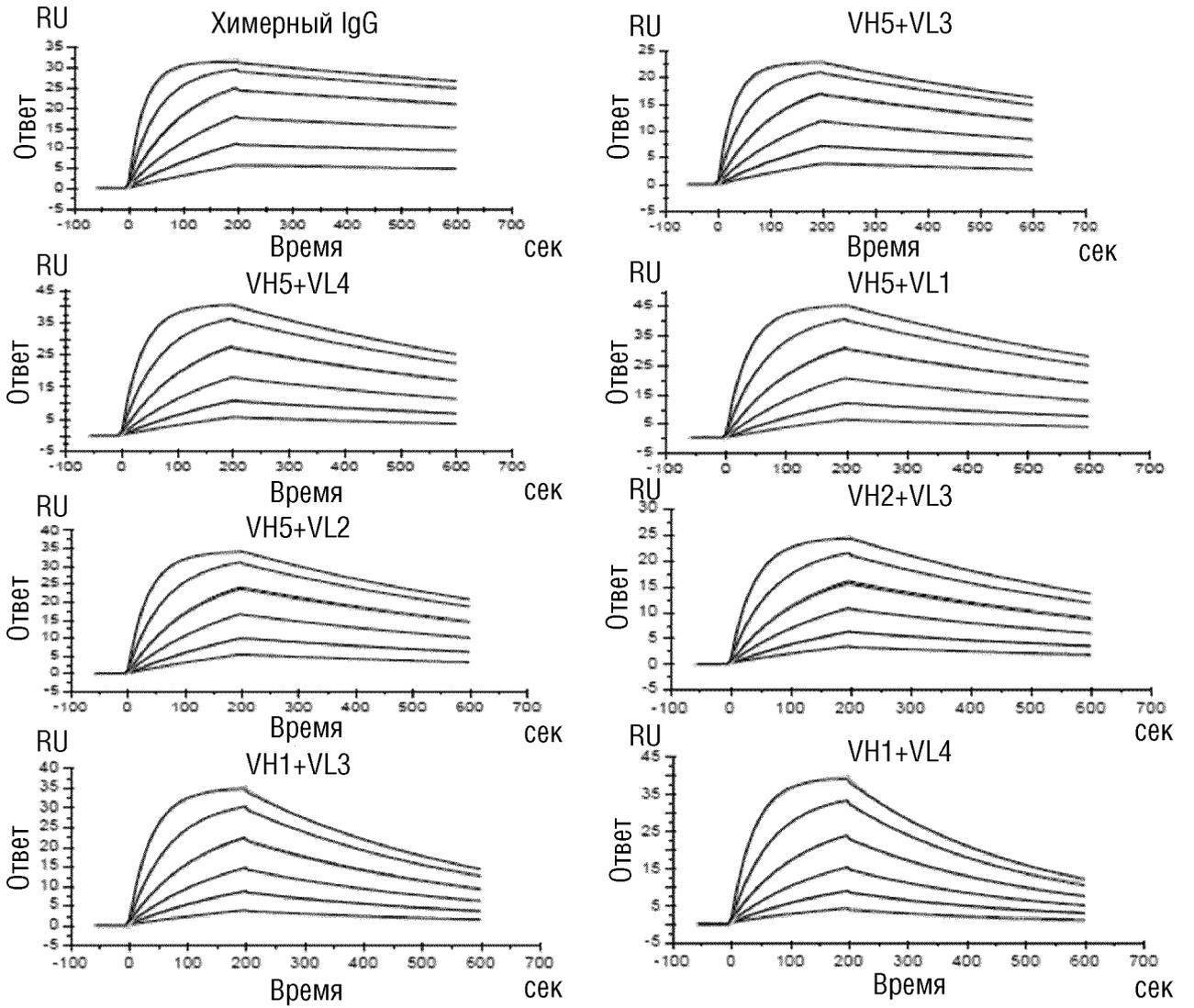


Лиганд	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	χ^2 (RU ²)
Химерный IgG		5.93E+05	3.85E-04	6.49E-10	31.5	0.0218
GO-702h		5.45E+05	8.44E-04	1.55E-09	23.21	0.0103

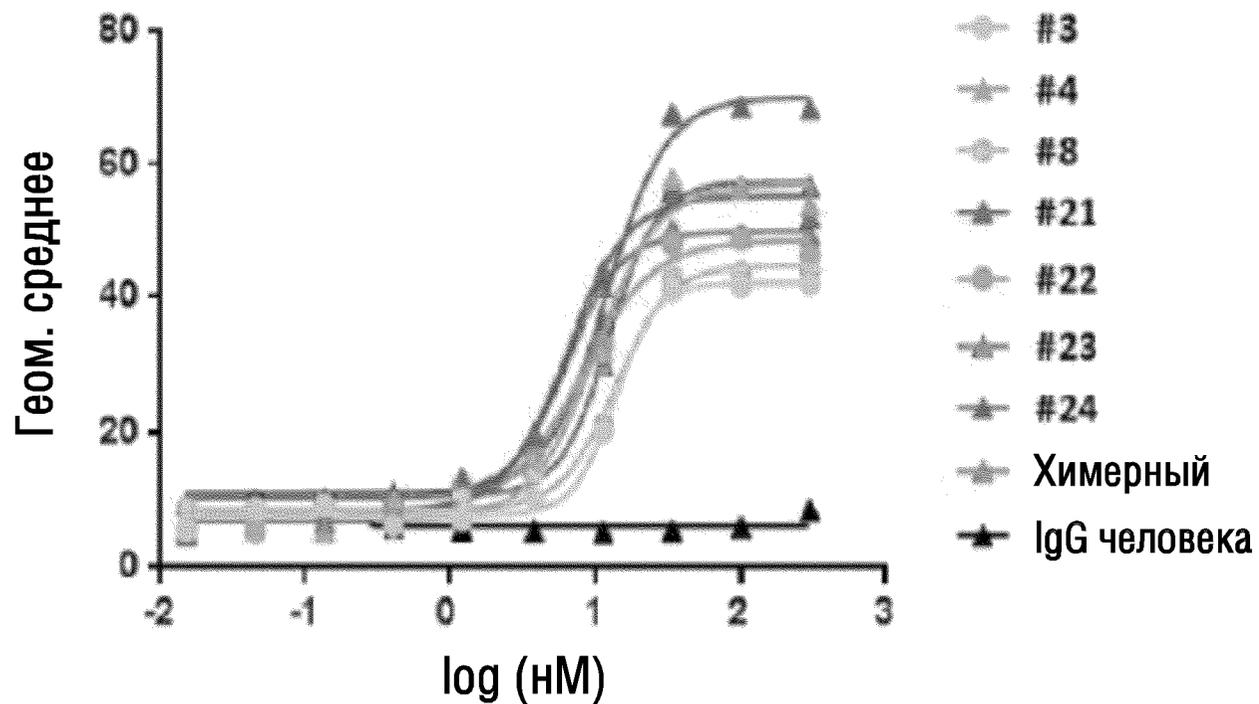
ФИГ.3



ФИГ.4

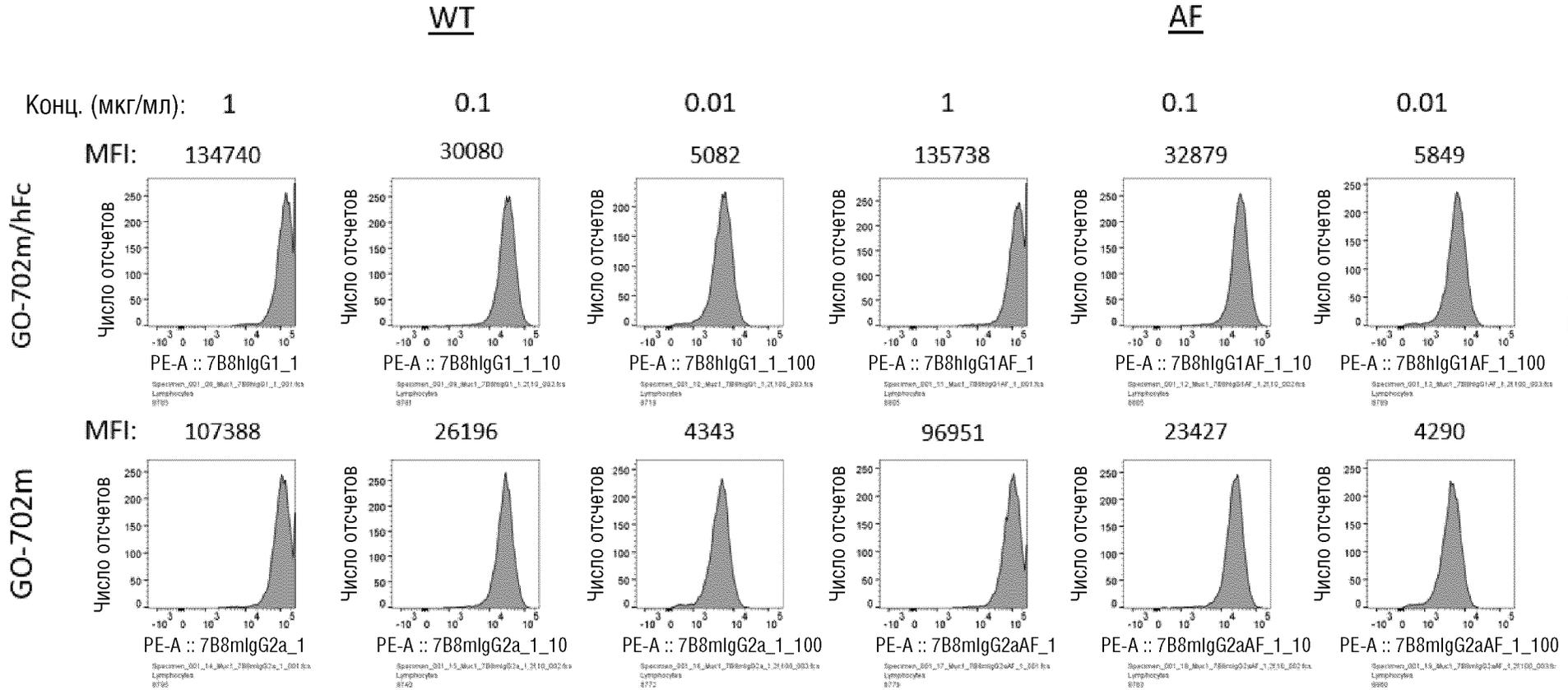


ФИГ.5



	#3	#4	#8	#21	#22	#23	#24	Химерный	IgG человека
EC50	13.23	9.804	13.31	6.162	7.689	12.17	11.73	6.084	~ 0.2919

ФИГ.6

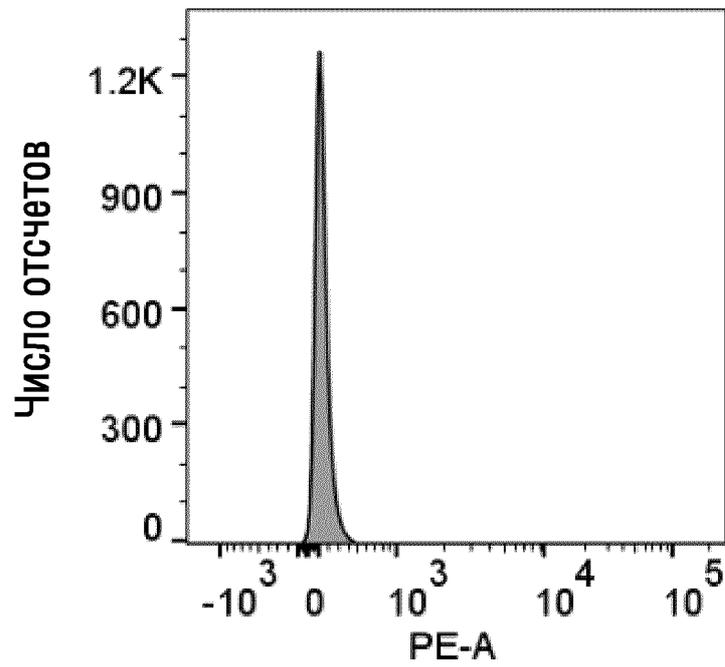


9/29

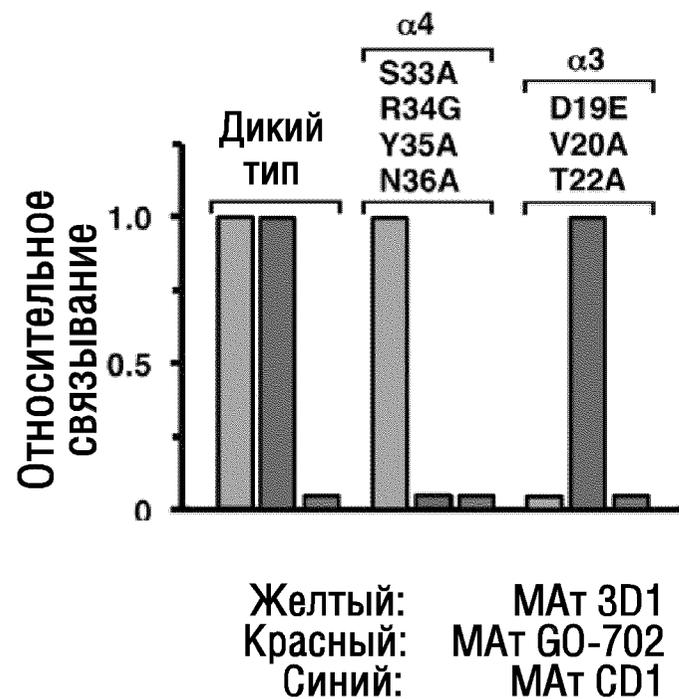
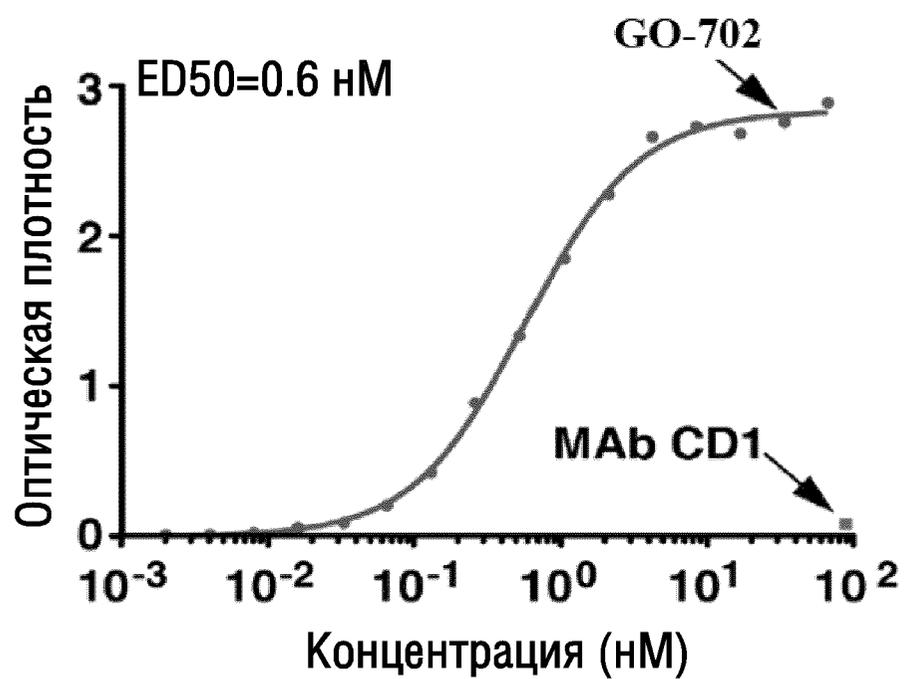
Биотин-конъюгат против hlgG (1:600) + Стрептавидин-ФЭ (1:250) или FITC-конъюгат против мышиного IgGk

ФИГ.7

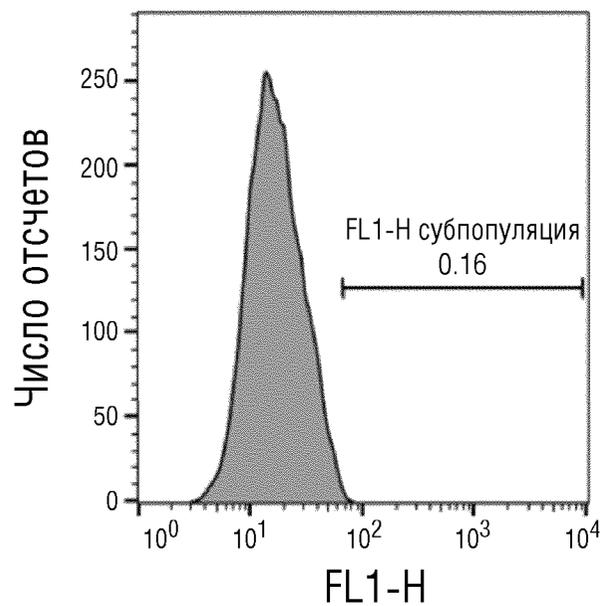
MFI: 126



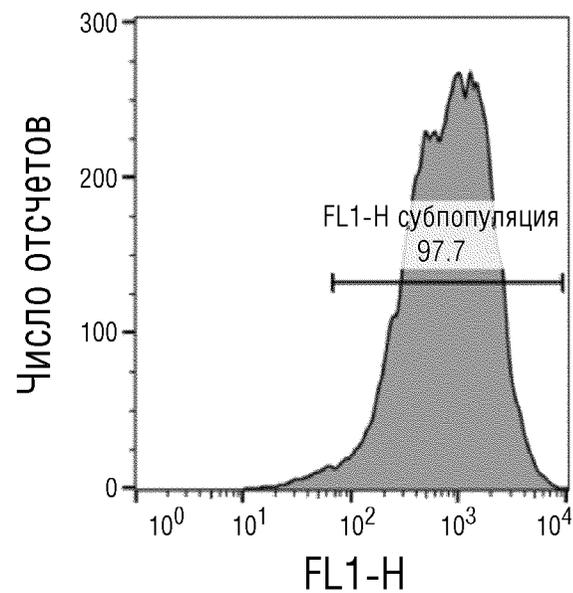
ФИГ.8В



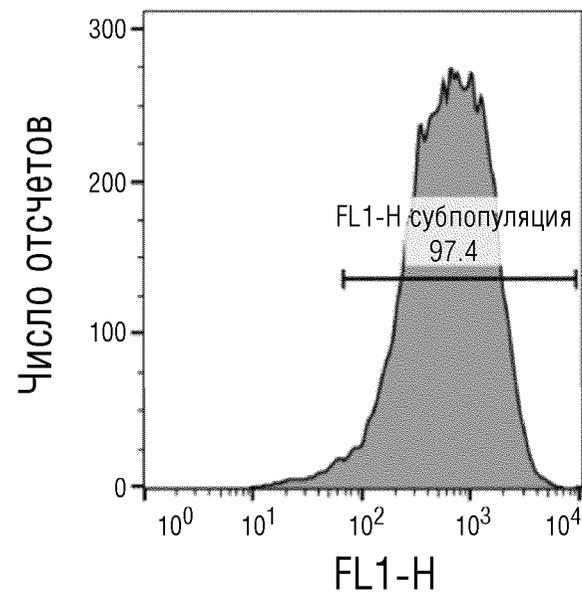
ФИГ.9



Контроль (hlgG1)



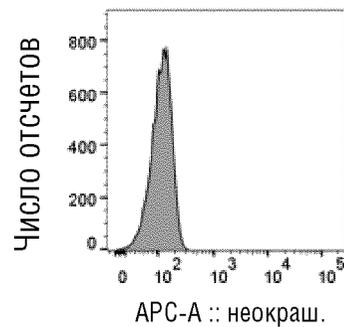
Химера GO-702m-hFc-WT



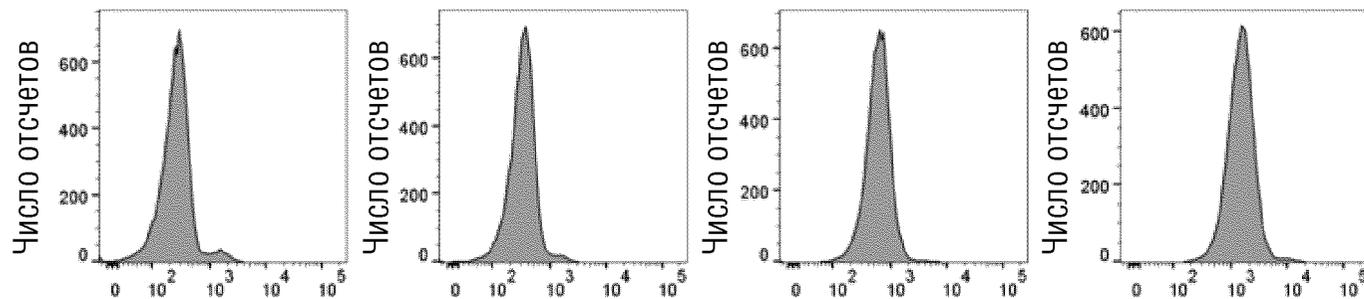
Химера GO-702m-hFc-(AF)

ФИГ.10А

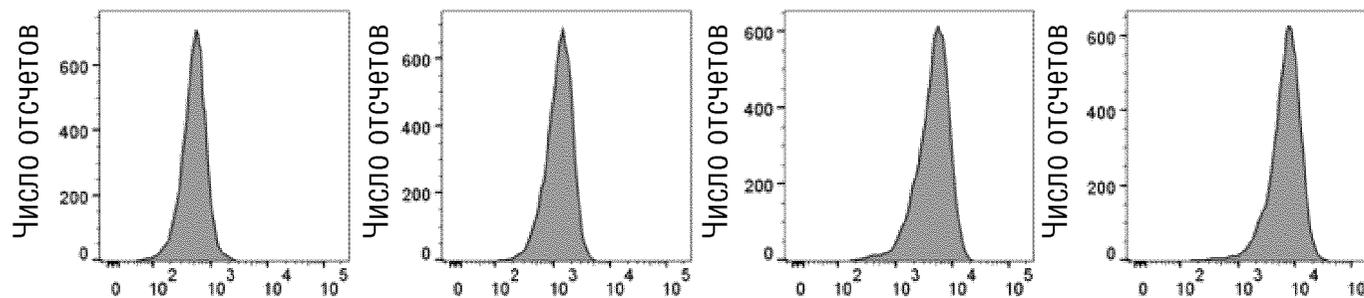
Изотипический контроль



GO-702h дикого типа



Афукозилированное GO-702h



Антитела:

20 нг/мл

80 нг/мл

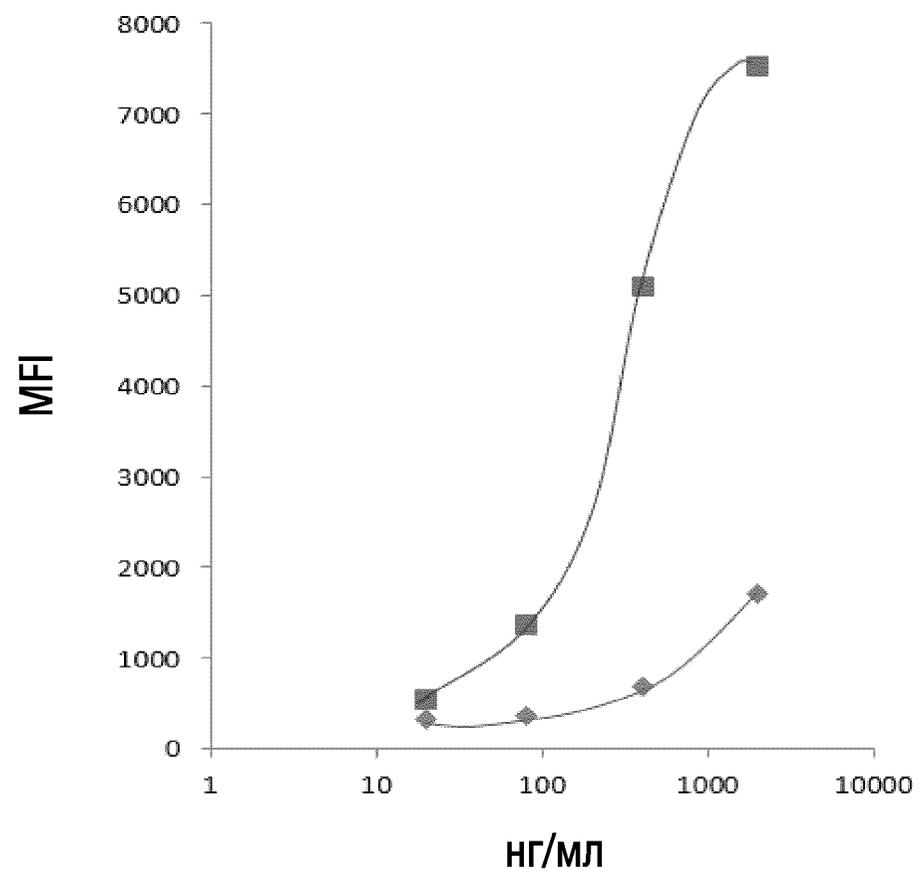
400 нг/мл

2000 нг/мл

ФИГ.10В

GO-702h IgG1 wt нг/мл	Средняя флуор.
0	119
20	323
80	365
400	675
2000	1714
GO-702h IgG1 AF нг/мл	Средняя флуор.
20	546
80	1362
400	5091
2000	7522

Синий: GO-702h дикого типа
Красный: афукозилированное GO-702h



ФИГ.11

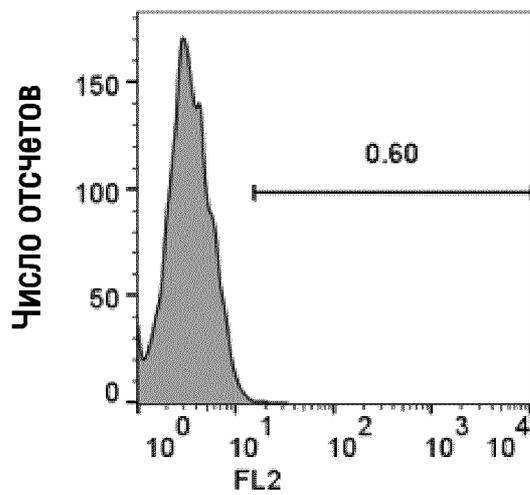
		Растворитель		Афукозилированное GO-702m, 5 мг/кг	
Анализ	Единицы	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Холестерин	мг/дл	94	86	94	67.5
Триглицериды	мг/дл	149	65	100	85
АЛТ	Ед/л	33	27	57	22
АСТ	Ед/л	114	62	125	66.5
ЩФ	Ед/л	53	83	105.7	145.5
Глюкоза	мг/дл	145	137	206	184.5
Фосфор	мг/дл	6.7	8.6	10.2	7.9
Са	мг/дл	10.0	10.3	10.3	10.05
Общий билирубин	мг/дл	0.14	0.15	0.18	0.17
Общий белок	г/дл	5.1	5.2	4.8	4.8
Альбумин	г/дл	3.0	3.0	2.6	3.1
Азот мочевины крови	мг/дл	33	27	30	29
Креатинин	мг/дл	0.3	0.3	0.3	0.3
Na	мЭКВ/л	155	156	153.7	151.5
К	мЭКВ/л	5.4	4.4	6.5	5.4
Cl	мЭКВ/л	111	110	111.3	111

ФИГ.12

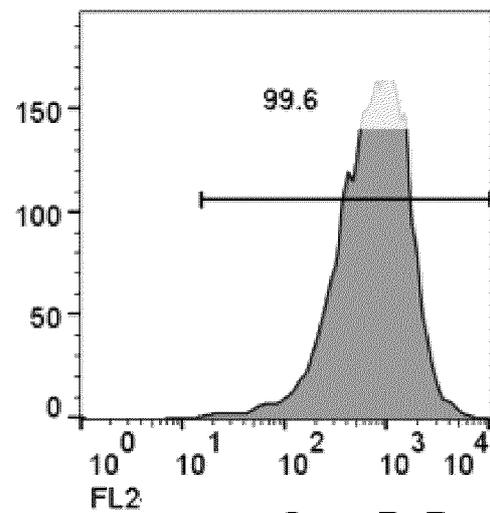
	Растворитель		Афукозилированное GO-702m, 5 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Лейкоциты ($\times 10^3$ клеток/мкл)	6.45	5.23	5.49	5.52
#Нейтрофилы ($\times 10^3$ клеток/мкл)	1.13	1.28	1.75	0.43
#Лимфоциты ($\times 10^3$ клеток/мкл)	4.91	3.61	3.30	4.78
#Моноциты ($\times 10^3$ клеток/мкл)	0.22	0.19	0.14	0.08
#Эозинофилы ($\times 10^3$ клеток/мкл)	0.09	0.06	0.21	0.15
Эритроциты ($\times 10^6$ клеток/мкл)	9.61	9.86	9.12	9.23
Гемоглобин (г/дл)	13.5	13.8	13.4	13.5
Гематокрит (%)	48.3	49.8	47.7	47.7
Средний объем эритроцита (фл)	50.3	50.5	52.4	51.6
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг)	14.1	14.0	14.7	14.6
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл)	28.0	27.8	28.1	28.3
Тромбоциты ($\times 10^3$ клеток/мкл)	1018	1120	1054	986.5

ФИГ.13

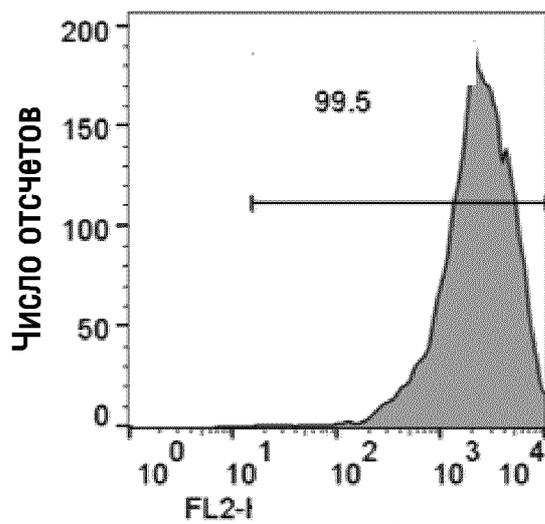
Контроль



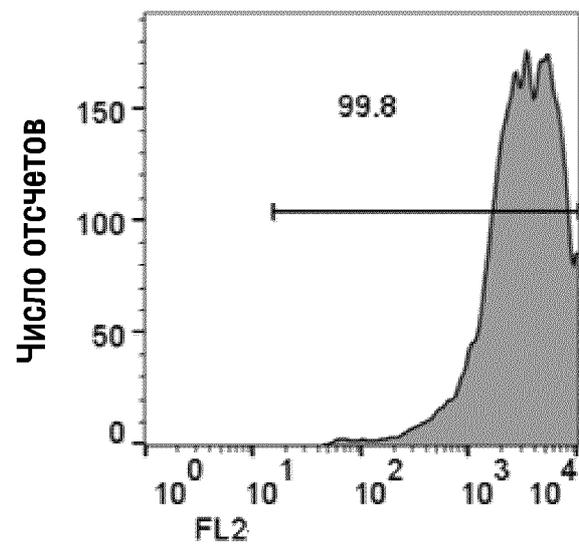
GO-702h



GO-701m

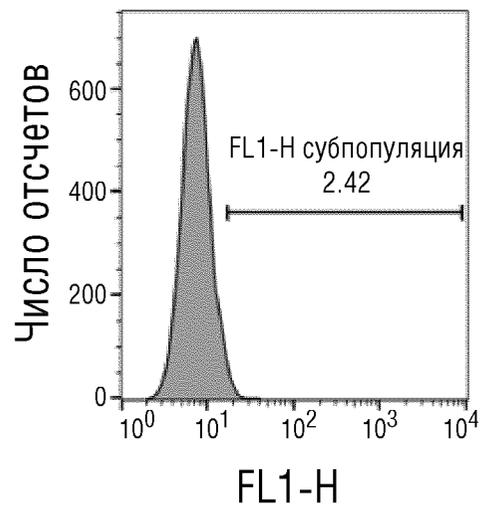


GO-702m

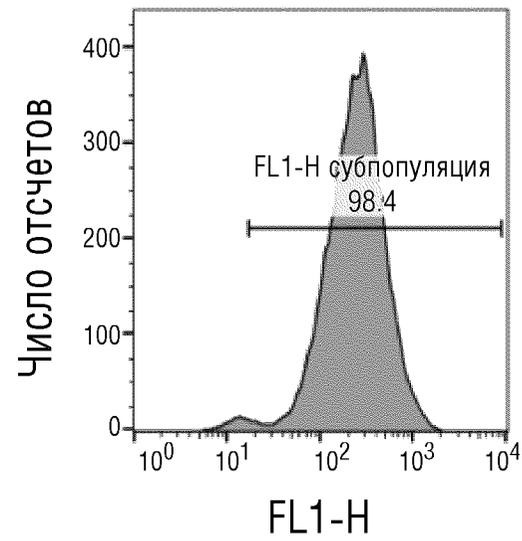


ФИГ.14

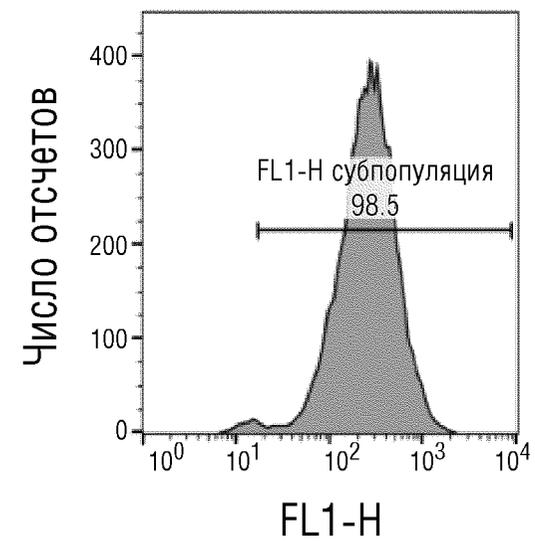
CD1



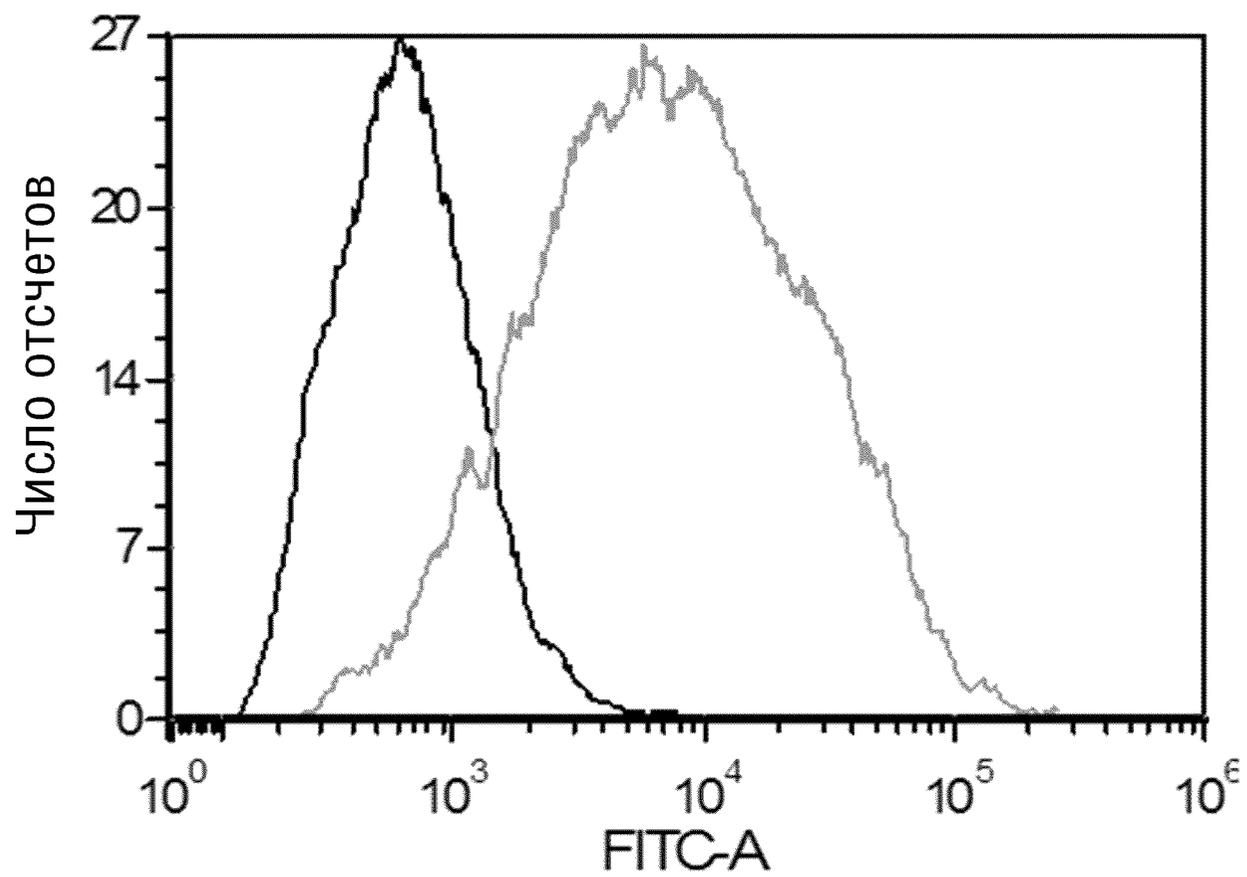
GO-702h дикого типа



Афукозилированное GO-702h

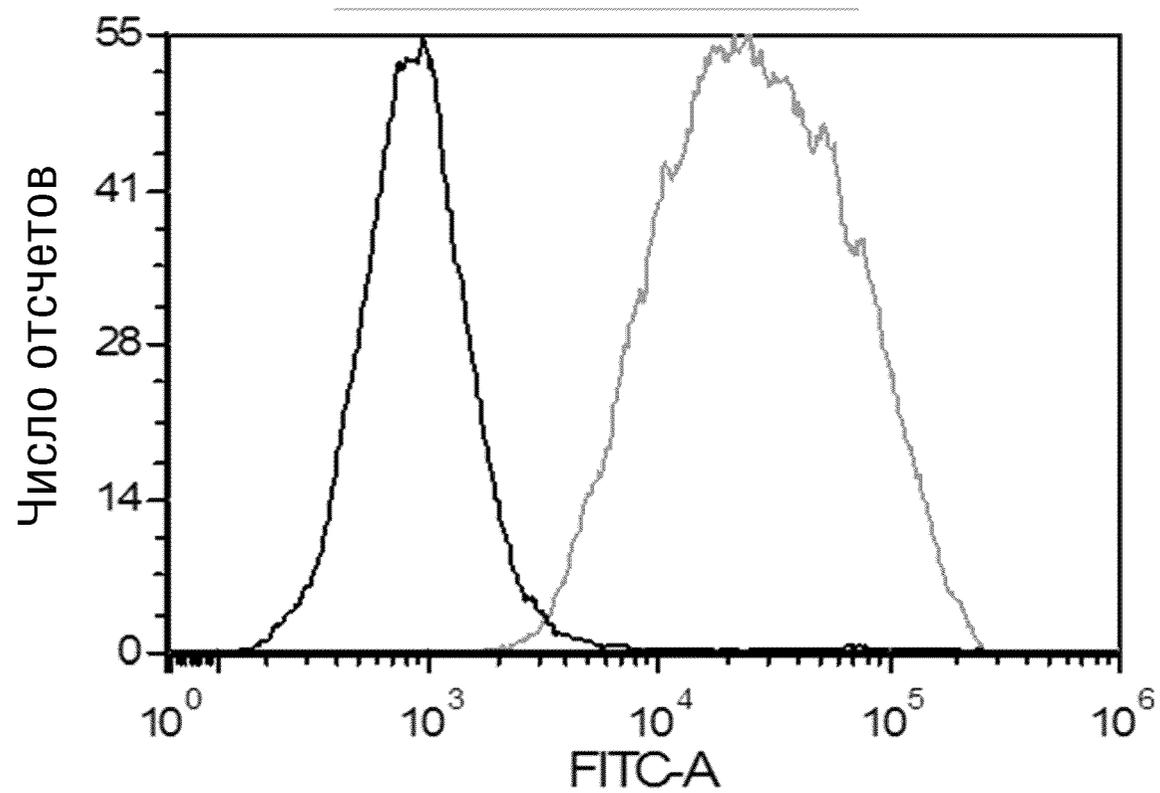


ФИГ.15

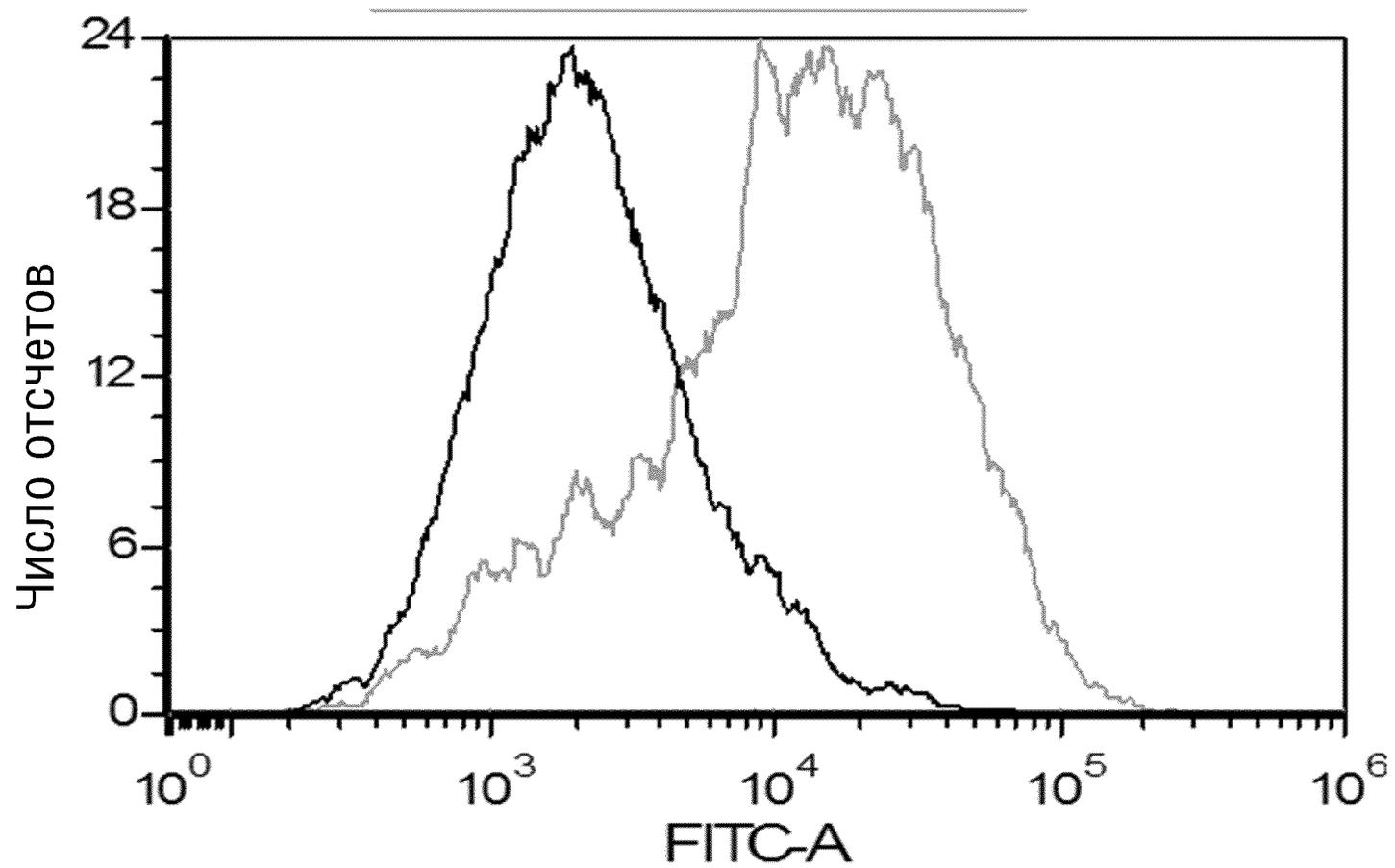


ФИГ.16

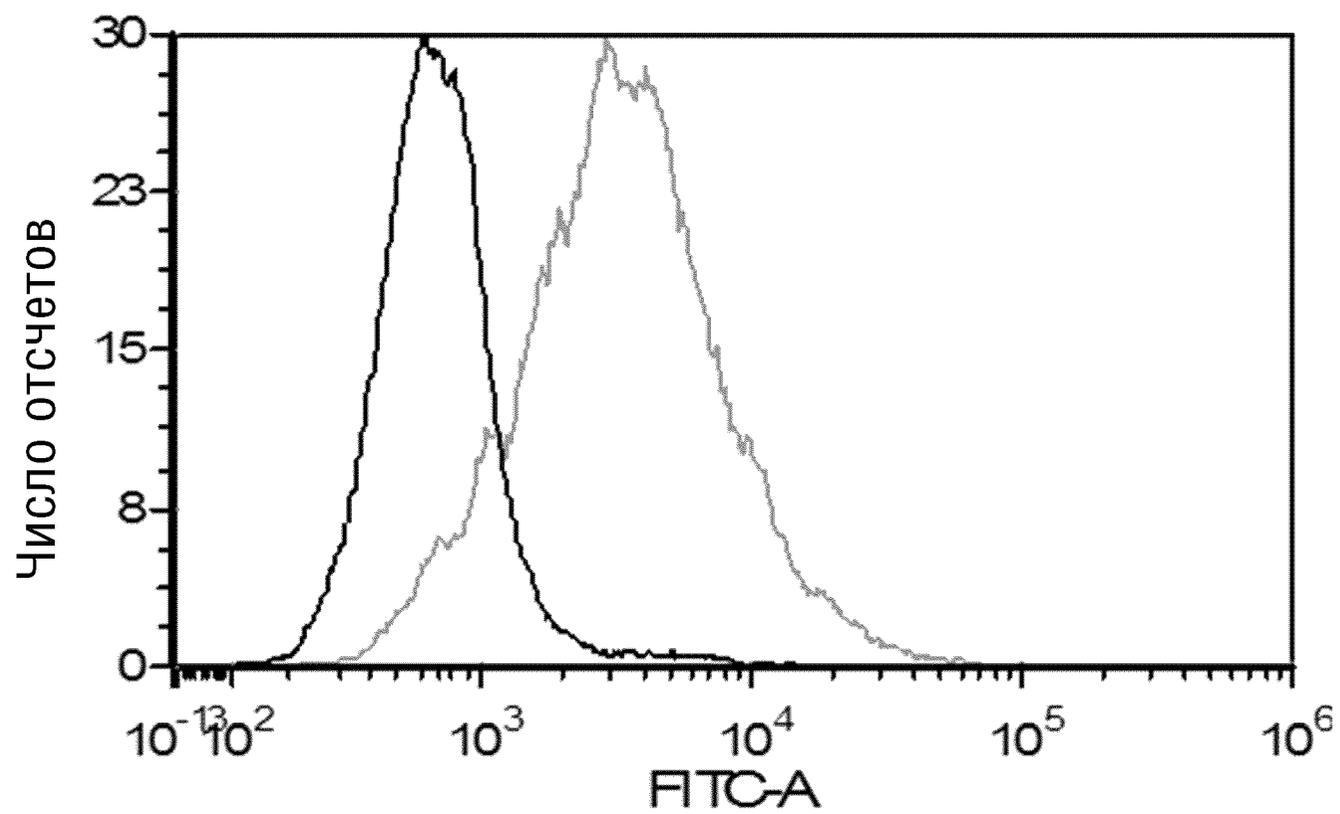
GO-702h в сравнении с CD1



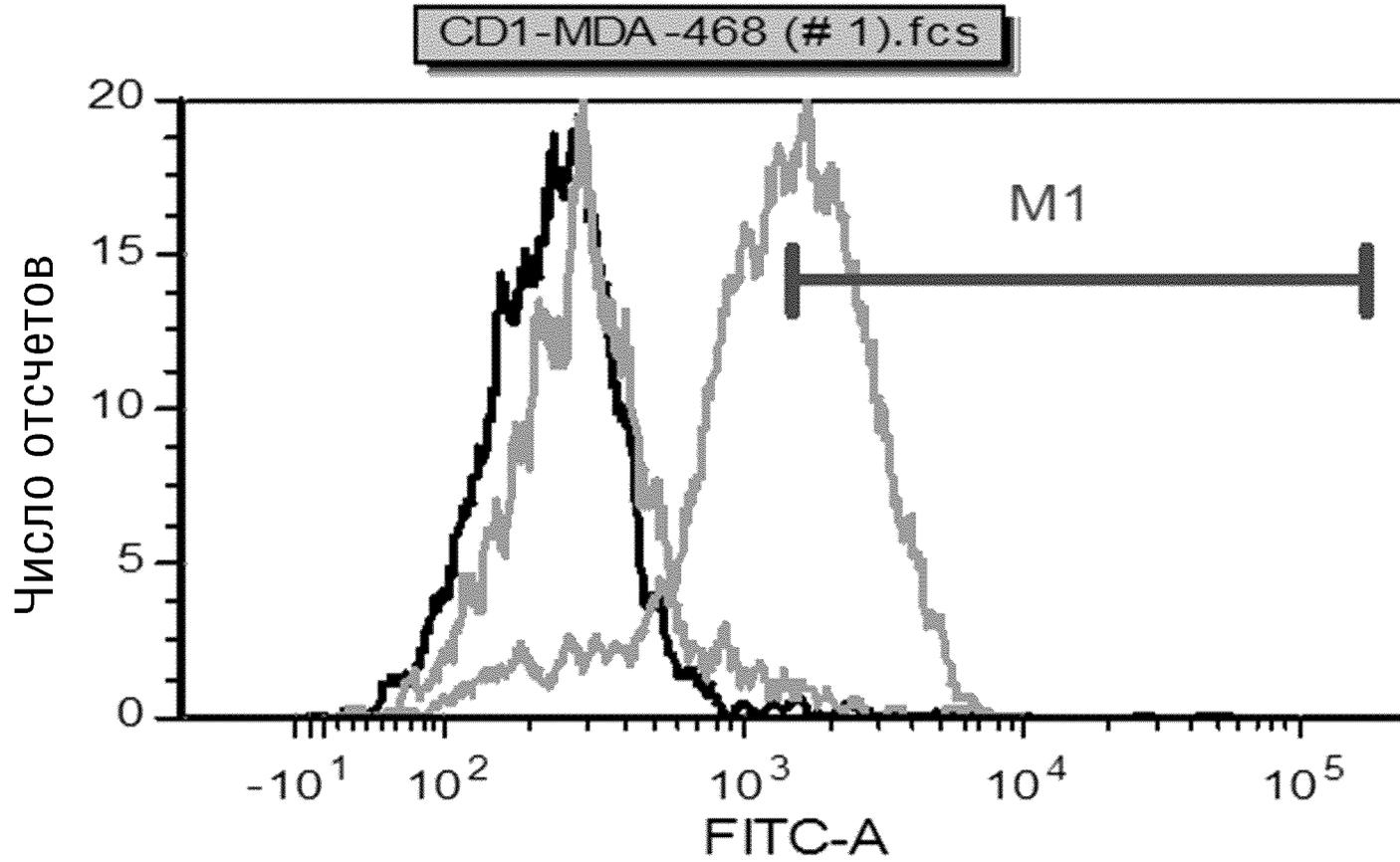
ФИГ.17



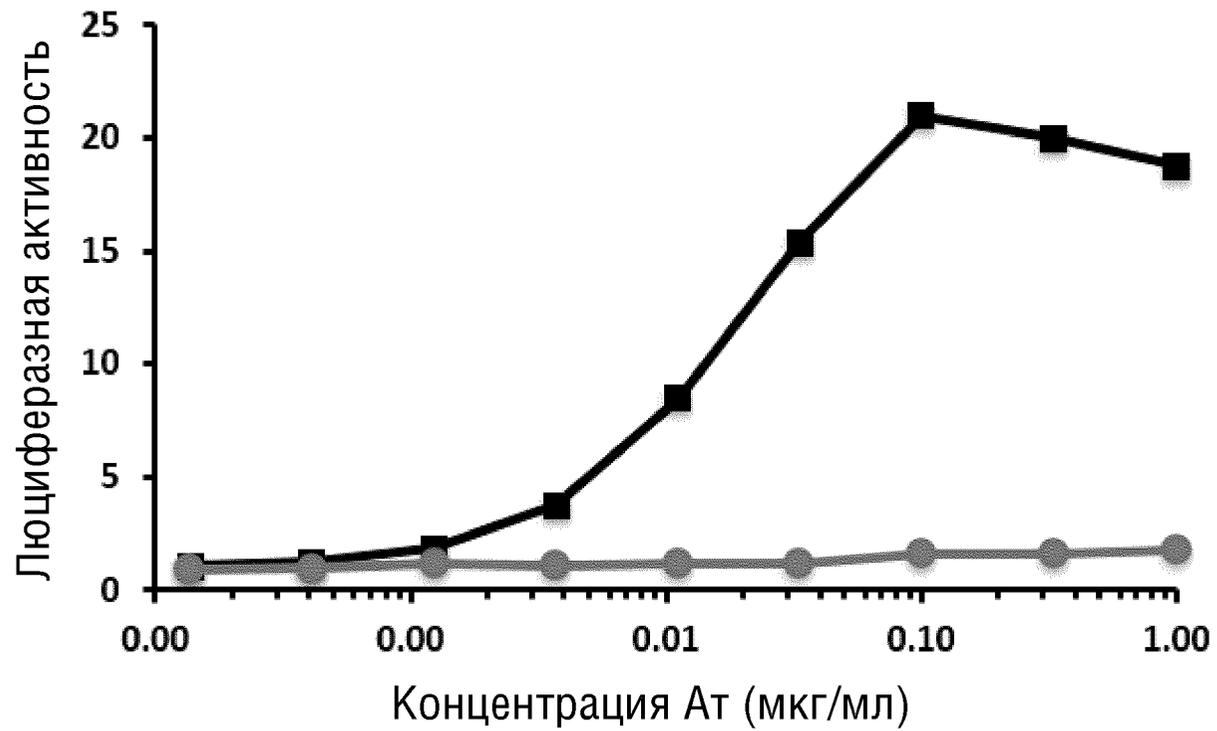
ФИГ.18



ФИГ.19

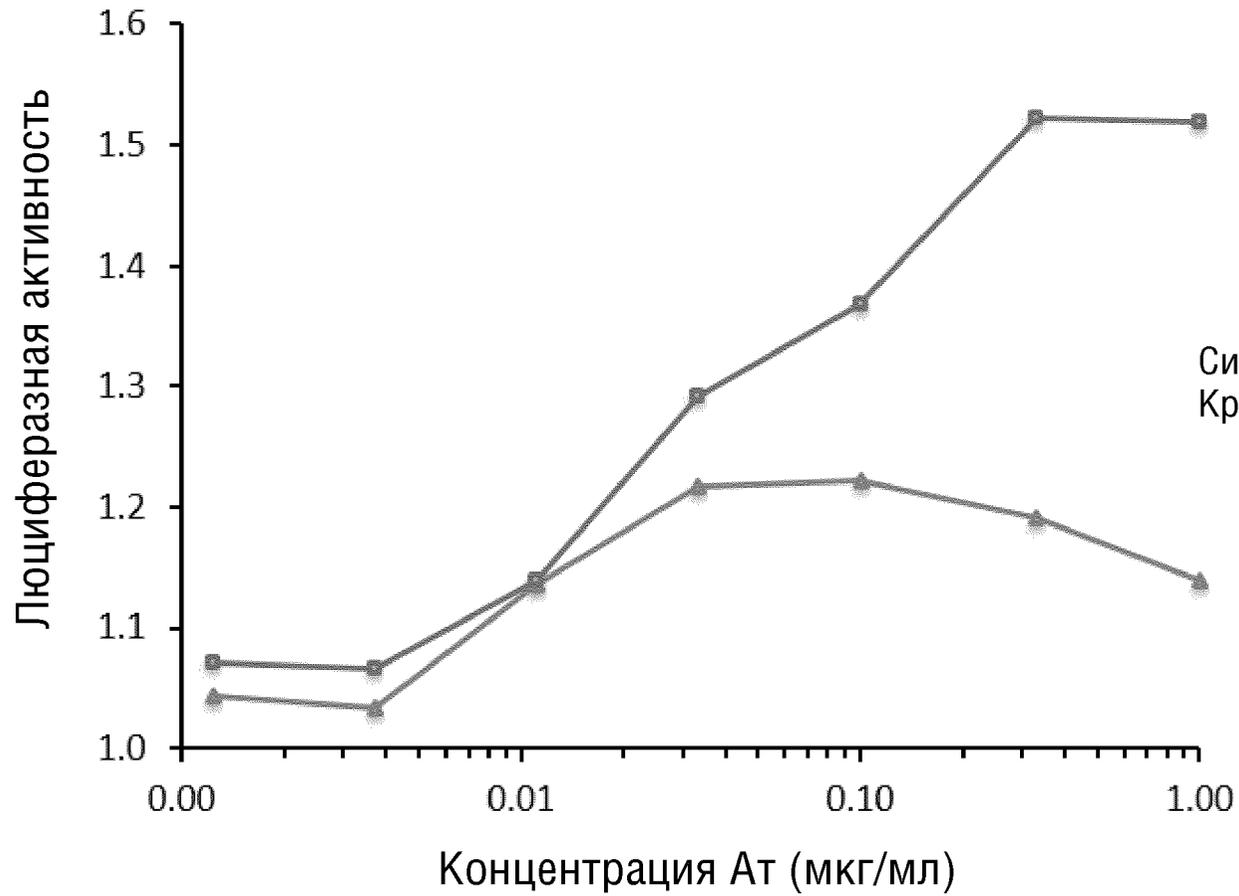


ФИГ.20



Оранжевый: GO-702m дикого типа
Черный: афукозилированное GO-702m

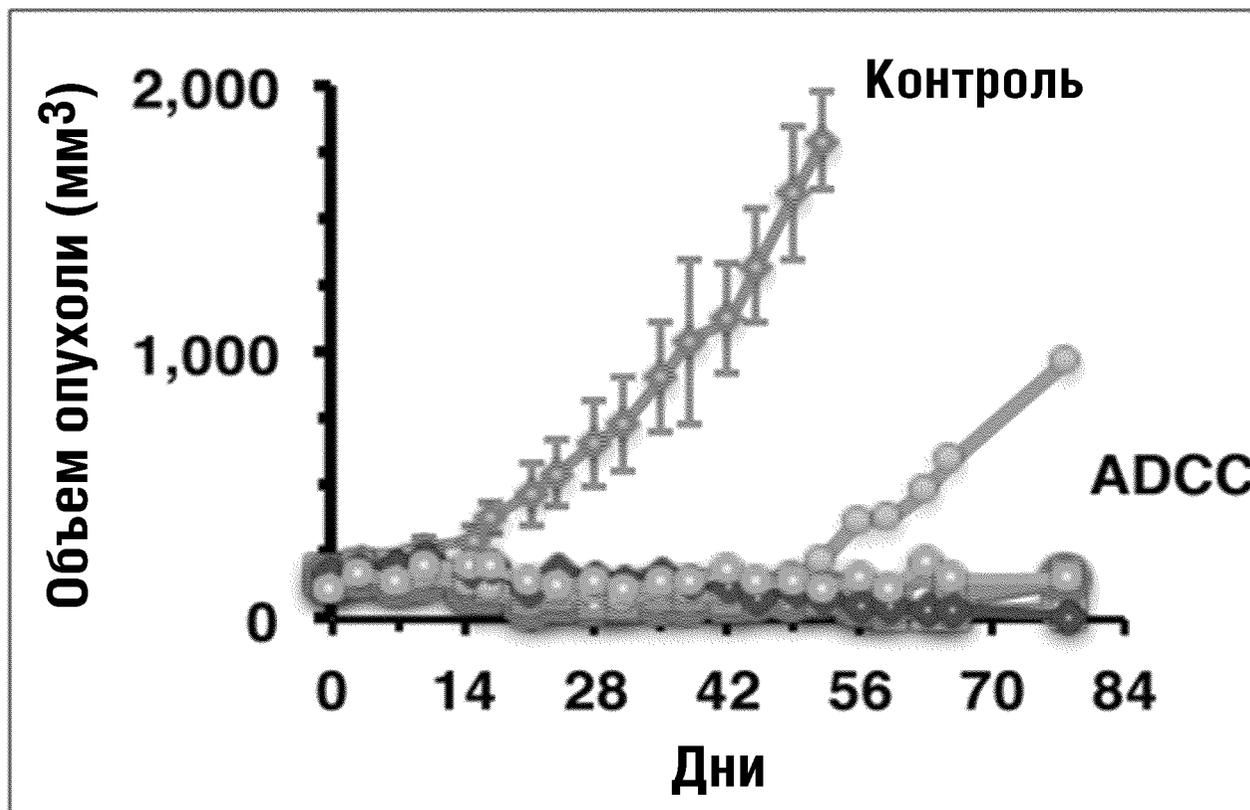
ФИГ.21



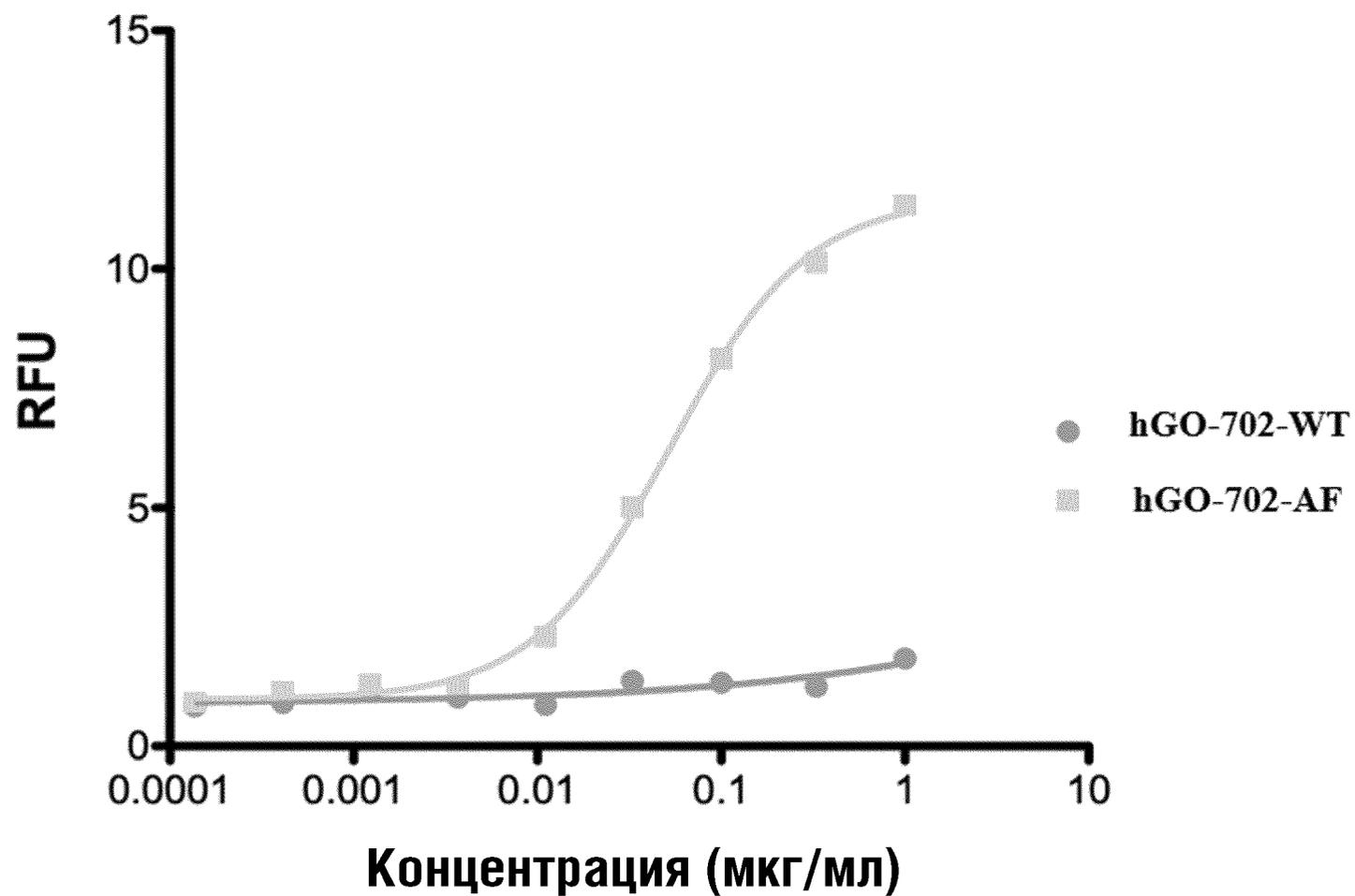
Синий: GO-702m дикого типа
Красный: афукозилированное GO-702m

26/29

ФИГ.22



ФИГ.23



ФИГ.24

