

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393464 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.02

(22) Дата подачи заявки
2022.05.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ПРОТИВ MUC1-C/
ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА (MUC1-C/ECD)

(31) 63/194,597

(32) 2021.05.28

(33) US

(86) PCT/US2022/031431

(87) WO 2022/251695 2022.12.01

(88) 2023.01.05

(71) Заявитель:

ЭксУайУАН ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК.; ДАНА-ФАРБЕР КЭНСЕР
ИНСТИТЮТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Кхарбанда Сарендер, Панчамурти
Говиндасвами, Куфе Дональд В. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антительным конструкциям, связывающимся с MUC1-C/внеклеточным доменом (MUC1-C/ECD) и по меньшей мере с одной другой связывающей мишенью. Также предусматриваются способы применения таких конструкций для лечения злокачественных опухолей, которые экспрессируют антиген MUC1.

202393464

A1

A1

202393464

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 579881EA/23

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ПРОТИВ MUC1- С/ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА (MUC1-C/ECD)

ПРИТЯЗАНИЕ НА ПРИОРИТЕТ

Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США с серийным номером № 63/194597, поданной 28 мая 2021 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылок.

ОТСЫЛКА К СПИСКУ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который предоставлен в формате ASCII через EFS-Web и, таким образом, включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 26 мая 2022 года, названа GENU0048WO_ST25.txt и имеет размер 112 KB.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область

Настоящее изобретение относится, главным образом, к области медицины, онкологии и иммунотерапии. Более конкретно, оно относится к разработке мультиспецифических иммунореагентов для лечения MUC1-положительных злокачественных опухолей.

2. Уровень техники

Муцины являются белками с обширным O-гликозилированием, которые преимущественно экспрессируются эпителиальными клетками. Секретируемые и мембраносвязанные муцины формируют физический барьер, который защищает апикальные границы эпителиальных клеток от повреждения, индуцируемого токсинами, микроорганизмами и другими формами стресса, который происходит на поверхности контакта с окружающей средой. Трансмембранный муцин 1 (MUC1) также может передавать сигнал во внутреннюю среду клетки. MUC1 не обладает сходством последовательности с другими мембраносвязанными муцинами, за исключением присутствия домена протеина-энтерокиназы-агрина (SEA) спермы морского ежа (Duraismy *et al.*, 2006). В этом отношении, MUC1 транслируется в качестве единого полипептида, а затем претерпевает ауторасщепление в домене SEA (Macao, 2006).

MUC1 тщательно исследовался авторами изобретения и другими вследствие его роли в злокачественной опухоли. Как рассмотрено выше, MUC1 человека представляет собой гетеродимерный гликопротеин, транслируемый в качестве единого полипептида и расщепляемый на N- и C-концевые субъединицы (MUC1-N и MUC1-C) в эндоплазматической сети (Ligtenberg *et al.*, 1992; Macao *et al.*, 2006; Levitin *et al.*, 2005). Абберрантная сверхэкспрессия MUC1, встречающаяся в большинстве карцином человека (Kufe *et al.*, 1984), обеспечивает независимый от закоривания рост и туморогенность (Li *et al.*, 2003a; Huang *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). Другие исследования продемонстрировали, что сверхэкспрессия MUC1 сообщает резистентность

к апоптозу, индуцируемому окислительным стрессом и генотоксическими противораковыми средствами (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 выполняет функцию обеспечения защитного барьера на поверхности эпителиальных клеток. При повреждении эпителиального слоя плотные контакты между соседними клетками разрушаются и полярность утрачивается, поскольку клетки инициируют херегулин-индуцируемую программу репарации (Vermeer *et al.*, 2003). MUC1-N отделяется от клеточной поверхности (Abe and Kufe, 1989), оставляя MUC1-C для функционирования в качестве передатчика стрессовых сигналов внешней среды внутрь клетки. Для этого MUC1-C формирует комплексы на клеточной поверхности с представителями семейства рецепторов ErbB, и MUC1-C нацеливается в ядро в ответ на стимуляцию херегулином (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003c). MUC1-C также участвует в интеграции рецептора ErbB и сигнальных каскадах Wnt через прямые взаимодействия между цитоплазматическим доменом (CD) MUC1 и представителями 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). Другие исследования продемонстрировали, что MUC1-CD фосфорилируется киназой гликогенсинтазы 3 β , 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 любых из вышеуказанных взаимодействий является потенциальной точкой терапевтического вмешательства при MUC1-связанных злокачественных опухолях.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, предусматривается конструкция рекомбинантного антитела, которая селективно связывается с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определяемым SEQ ID NO: 2, где указанная антительная конструкция также связывается с:

- (a) CD3;
- (b) CD16;
- (c) CD28;
- (d) миелоид-специфическим антигеном;
- (e) ErbB2;
- (f) EGFR;
- (g) CD3 и PD1;
- (h) CD16 и PD1;
- (i) CD47;
- (j) SIRP α ;
- (k) NKG2D,
- (l) Siglec 9.

Антительная конструкция может быть двухвалентной, трехвалентной или четырехвалентной. Антительная конструкция может иметь две разных специфичности

связывания для MUC1-C-/ECD. Антительная конструкция может обладать специфичностью связывания MUC1, обеспечиваемой последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, 5 и 7, соответственно, и последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 4, 6 и 8, соответственно, и/или специфичностью связывания MUC1, обеспечиваемой последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, 11 и 13, соответственно, и последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 10, 12 и 14, соответственно.

Антительная конструкция может содержать одну или несколько мутаций, позволяющих двум разным антительным цепям закрыться. Антительная конструкция может содержать последовательности IgG и/или может представлять собой гуманизованную версию антитела мыши, такую как конструкция гуманизованного антитела, содержащая последовательности IgG. Антительная конструкция, кроме того, может содержать метку, такую как пептидная метка, фермент, магнитная частица, хромофор, флуоресцентная молекула, хемилюминесцентная молекула или краситель. Кроме того, антительная конструкция может дополнительно содержать противоопухолевое лекарственное средство, соединенное с ней, например, где противоопухолевое лекарственное средство соединено с указанной антительной конструкцией через фотолабильный линкер или ферментативно расщепляемый линкер. Противоопухолевое лекарственное средство может представлять собой токсин, радиоактивный изотоп, цитокин или фермент.

Антительная конструкция может содержать SEQ ID NO: 22-42. Антительная конструкция может содержать последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 22-42. Антительная конструкция может быть конъюгирована с наночастицей или липосомой. Индукция клеточной смерти может включать антителозависимую клеточную цитотоксичность или комплемент-опосредуемую цитотоксичность.

Также предусматривается способ лечения злокачественной опухоли, включающий приведение в контакт MUC1-положительной злокачественной клетки с антительной конструкцией, как определено в настоящем описании. MUC1-положительная злокачественная клетка может представлять собой клетку солидной опухоли, такую как клетка рака легкого, клетка злокачественной опухоли головного мозга, клетку рака головы и шеи, клетку рака молочной железы, клетку рака кожи, клетку рака печени, клетку рака поджелудочной железы, клетку рак желудка, клетку рака толстого кишечника, клетку рака прямой кишки, клетку рака тела матки, клетки рака шейки матки, клетку рака яичника, клетку рака семенника, клетку рака кожи или клетку рака пищевода. MUC1-положительная злокачественная клетка может представлять собой клетку лейкоза или миеломы, таких как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома.

Кроме того, способ может включать приведение в контакт указанной MUC1-положительной злокачественной клетки со вторым средством или способом лечения

против злокачественной опухоли, например, где указанное средство против злокачественной опухоли или способ лечения выбраны из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии или терапии токсинами. Второе средство против злокачественной опухоли или способ лечения может ингибировать функцию внутриклеточного MUC1. Второе средство против злокачественной опухоли или способ лечения могут применяться одновременно с указанной антительной конструкцией или могут применяться до и/или после указанной антительной конструкции. MUC1-положительная клетка может представлять собой клетку метастатической злокачественной опухоли, злокачественную клетку с множественной лекарственной резистентностью или клетку рецидивирующей злокачественной опухоли. Антительная конструкция может приводить к индукции клеточной смерти, например, посредством антителизависимой клеточной цитотоксичности или комплемент-опосредуемой цитотоксичности.

Также предусматривается клетка, экспрессирующая антительную конструкцию, как описано в настоящем описании.

Предусматривается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем описании, могут быть осуществлены в отношении любого другого способа или композиции, описанных в настоящем описании.

Использование формы единственного числа совместно с термином "содержащий" в формуле изобретения и/или описании может означать "один", но также согласуется со значением "один или несколько", "по меньшей мере один" и "один или более одного". Слово "приблизительно" означает плюс или минус 5% от указанного количества.

Другие задачи, признаки и преимущества настоящего изобретения станут понятными из приведенного ниже подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на конкретные варианты осуществления изобретения, приводятся только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации, входящие в объем изобретения, станут понятными специалистам в данной области из приведенного ниже подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенные ниже чертежи формируют часть настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может стать более понятным с помощью одного или нескольких чертежей в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем описании.

ФИГ.1А-Ж: Схема различных форм биспецифических антител. (Фиг.1А) биспецифическое антитело h3D1-hCD3 (пара конструкций "А"). Получали биспецифические конструкции ДНК (конструкции А) для создания гомодимера бивалентных паратопов, связывающих hMUC1-C (клон h3D1) и CD3 человека (hCD3). h3D1 (VH-CH1)-hFc-hCD3 (VL-VH) + h3D1 (VL-CL). Авторы изобретения также внесли мутации LALA-PG для устранения какого-либо опосредуемого Fc-рецептором

эффекторного механизма (SEQ ID NO: 30+31). (Фиг.1В) биспецифическое антитело против h7B8-1-hCD3 (пара конструкций "В"). Авторы изобретения получили мономер, содержащий отдельную легкую цепь антитела h7B8-1. Биспецифические конструкции против h7B8-1-hCD3 получали так, чтобы они имели один участок связывания MUC1-C, путем включения мономерного Fc, который имеет лучшую стабильность и не димеризуется (SEQ ID NO; 32+33). (Фиг.1С) Биспецифическое антитело против h3D1-hCD3 (пара конструкций "С"). Авторы изобретения получили гетеродимер с scFv, сведенными вместе посредством связывания типа "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1-C и одновалентный участок связывания CD3 вследствие гетеродимеризации с использованием технологии "выступы-в-полости" с указанными мутациями (Т366S, Т368А, Y407V против Т366W) в Fc-области. В технологии "выступ в полости" используются большие аминокислоты в одной цепи для создания "выступа" и используются аминокислоты меньшего размера для соответствующей "полости" в другой цепи. Кроме того, электростатическое движение двух противоположно заряженных тяжелых цепей в комбинации с технологией одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) обеспечивает надлежащую сборку цепи (SEQ ID NO: 22+23). (Фиг. 1D) Биспецифическое антитело против h3D1-hCD3 (scFv) (конструкция "D"). Этот формат биспецифического антитела имеет одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который имеет один участок связывания для каждого из MUC1-C и CD3 и остается в виде мономера вследствие указанных мутаций (SEQ ID NO: 22). (Фиг.1Е) Триспецифическое антитело против h3D1-hCD3-hPD-1 (пара конструкций "Е"). В этом формате используется та же стратегия гетеродимеризации, что и на фиг.1С, однако она включает участок связывания для PD-1 (SEQ ID NO: 22+34). (Фиг.1F) Триспецифическое антитело против h3D1-hCD3-hPD-1 (пара конструкций "F"). В этом формате используется та же стратегия гетеродимеризации, что и на фиг.1С, но она также включает участок связывания для PD-1 с разными ориентациями тяжелой и легкой цепей для h3D1 и hPD-1 (SEQ ID NO: 24+35). (Фиг.1G) Триспецифическое антитело против h7B8-1-hCD3-hPD-1 (пара конструкций "G"). В этом формате используется та же стратегия гетеродимеризации, что и на фиг.1С, но она включает участок связывания для PD-1 (SEQ ID NO: 26+36). (Фиг.1H) Триспецифическое антитело против h7B8-1-hCD3-hPD-1 (пара конструкций "H"). В этом формате используется та же стратегия гетеродимеризации, что и на фиг.1С, но также она включает участок связывания для PD-1 с отличающимися ориентациями тяжелой и легкой цепей для h7B8-1 и hPD-1 (SEQ ID NO: 28+37). (Фиг.1I) Биспецифическое антитело против h7B8-1-hCD3 (пара конструкций "I"). Авторы изобретения получили гетеродимер с scFv, сведенными вместе посредством связывания по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1-C и одновалентный участок связывания для CD3 вследствие гетеродимеризации с использованием технологии "выступ в полости" с указанными мутациями (Т366S, Т368А, Y407V против Т366W) в Fc-области. В технологии "выступ в полости" используются большие аминокислоты в одной цепи для образования "выступа" и

используются аминокислоты меньшего размера для соответствующей "полости" в другой цепи. Кроме того, электростатическое движение двух противоположно заряженных тяжелых цепей в комбинации с технологией одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) обеспечивает надлежащую сборку цепи (SEQ ID NO: 26+27). (Фиг.1J) Биспецифическое антитело против h7B8-1-hCD3 (scFv) (конструкция "J"). Этот формат биспецифического антитела имеет одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который имеет один участок связывания для каждого из MUC1-C и CD3 и остается мономером вследствие указанных мутаций (SEQ ID NO: 26). (Фиг.1K-N) Бипаратопные биспецифические конструкции против MUC1-C/CD3 в четырех разных форматах.

Фиг.2: Очистка биспецифических антител. Все указанные конструкции экспрессировали в клетках CHO-K1 и получали клоны единичных клеток для каждого биспецифического формата. Клетки клонов увеличивали в количестве, суспензионные культуры сохраняли и биспецифические антитела очищали с использованием колонок с белком А. Очищенные белки проверяли посредством SDS-PAGE. Дорожки 1-3 содержат указанные биспецифические белки в восстанавливающих условиях. Дорожки 4-6 содержат те же белки в невосстанавливающих условиях. A=h3D1(VH-CH1)-hFc-hCD3(VL-VH) + h3D1(VL-CL); B=h7B8-1(VH-CH1)-mhFc-hCD3(VL-VH) + h7B8-1(VL-CL); D=h3D1(VH-VL)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv.

Фиг.3: Оценка связывания биспецифического антитела с антигеном MUC1-C на клетках гормон-зависимого рака молочной железы ZR-75-1 посредством проточной цитометрии. Клетки инкубировали с 4 мкг/мл тестируемого антитела или изотипического контрольного IgG1-антитела в течение 60 минут, а затем с соответствующим вторичным антителом. Связывание антитела с клеточной поверхностью анализировали с использованием проточной цитометрии. Определяли связывание биспецифического антитела h3D1-hCD3 с MUC1-C на поверхности клеток линии аденокарциномы молочной железы ZR75-1. Совпадающие по изотипу IgG1 и h3D1 человека использовали в качестве отрицательного и положительного контроля связывания, соответственно.

Фиг.4: Оценка связывания биспецифической антительной конструкции с CD3 на линии Т-клеток Jurkat посредством проточной цитометрии. Связывание биспецифической антительной конструкции h3D1-hCD3 с CD3 на линии Т-клеток Jurkat. Совпадающий по изотипу IgG1 человека и антитело против hCD3 использовали в качестве отрицательного и положительного контроля связывания, соответственно.

Фиг.5А-С: активация Т-клеток посредством биспецифических антител. Клетки-мишени высевали в среду для роста в 96-луночной планшете и инкубировали в течение ночи. К клеткам добавляли различные концентрации биспецифических антител (указаны), а затем эффекторные клетки TCR/CD3 (NFAT-Jurkat) и инкубировали в течение 6 ч. Добавляли реагент Bio-Glo™ и люминесценцию количественно определяли с использованием устройства для считывания Molecular Devices FilterMax F5. Данные аппроксимировали к кривой 4PL с использованием программного обеспечения GraphPad

Prism. (Фиг.5А) ZR-75-1, клетки аденокарциномы молочной железы (10000 клеток/лунка), обработанные указанными биспецифическими антителами, начиная с 20 мкг/мл, с 2-кратными серийными разведениями, и NFAT-Jurkat, 100000 клеток/лунка. (Фиг.5В) Клетки аденокарциномы молочной железы ZR-75-1 (40000 клеток/лунка), обработанные указанными биспецифическими антителами, начиная с 30 мкг/мл, с 3-кратными серийными разведениями, и NFAT-Jurkat, 100000 клеток/лунка. (Фиг.5С) НСТ116, экспрессирующие MUC1 (НСТ/MUC1), или клетки с вектором (НСТ116/вектор) (10000 клеток/лунка), обработанные указанными биспецифическими антителами, начиная с 10 мкг/мл, с 3-кратными серийными разведениями, и NFAT-Jurkat, 100000 клеток/лунка.

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Авторы изобретения получили мультиспецифические антительные конструкции со специфичностью связывания в отношении неотделяющейся части из 58 аминокислот наружного домена белка MUC1-C, а также в отношении по меньшей мере одной и необязательно двух других мишеней связывания. Такие конструкции также могут быть сконструированы таким образом, чтобы они обладали специфичностью связывания с множеством эпитопов MUC1-C. Эти антитела продемонстрировали способность стимулировать Т-клетки и, таким образом, являются пригодными для лечения MUC1-связанных злокачественных опухолей. Эти и другие аспекты изобретения более подробно описаны ниже.

I. MUC1

A. Структура

MUC1 представляет собой гликопротеин типа муцина, который экспрессируется на апикальных краях нормальных секреторных эпителиальных клеток (Kufe *et al.*, 1984). MUC1 образует гетеродимер после синтеза в качестве единого полипептида и расщепления предшественника на две субъединицы в эндоплазматической сети (Ligtenberg *et al.*, 1992). Расщепление может опосредоваться аутокаталитическим процессом (Levitan *et al.*, 2005). N-концевая субъединица (MUC1-N) MUC1 размером >250 кДа содержит различные количества tandemных повторов из 20 аминокислот, которые имеют несоответствия с высококонсервативными изменениями и модифицированы O-связанными гликанами (Gendler *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1988). MUC1-N связывается с клеточной поверхностью посредством димеризации с C-концевой субъединицей (MUC1-C) размером ~23 кДа, которая включает внеклеточную область из 58 аминокислот, трансмембранный домен из 28 аминокислот (подчеркнут) и цитоплазматический домен из 72 аминокислот (CD; полужирный шрифт) (Merlo *et al.*, 1989). Именно с частью из 58 аминокислот MUC1-C/ECD (курсив) связываются антитела по настоящему изобретению. Последовательность MUC1-C человека представлена ниже:

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGAGV
PGWGIALLVLCVLAIVYLI~~ALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHT~~
HGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL (SEQ ID NO: 1)

Выделенной полужирным шрифтом последовательностью указан CD, и

подчеркнутая часть представляет собой олигомерный ингибирующий пептид. При трансформации нормального эпителия в карциномы MUC1 абберрантно сверхэкспрессируется в цитозоле и по всей клеточной мембране (Kufe *et al.*, 1984; Perey *et al.*, 1992). Ассоциированный с клеточной мембраной MUC1 нацеливается в эндосомы посредством клатрин-опосредуемого эндоцитоза (Kinlough *et al.*, 2004). Кроме того, MUC1-С, но не MUC1-N, нацеливается 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-С взаимодействует с представителями семейства рецепторов ErbB (Li *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2003c; Schroeder *et al.*, 2001) и с эффектором Wnt β -катенином (Yamamoto *et al.*, 1997). Рецептор эпидермального фактора роста и c-Src фосфорилирует цитоплазматический домен MUC1 (MUC1-CD) на Y-46 и, тем самым, повышает связывание MUC1 и β -катенина (Li *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2001b). Связывание MUC1 и β -катенина также регулируется киназой гликогенсинтазы 3 β и протеинкиназой C δ (Li *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2002). MUC1 совместно локализуется с β -катенином в ядре (Baldus *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003a; Li *et al.*, 2003c; Wen *et al.*, 2003) и совместно активирует 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, сверхэкспрессия MUC1-С является достаточной для индукции независимого от закоривания роста и способности вызывать опухоли (Huang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003b; Ren *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2004).

II. Производство моноклональных антител

А. Основные способы

Антитела к MUC1-С/ECD могут быть получены стандартными способами, как хорошо известно в данной области (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; патент США 4196265). Способы получения моноклональных антител (MAb), как правило, начинаются с тех же линий, что и способы получения поликлональных антител. Первой стадией обоих из этих способов является иммунизация соответствующего хозяина или идентификация индивидуумов, которые являются иммунными вследствие предшествующей природной инфекции. Как хорошо известно в данной области, данная композиция для иммунизации может варьироваться в отношении ее иммуногенности. Таким образом, часто является необходимым усиление иммунной системы хозяина, что может быть достигнуто путем присоединения пептидного или полипептидного иммуногена к носителю. Иллюстративными и предпочтительными носителями являются гемоцианин лимфы улитки (KLH) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Также в качестве носителей можно использовать другие альбумины, такие как овальбумин, сывороточный альбумин мыши или сывороточный альбумин кролика. Средства для конъюгации полипептида с белом-носителем хорошо известны в данной области и включают глутаральдегид, м-малеимидобенкоил-N-гидроксисукцинимидный

сложный эфир, карбодиимид и бис-диазотированный бензидин. Как также хорошо известно в данной области, иммуногенность конкретной иммуногенной композиции может быть усилена путем применения неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Иллюстративные и предпочтительные адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (неспецифический стимулятор иммунного ответа, содержащий убитые *Mycobacterium tuberculosis*), неполные адъюванты Фрейнда и адъювант на основе гидроксида алюминия.

Количество иммуногенной композиции, используемое для получения поликлональных антител, варьируется в зависимости от природы иммуногена, а также от животного, используемого для иммунизации. Для введения иммуногена можно использовать разные пути (подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутривенный и внутрибрюшинный). Мониторинг продуцирования поликлональных антител можно проводить путем взятия образца крови иммунизированного животного в разные моменты времени после иммунизации. Также можно проводить вторую бустерную инъекцию. Процесс введения бустерной инъекции и титрования можно повторять до тех пор, пока не будет достигнут подходящий титр. Когда достигают желаемого уровня иммуногенности, у иммунизированного животного можно проводить взятие крови и сыворотку выделять и хранить, и/или животное можно использовать для получения МАб.

После иммунизации соматические клетки с потенциалом к продуцированию антител, в частности, В-лимфоциты (В-клетки), отбирают для применения в протоколе получения МАб. Эти клетки могут быть получены из биоптатов селезенки или лимфатических узлов, или из циркулирующей крови. Затем продуцирующие антитела В-лимфоциты от иммунизированного животного подвергают слиянию с бессмертными миеломными клетками, как правило, того же вида, что и животное, которое было иммунизировано, или клетками человека или химерными клетками человека/мыши. Миеломные клеточные линии, пригодные для применения в методиках слияния для продуцирования гибридом, предпочтительно являются не продуцирующими антитела, имеют высокую эффективность слияния, и обладают дефицитом ферментов, которые делают их неспособными расти в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только желаемых слитых клеток (гибридомы).

Можно использовать любое количество миеломных клеток, как известно специалистам в данной области (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). Например, когда иммунизированным 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; и все из U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6 являются пригодными применительно к слиянию клеток человека. Одной конкретной клеткой миеломы мыши является линия клеток миеломы NS-1 (также называемая P3-NS-1-Ag4-1), которая свободно доступна от NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository по запросу депозита клеточной линии под номером GM3573. Другой клеточной линией миеломы

мышь, которая может использоваться, является резистентная к 8-азагуанину непродуцирующая клеточная линия миеломы мыши SP2/0. Позднее были описаны дополнительные линии партнеров по слиянию для применения с В-клетками человека, включая KR12 (ATCC CRL-8658; K6H6/B5 (ATCC CRL-1823 SHM-D33 (ATCC CRL-1668) и НММА2.5 (Posner *et al.*, 1987). Антитела по настоящему изобретению были получены с использованием клеточной линии SP2/0/mIL-6, IL-6-секретирующего производного линии SP2/0.

Способы получения гибридов продуцирующих антитела клеток селезенки и лимфатических узлов обычно включают смешение соматических клеток с миеломными клетками в соотношении 2:1, хотя соотношение может варьироваться от приблизительно 20:1 до приблизительно 1:1, соответственно, в присутствии агента или агентов (химических или электрических), которые способствуют слиянию клеточных мембран. Способы слияния с использованием вируса Сендай описаны Kohler and Milstein (1975; 1976), и способы с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), такого как 37% (об./об.) ПЭГ, описаны Gefter *et al.* (1977). Также является пригодным применение способов электрически индуцируемого слияния (Goding, pp. 71-74, 1986).

В процедурах слияния жизнеспособные гибриды обычно образуются с низкой частотой, приблизительно от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} . Однако это не является проблемой, поскольку жизнеспособные слитые гибриды дифференцируются из парентеральных инфузировавшихся клеток (в частности, инфузировавшихся клеток миеломы, которые в норме продолжают делиться неопределенно долго) путем культивирования в селективной среде. Селективная среда, как правило, представляет собой среду, которая содержит средство, которое блокирует синтез *de novo* нуклеотидов 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, в то время как азасерин блокирует только синтез пуринов. Когда используют аминоптерин или метотрексат, среду дополняют гипоксантином и тимидином в качестве источника нуклеотидов (среда HAT). Когда используют азасерин, среду дополняют гипоксантином. Убаин добавляют, если источником В-клеток является линия В-клеток человека, трансформированная вирусом Эпштейна-Барр (EBV), для устранения линий, трансформированных EBV, которые не слиты с миеломой.

Предпочтительной селективной средой является HAT или HAT с убаином. Только клетки, в которых функциональны пути реутилизации нуклеотидов, способны выжить в среде HAT. Миеломные клетки являются дефектными в отношении ключевых ферментов пути реутилизации, например, гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRF), и они не могут выживать. В-клетки могут использовать этот путь, однако они имеют ограниченную продолжительность жизни в культуре и, как правило, погибают в пределах приблизительно двух недель. Таким образом, единственными клетками, которые могут выжить в селективной среде, являются гибриды, образованные из миеломных и В-клеток. Когда источником В-клеток, используемым для слияния, является линия EBV-

трансформированных В-клеток, уабаин также используется для селекции с лекарственным веществом гибридов, поскольку EBV-трансформированные В-клетки являются чувствительными к уничтожению лекарственным веществом, в то время как используемый миеломный партнер выбирают так, чтобы он был резистентным к уабаину.

Культивирование обеспечивает популяцию гибридом, из которой отбирают конкретные гибридомы. Как правило, отбор гибридом проводят путем культивирования клеток посредством разведения до единичных клонов в микропланшетах для титрования с последующим тестированием индивидуальных супернатантов клонов (после приблизительно двух-трех недель) в отношении желаемой реактивности. Анализ должен быть чувствительным, простым и быстрым, таким как радиоиммунный анализ, ферментный иммуноанализ, анализ цитотоксичности, анализ бляшкообразования, дот-блоттинг и т.п.

Затем отобранные гибридомы подвергают серийному разведению или сортировке единичных клеток посредством проточно-цитометрической сортировки и клонируют в индивидуальные продуцирующие антитела клеточные линии, а затем эти клоны могут быть увеличены в количестве неопределенно долго для получения mAb. Клеточные линии могут быть использованы для продуцирования MAб двумя основными способами. Образец гибридомы может быть инъецирован (часто в брюшную полость) животному (например, мыши). Необязательно, животным проводят первичную иммунизацию углеводородом, особенно маслами, такими как пристан (тетраметилпентадекан) перед инъекцией. Когда гибридомы человека используют таким образом, является оптимальной инъекция иммунодефицитным мышам, таким как мыши SCID, для предупреждения отторжения опухоли. У животного после инъекции развиваются опухоли, секретирующие специфическое моноклональное антитело, продуцируемое слитым клеточным гибридом. Затем жидкости организма животного, такие как сыворотка или асцитная жидкость, могут быть отобраны для получения Mab в высокой концентрации. Индивидуальные клеточные линии также можно культивировать *in vitro*, где Mab естественным образом секретируются в культуральную среду, из которой они могут быть без труда получены в высоких концентрациях. Альтернативно, гибридомные клеточные линии человека можно использовать *in vitro* для продуцирования иммуноглобулинов в клеточном супернатанте. Клеточные линии могут быть адаптированы для роста в бессывороточной среде для оптимизации возможности выделения моноклональных иммуноглобулинов человека, имеющих высокую чистоту.

Mab, продуцированные любым из способов, могут быть далее очищены, если желательно, с использованием фильтрации, центрифугирования и различных способов хроматографии, таких как FPLC или аффинная хроматография. Фрагменты моноклональных антител по изобретению могут быть получены из очищенных моноклональных антител способами, которые включают расщепление ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или путем расщепления дисульфидных связей посредством химического восстановления. Альтернативно фрагменты моноклональных

антител, охватываемые настоящим изобретением, могут быть синтезированы с использованием автоматизированного устройства для синтеза пептидов.

Также предусматривается, что для получения моноклональных антител может использоваться подход молекулярного клонирования. Для этого РНК может быть выделена из гибридной линии, и гены антител получены посредством ОТ-ПЦР и клонированы в экспрессирующий вектор иммуноглобулина. Альтернативно комбинаторные фагмидные библиотеки иммуноглобулинов получают из РНК, выделенной из клеточных линий, и фагмиды, экспрессирующие соответствующие антитела, отбирают посредством пэннинга с использованием вирусных антигенов. Преимуществами этого подхода над общепринятыми способами гибридом является то, что приблизительно в 10^4 раз больше антител может быть получено и подвергнуто скринингу в одном раунде, и что новые специфичности получают путем комбинирования цепей Н и L, что далее повышает вероятность нахождения подходящих антител.

Другие патенты США, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки, в которых описано продуцирование антител, пригодных в рамках настоящего изобретения, включают патент США 5565332, в котором описано продуцирование химерных антител с использованием комбинаторного подхода; патент США 4816567, в котором описано получение рекомбинантных иммуноглобулинов; и патент США 4867973, в котором описаны конъюгаты антитело-терапевтическое средство.

В. Антитела по настоящему изобретению

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть определяться, в первую очередь, их специфичностью связывания, которая в этом случае направлена на MUC1-C/ECD, и, в частности:

SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQS
GAG (SEQ ID NO: 2). Специалисты в данной области, посредством оценки специфичности/аффинности связывания данного антитела с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, могут определить, входят ли такие антитела в объем настоящей формулы изобретения.

В одном варианте осуществления конструкция антитела сохраняет последовательности изотипа G иммуноглобулина (IgG). Составляя приблизительно 75% сывороточных иммуноглобулинов у человека, IgG является наиболее распространенным изотипом антител, встречающимся в кровотоке. Молекулы IgG синтезируются и секретируются плазматическими В-клетками. Существует четыре подкласса IgG (IgG1, 2, 3, и 4) у человека, названных по их распространенности в сыворотке (IgG1 является наиболее распространенным). Они имеют диапазон аффинности в отношении Fc-рецептора от высокой до ее отсутствия.

IgG является основным изотипом антител, встречающимся в крови и внеклеточной жидкости, что позволяет ему контролировать инфекцию тканей организма. Путем связывания многих типов патогенов, представленных вирусами, бактериями и грибами, IgG защищает организм от инфекции. Он осуществляет это посредством нескольких

иммунных механизмов: IgG-опосредуемое связывание патогенов вызывает их иммобилизацию и связывание посредством агглютинации; покрытие IgG поверхностей патогенов (известное как опсонизация) позволяет их распознавание и поглощение фагоцитарными иммунными клетками; IgG активирует классический путь системы комплемента - каскад продуцирования иммунных белков, который приводит к устранению патогена; IgG также связывает и нейтрализует токсины. IgG также играет важную роль в антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC) и внутриклеточном антитело-опосредуемом протеолизе, в ходе которого он связывается с TRIM21 (рецептор с наибольшей аффинностью к IgG у человека), чтобы направить отмеченные вирионы в протеасому в цитозоле. IgG также ассоциирован с гиперчувствительностью типа II и типа III. IgG-антитела образуются после переключения классов и созревания антительного ответа и, таким образом, они участвуют в основном во вторичном иммунном ответе. IgG секретируется в качестве мономера, который имеет малый размер, позволяя ему легко проходить в ткани. Он является единственным изотипом, который имеет рецепторы для облегчения прохождения через плаценту человека. Вместе с IgA, секретиремым в молоке молочной железы, остаточный IgG, проходящий через плаценту, обеспечивает новорожденному гуморальный иммунитет до развития его собственной иммунной системы. Молозиво содержит высокий процент IgG, особенно молозиво бычьих. У индивидуумов с предшествующим иммунитетом к патогену IgG появляется приблизительно через 24-48 часов после антигенной стимуляции.

Кроме того, заявленные в формуле изобретения настоящего описания антитела обладают по меньшей мере вторичной специфичностью связывания, а именно, связыванием с CD3, CD16, миелоид-специфическим антигеном, EGFR, ErbB2, TIL, CD3/PD1 или CD16/PD1. В другом аспекте антитела могут определяться последовательностями, которые определяют их специфичность связывания. Последовательности приведены в примерах, которые следуют далее.

Конкретные примеры антител, которые используются в рамках настоящего изобретения, представляют собой антитела, обозначаемые как 7B8-1 и 3D1, CDR которых указаны в таблице 1.

Таблица 1 - Последовательности CDR антительных конструкций

Оригинальное антитело	Тяжелая цепь	Легкая цепь
CDR1 GO-702 (7B8-1)	GFTFN ^Y FW SEQ ID NO: 3	CRASESVQYSGTSLMH SEQ ID NO: 4
CDR2 GO-702 (7B8-1)	ILPGTGST SEQ ID NO: 5	GASNVET SEQ ID NO: 6
CDR3 GO-702 (7B8-1)	RYDYTSSMDY SEQ ID NO: 7	QQNWKVPWT SEQ ID NO: 8
CDR1 3D1	NFWMN	RASQSIGTSH

	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
CDR2 3D1	QIYPGDGDTNYNGKFKG SEQ ID NO: 11	YASESIS SEQ ID NO: 12
CDR3 3D1	SYYRSAWFAY SEQ ID NO: 13	QQSNNWPLT SEQ ID NO: 14

Более того, последовательности антител могут быть изменены относительно последовательностей, приведенных выше, необязательно с использованием способов, более подробно рассмотренных ниже. Например, аминокислотные последовательности могут отличаться от аминокислотных последовательностей, указанных выше, тем, что (а) переменные области могут быть лишены константных доменов легких цепей, (b) аминокислоты могут отличаться от указанных аминокислот без значительного изменения химических свойств остатков (так называемые консервативные замены), (c) аминокислоты могут отличаться от аминокислот, указанных выше, на заданный процент, например, могут иметь гомологию 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Альтернативно, нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, могут (а) быть лишены константных доменов легких цепей, (b) отличаться от нуклеиновых кислот, указанных выше, без изменения остатков, кодируемых ими, (c) могут отличаться от нуклеиновых кислот, указанных выше, на данный процент, например, могут иметь гомологию 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или (d) отличаются от нуклеиновых кислот, указанных выше, способностью гибридизоваться в условиях высокой жесткости, иллюстрируемых условиями низкого содержания соли и/или высокой температуры, таких как условия, обеспечиваемые от приблизительно 0,02 М до приблизительно 0,15 М NaCl при температурах от приблизительно 50°C до приблизительно 70°C.

При проведении консервативных изменений аминокислотной последовательности можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот для сообщения биологической функции взаимодействия белку хорошо известна в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Является общепризнанным, что относительный гидропатический характер аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру конечного белка, которая в свою очередь определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

Также в данной области понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно проводить на основе гидрофильности. В патенте США 4554101, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, указано, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью его соседних аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка. Как подробно описано в патенте США 4554101, следующие величины гидрофильности присваиваются аминокислотным остаткам: основные аминокислоты: аргинин (+3,0), лизин (+3,0) и гистидин (-0,5); кислые

аминокислоты: аспарат ($+3,0 \pm 1$), глутамат ($+3,0 \pm 1$), аспарагин ($+0,2$) и глутамин ($+0,2$); гидрофильные неионные аминокислоты: серин ($+0,3$), аспарагин ($+0,2$), глутамин ($+0,2$) и треонин ($-0,4$), содержащие серу аминокислоты: цистеин ($-1,0$) и метионин ($-1,3$); гидрофобные неароматические аминокислоты: валин ($-1,5$), лейцин ($-1,8$), изолейцин ($-1,8$), пролин ($-0,5 \pm 1$), аланин ($-0,5$), и глицин (0); гидрофобные ароматические аминокислоты: триптофан ($-3,4$), фенилаланин ($-2,5$) и тирозин ($-2,3$).

Понятно, что аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, имеющей сходную гидрофильность, и может обеспечивать биологически или иммунологически модифицированный белок. При таких изменениях предпочтительной является замена аминокислот, чьи величины гидрофильности входят в пределы ± 2 , особенно предпочтительными являются замены в пределах ± 1 , и еще более предпочтительными являются замены в пределах $\pm 0,5$.

Как описано выше, аминокислотные замены, как правило, основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Иллюстративные замены, которые учитывают различные вышеуказанные характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и включают аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

С. Конструирование антительных конструкций

В различных вариантах осуществления можно выбрать конструирование последовательностей идентифицированных антител по разным причинам, таким как улучшенная экспрессия, увеличенная перекрестная реактивность, снижение связывания вне мишени или устранение одной или нескольких естественных эффекторных функций, таких как активация комплемента или привлечение иммунных клеток (например, Т-клеток). В частности, IgM-антитела можно конвертировать в IgG-антитела. Ниже приводится общее обсуждение представляющих интерес способов инженерии антител.

Гибридомы можно культивировать, а затем можно лизировать клетки и экстрагировать тотальную РНК. Можно использовать случайные гексамеры с RT для получения кДНК-копий РНК, а затем проводить ПЦР с использованием мультиплексной смеси ПЦР-праймеров, которые предположительно будут амплифицировать все переменные последовательности генов человека. ПЦР-продукт можно клонировать в вектор pGEM-T Easy, а затем последовательность подвергать автоматическому ДНК-секвенированию с использованием стандартных праймеров для вектора. Анализ связывания и нейтрализации можно проводить с использованием антител, собранных с гибридных супернатантов и очищенных посредством FPLC, с использованием колонок с белком G. Рекомбинантные полноразмерные IgG-антитела могут быть получены путем субклонирования ДНК Fv тяжелых и легких цепей из клонирующего вектора в плазмидный вектор pConIgG1 или pConK2 Lonza, трансфекции в клетки 293 Freestyle или клетки CHO Lonza, и сбора и очистки из супернатанта клеток CHO.

Быстрая доступность антитела, продуцируемого в той же клетке-хозяине и в том

же процессе культивирования клеток, что и конечный процесс продуцирования cGMP, имеет потенциал к снижению длительности программ разработки процессов. Lonza разработали универсальный способ с использованием объединенных трансфектантов, выращенных в среде CDACF, для быстрого продуцирования небольших количеств (вплоть до 50 г) антител в клетках CHO. Хотя она и является несколько более медленной, чем истинная временная система, преимущества включают более высокую концентрацию продукта и использование того же хозяина и процесса, что и для продуцирующей клеточной линии. Пример роста и продуктивности пулов GS-CHO, экспрессирующих модельное антитело, в одноразовом биореакторе: в культуре в биореакторе с одноразовым пакетом (рабочий объем 5 л), действующем в режиме с периодической подпиткой, был достигнут выход концентрации антитела 2 г/л в пределах 9 недель после трансфекции.

pCon VectorsTM являются простым способом реэкспрессии цельных антител. Векторы константной области представляют собой набор векторов, включающий диапазон векторов константной области иммуноглобулина, клонированных в векторы pEE. Эти векторы обеспечивают простое конструирование полноразмерных антител с константными областями человека и удобство системы GS SystemTM.

Может быть желательной "гуманизация" антител, продуцируемых в не являющихся человеком хозяевах, для ослабления какой-либо иммунной реакции при использовании в терапии у человека. Такие гуманизированные антитела могут быть исследованы в контексте *in vitro* или *in vivo*. Гуманизированные антитела могут быть получены, например, путем замены иммуногенной части антитела соответствующей, но не иммуногенной, частью (т.е. химерные антитела). Заявка PCT PCT/US86/02269; заявка EP 184187; заявка EP 171496; заявка EP 173494; заявка PCT WO 86/01533; заявка EP 125023; Sun *et al.* (1987); Wood *et al.* (1985); и Shaw *et al.* (1988); причем все из этих ссылок включены в настоящее описание в качестве ссылок. Общий обзор "гуманизированных" химерных антител представлен в Morrison (1985); также включенной в настоящее описание в качестве ссылки. "Гуманизированные" антитела альтернативно могут быть получены путем замены CDR или CEA. Jones *et al.* (1986); Verhoeven *et al.* (1988); Beidler *et al.* (1988); все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Настоящее изобретение предусматривает модификацию изотипа. Посредством модификации Fc-области так, чтобы она имела отличающийся изотип, может быть достигнута отличающаяся функциональность. Например, изменение на IgG₄ может снижать иммунные эффекторные функции, ассоциированные с другими изотипами.

Модифицированные антитела могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области, включая экспрессию посредством стандартных молекулярно-биологических способов или химический синтез полипептидов. Способы рекомбинантной экспрессии описаны в других частях настоящего описания.

D. Экспрессия

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению кодируют антитела,

необязательно соединенные с другими белковыми последовательностями. Как используют в настоящей заявке, термин "нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию антитела против MUC1-C", относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая выделена свободной от тотальной клеточной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителам, которые кодируются любыми из последовательностей, приведенных в настоящем описании.

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 по настоящему изобретению включают сегменты ДНК, кодирующие биологически функциональные эквивалентные белки и пептиды последовательностей, описанных выше. Такие последовательности могут появляться вследствие вырожденности кодонов и функциональной эквивалентности аминокислот, которые, как известно, встречаются в природе в последовательностях нуклеиновых кислот и белков, кодируемых таким образом. Альтернативно функционально эквивалентные

белки или пептиды могут быть созданы путем применения технологии рекомбинантных ДНК, в которой изменения белковой структуры могут быть внесены, исходя из предполагаемых свойств заменяемых аминокислот. Изменения, запланированные человеком, могут быть внесены с использованием способов сайт-направленного мутагенеза и могут быть внесены случайным образом и подвергнуты скринингу позже в отношении желаемой функции, как описано ниже.

В определенных вариантах осуществления экспрессирующие векторы используют для экспрессии ловушки лиганда MUC1-C для продуцирования и выделения полипептида, экспрессируемого с них. В других вариантах осуществления экспрессирующие векторы используют в генной терапии. Экспрессия требует, чтобы в векторах были предоставлены соответствующие сигналы, которые включают различные регуляторные элементы, такие как энхансеры/промоторы из источников, являющихся как вирусами, так и млекопитающими, которые запускают экспрессию представляющих интерес генов в клетках-хозяевах. Также предусматриваются элементы, предназначенные для оптимизации стабильности и способности к трансляции матричной РНК в клетках-хозяевах. Также предусматриваются условия для применения ряда основных селективных маркеров лекарственных средств для создания постоянных стабильных клеточных клонов, экспрессирующих продукты, а также элемент, который связывает экспрессию селективных маркеров лекарственных средств с экспрессией полипептида.

На протяжении настоящей заявки подразумевается, что термин "экспрессирующая конструкция" включает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт гена, в которой часть или вся кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты способна к транскрипции. Транскрипт может транслироваться в белок, но не должен. В определенных 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 представляющей интерес ген.

Термин "вектор" используют для указания на являющуюся носителем молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть встроена последовательность нуклеиновой кислоты для введения в клетку, где она может реплицироваться. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть "экзогенной", что означает, что она является чужеродной для клетки, в которую вводят вектор, или что последовательность является гомологичной последовательности в клетке, но находится в положении в нуклеиновой кислоте клетки-хозяина, в которой последовательность обычно не встречается. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаг, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC). Специалист в данной области должен быть хорошо подготовлен для конструирования вектора стандартными рекомбинантными способами, которые описаны в Sambrook *et al.* (1989) и Ausubel *et al.* (1994), обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Термин "экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере часть продукта гена, способную транскрибироваться. В некоторых случаях, молекулы РНК затем транслируются в белок, полипептид или пептид. В других случаях эти последовательности не транслируются, например, при продуцировании антисмысловых молекул или рибозимов. Экспрессирующие векторы могут содержать различные "последовательности контроля", которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к последовательностям контроля, которые направляют транскрипцию и трансляцию, векторы и экспрессирующие векторы могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции, и описаны ниже.

1. Регуляторные элементы

"Промотор" представляет собой последовательность контроля, которая является областью последовательности нуклеиновой кислоты, в которой контролируется инициация и скорость транскрипции. Она может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. Выражения "функционально расположенный", "функционально связанный", "под контролем" и "под транскрипционным контролем" означают, что промотор находится в правильном функциональном расположении и/или ориентации относительно последовательности нуклеиновой кислоты для контроля инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. Промотор может использоваться или может не использоваться совместно с "энхансером", который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, вовлеченной в активацию транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

Промотор может представлять собой промотор, ассоциированный в природе с геном или последовательностью, который может быть получен путем выделения 5'-некодирующих последовательностей, находящихся выше кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор может упоминаться как "эндогенный". Аналогично, энхансер может представлять собой энхансер, естественным образом ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты, находящийся либо ниже, либо выше, этой последовательности. Альтернативно определенные преимущества будут получены путем размещения сегмента кодирующей нуклеиновой кислоты под контролем рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который в норме не ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественном окружении.

Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, в норме не ассоциированному с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов и промоторы и энхансеры, выделенные из других прокариотических, вирусных или эукариотических клеток, и промоторы или энхансеры,

не являющиеся "встречающимися в природе", т.е. содержащие отличающиеся элементы отличающихся областей регуляции транскрипции и/или мутации, которые изменяют экспрессию. В дополнение к продуцированию последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров способами синтеза, последовательности могут быть получены с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦРTM, применительно к композициям, описанным в настоящем описании (см. патент США 4683202, патент США 5928906, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки). Более того, предусматривается, что также можно использовать последовательности контроля, которые запускают транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

Естественно, было бы важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в типе клеток, органелле и организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии хорошо известно использование промоторов, энхансеров и комбинаций типов клеток для экспрессии белков, например, см. Sambrook *et al.* (1989), включенную в настоящее описание в качестве ссылки. Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцибельными и/или пригодными в соответствующих условиях для обеспечения экспрессии на высоком уровне введенного сегмента ДНК, что является преимущественным для крупномасштабного продуцирования рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

В таблице 3 приводится несколько элементов/промоторов, которые можно использовать, в контексте настоящего изобретения для регуляции экспрессии гена. Подразумевается, что этот перечень не является исчерпывающим перечнем всех возможных элементов, вовлеченных в способствование экспрессии, но, только его иллюстрацией. В таблице 4 приводятся примеры индуцибельных элементов, которые являются областями последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут быть активированы в ответ на конкретный стимул.

ТАБЛИЦА 3	
Промотор и/или энхансер	
Промотор/энхансер	Ссылки
Тяжелая цепь иммуноглобулина	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
Легкая цепь иммуноглобулина	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T-клеточный рецептор	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990

ТАБЛИЦА 3	
Промотор и/или энхансер	
Промотор/энхансер	Ссылки
DQ α и/или DQ β HLA	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β -интерферон	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Интерлейкин-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Рецептор интерлейкина-2	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC класса II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC класса II HLA-DR α	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β -актин	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
Мышечная креатинкиназа (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Преальбумин (транстретин)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Эластаза I	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
Металлотеоинеин (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Коллагеназа	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
Альбумин	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α -фетобелок	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-глобин	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -глобин	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-NA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
Инсулин	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Молекула адгезии нервных клеток (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α_1 -антитрипаин	Latimer <i>et al.</i> , 1990
Гистон H2B (TH2B)	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Коллаген мышцы и/или типа I	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Глюкоза-регулируемые белки (GRP94 и GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Гормон роста крысы	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Амилоид A сыворотки человека (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989

ТАБЛИЦА 3	
Промотор и/или энхансер	
Промотор/энхансер	Ссылки
Тропонин I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Мышечная дистрофия Дюшенна	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Полиома	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell и/или Villarreal, 1988
Ретровирусы	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
Вирус папилломы	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos и/или Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
Вирус гепатита В	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Вирус иммунодефицита человека	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
Цитомегаловирус (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
Вирус лейкоза гиббонов	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

ТАБЛИЦА 4		
Индукцибельные элементы		
Элемент	Индуктор	Ссылки
МТ II	Форболовый сложный эфир (ТФА) Тяжелые металлы	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeill <i>et al.</i> , 1989
ММТВ (вирус опухоли молочных желез мыши)	Глюкокортикоиды	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β -интерферон	Поли-(rI)x Поли-(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Аденовирус 5 <u>E2</u>	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Коллагеназа	Форболовый сложный эфир (ТФА)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Стромелизин	Форболовый сложный эфир (ТФА)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Форболовый сложный эфир (ТФА)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Ген МХ мыши	Интерферон, Вирус болезни Ньюкасла	Hug <i>et al.</i> , 1988
Ген GRP78	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-макроглобулин	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Виментин	Сыворотка	Rittling <i>et al.</i> , 1989
Ген H-2kb МНС класса I	Интерферон	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, большой Т-антиген SV40	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Пролиферин	Форболовый сложный эфир-ТФА	Mordacq <i>et al.</i> , 1989

ТАБЛИЦА 3		
Промотор и/или энхансер		
Промотор/энхансер	Ссылки	
Фактор некроза опухоли	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Ген тиреостимулирующего гормона α	Гормон щитовидной железы	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

Типы тканеспецифических промоторов или элементов, а также способы анализа для охарактеризации их активности, хорошо известны в данной области. Примеры таких областей включают ген LIMK2 человека (Nomoto *et al.* 1999), ген рецептора 2 соматостатина (Kraus *et al.*, 1998), ген эпидидимального связывающего ретиноевую кислоту белка мыши (Lareyre *et al.*, 1999), CD4 человека (Zhao-Emonet *et al.*, 1998), коллаген альфа2 (XI) мыши (Tsumaki, *et al.*, 1998), ген рецептора дофамина D1A (Lee, *et al.*, 1997), ген инсулиноподобного фактора роста II (Wu *et al.*, 1997), эндотелиальная молекула адгезии тромбоцитов 1 человека (Almendro *et al.*, 1996). Также в рамках настоящего изобретения могут использоваться опухолеспецифические промоторы. Некоторые такие промоторы указаны в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5 - ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОМОТОРЫ-КАНДИДАТЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ

Тканеспецифический промотор	Злокачественные опухоли, в которых промотор активен	Нормальные клетки, в которых промотор активен
Карциноэмбриональный антиген (CEA)*	Большинство карцином ободочной и прямой кишки; 50% карцином легкого; 40-50% карцином желудка; большинство карцином поджелудочной железы; большинство карцином молочной железы	Слизистая оболочка толстой кишки; слизистая оболочка желудка; эпителий легких; эккринные потовые железы; клетки в семенниках
Простатспецифический антиген (PSA)	Большинство карцином предстательной железы	Эпителий предстательной железы
Вазоактивный пептид кишечника (VIP)	Большинство случаев немелкоклеточного рака легкого	Нейроны; лимфоциты; тучные клетки; эозинофилы
Сурфактантный белок А (SP-A)	Многие клетки	Пневмоциты типа II;

	аденокарциномы легкого	Клара
Человеческий гомолог achaete-scute (hASH)	Большинство случаев мелкоклеточного рака легкого	Нейроэндокринные клетки в легком
Муцин-1 (MUC1)**	Большинство аденокарцином (происходящие из любой ткани)	Эпителиальные клетки желез в молочной железе и в дыхательных, желудочно-кишечных и мочеполовых путях
Альфа-фетопроtein	Большинство случаев печеночно-клеточной карциномы; возможно многие случаи рака яичника	Гепатоциты (в определенных условиях); семенник
Альбумин	Большинство случаев печеночно-клеточной карциномы	Гепатоциты
Тирозиназа	Большинство случаев меланомы	Меланоциты; астроциты; шванновские клетки; некоторые нейроны
Тирозин-связывающий белок (TRP)	Большинство случаев меланомы	Меланоциты; астроциты, шванновские клетки; некоторые нейроны
Кератин 14	Предположительно многие случаи плоскоклеточного рака (например, рак головы и шеи)	Кератиноциты
EBV LD-2	Многие случаи плоскоклеточного рака головы и шеи	Кератиноциты верхнего отдела пищеварительного тракта
Глиальный фибриллярный кислый белок	Многие астроцитомы	Астроциты

(GFAP)		
Основной белок миелина (MBP)	Многие глиомы	Олигодендроциты
Тестикулоспецифический ангиотензин-конвертирующий фермент (тестикулоспецифический ACE)	Возможно, многие случаи рака	Сперматозоиды
Остеокальцин	Возможно, многие остеосаркомы	Остеобласты
E2F-регулируемый промотор	Практически все злокачественные опухоли	Пролиферирующие клетки
HLA-G	Многие случаи карциномы ободочной и прямой; многие случаи меланомы; возможно, многие другие злокачественные опухоли	Лимфоциты; моноциты; сперматоциты; трофобласт
FasL	Большинство случаев меланомы; многие случаи карцином поджелудочной железы; большинство астроцитом, возможно, многие другие злокачественные опухоли	Активированные лейкоциты; нейроны; эндотелиальные клетки; кератиноциты; клетки в иммунопривилегированных тканях; некоторые клетки в легких, яичниках, печени и предстательной железе
Мус-регулируемый промотор	Большинство случаев карциномы легкого (как мелкоклеточной, так и немелкоклеточной); большинство случаев карциномы ободочной и	Пролиферирующие клетки (только некоторые типы клеток): эпителиальные клетки молочной железы (в том числе

	прямой кишки	непролиферирующие)
MAGE-1	Многие случаи меланомы; некоторые случаи немелкоклеточной карциномы легких; некоторые карциномы молочной железы	Семенник
VEGF	70% всех злокачественных опухолей (конститутивная сверхэкспрессия во многих злокачественных опухолях)	Клетки в областях неоваскуляризации (но, в отличие от опухолей, экспрессия является временной, менее выраженной, и никогда не является конститутивной)
bFGF	Предположительно, многие различные злокачественные опухоли, поскольку экспрессия bFGF индуцируется ишемическими условиями	Клетки в областях ишемии (но, в отличие от опухолей, экспрессия является временной, менее выраженной, и никогда не является конститутивной)
COX-2	Большинство случаев карциномы ободочной и прямой кишки; многие случаи карциномы легкого; возможно, многие другие злокачественные опухоли	Клетки в областях воспаления
IL-10	Большинство случаев карциномы ободочной и прямой кишки; многие случаи карциномы	Лейкоциты

	легкого; многие случаи плоскоклеточного рака головы и шеи; возможно, многие другие злокачественные опухоли	
GRP78/BiP	Предположительно, многие разные злокачественные опухоли, поскольку экспрессия GRP7S индуцируется опухолеспецифическими условиями	Клетки в областях ишемии
Элементы CarG из Egr-1	Индукцируется ионизирующим излучением, так что, гипотетически, большинство опухолей при облучении	Клетки, подвергнутые воздействию ионизирующего излучения; лейкоциты

Также для эффективной трансляции кодирующих последовательностей может потребоваться определенный иницирующий сигнал. Эти сигналы включают кодон инициации ATG или соседние последовательности. Также может потребоваться предоставление экзогенных сигналов контроля трансляции, включая кодон инициации ATG. Специалист в данной области без труда способен определить это и предоставить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться "в рамке считывания" с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть либо природными, либо синтетическими. Эффективность экспрессии может быть усилена путем включения соответствующих энхансерных транскрипционных элементов.

2. IRES

В определенных вариантах осуществления изобретения используют элементы участков внутренней посадки рибосомы (IRES) для создания мультигенных, или полицистронных, транскриптов. Элементы IRES способны обходить модель сканирования рибосомы при зависимой от 5'-метилированного кэпа трансляции и начинают трансляцию во внутренних участках (Pelletier and Sonenberg, 1988). Были описаны элементы IRES из

двух представителей семейства пикорнавирусов (полимиелит и энцефаломиокардит) (Pelletier and Sonenberg, 1988), также как и IRES из транскриптов млекопитающих (Masejak and Sarnow, 1991). Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. Множество открытых рамок считывания могут транскрибироваться вместе с разделением в каждом случае посредством IRES, создавая множество полицистронных транскриптов. Посредством элемента IRES каждая открытая рамка считывания является доступной для рибосом для эффективной трансляции. Множество генов могут быть эффективно экспрессированы с использованием единого промотора/энхансера для транскрипции единого транскрипта (см. патенты США 5925565 и 5935819, включенные в настоящее описание в качестве ссылок).

3. Многофункциональные участки клонирования

Векторы могут включать участок множественного клонирования (MCS), который представляет собой участок нуклеиновой кислоты, который содержит множество участков для ферментов рестрикции, любой из которых может использоваться совместно со стандартной рекомбинантной технологией для расщепления вектора. См. Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, и Cosca, 1997, включенную в настоящее описание в качестве ссылки. "Расщепление ферментом рестрикции" относится к каталитическому расщеплению молекулы нуклеиновой кислоты ферментом, который функционирует только в конкретных положениях в молекуле нуклеиновой кислоты. Многие из этих ферментов рестрикции являются коммерчески доступными. Использование таких ферментов хорошо понятно специалистам в данной области. Часто вектор линеаризуют или фрагментируют с использованием фермента рестрикции, который расщепляет MCS, позволяя лигирование экзогенных последовательностей с вектором. "Лигирование" относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между двумя фрагментами нуклеиновой кислоты, которые могут быть или могут не быть соседними друг с другом. Способы, вовлекающие ферменты рестрикции и реакции лигирования, хорошо известны специалистам в области рекомбинантных технологий.

4. Участки сплайсинга

Большинство транскрибируемых молекул эукариотической РНК претерпевают сплайсинг РНК для устранения интронов из первичных транскриптов. Векторы, содержащие геномные эукариотические последовательности, могут потребовать донорных и/или акцепторных участков сплайсинга, чтобы обеспечить надлежащий процессинг транскрипта для экспрессии белка (см. Chandler *et al.*, 1997, включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

5. Сигналы терминации

Векторы или конструкции по настоящему изобретению, как правило, содержат по меньшей мере один сигнал терминации. "Сигнал терминации" или "терминатор" включает последовательности ДНК, вовлеченные в специфическую терминацию РНК-транскрипта РНК-полимеразой. Таким образом, в определенных вариантах осуществления предусматривается сигнал терминации, который оканчивает продуцирование РНК-

транскрипта. Терминатор может быть необходимым *in vivo* для достижения желаемых уровней транскрипта.

В эукариотических системах область терминатора также может содержать специфические последовательности ДНК, которые позволяют сайт-специфическое расщепление нового транскрипта, экспонируя участок полиаденилирования. Это дает сигнал специализированной эндогенной полимеразе к присоединению участка из приблизительно 200 остатков А (поли-А) на 3'-конце транскрипта. Молекулы РНК, модифицированные этой поли-А-хвостовой частью, по-видимому, являются более стабильными и транслируются более эффективно. Таким образом, в других вариантах осуществления, вовлекающих эукариоты, является предпочтительным, чтобы терминатор содержал сигнал для расщепления РНК, и, более предпочтительно, чтобы сигнал терминатора способствовал полиаденилированию транскрипта. Элементы терминатора и/или участка полиаденилирования могут служить для повышения уровней транскрипта и/или для минимизации прочтения кассеты в другие последовательности.

Терминаторы, предусматриваемые для применения в рамках изобретения, включают любой известный терминатор транскрипции, описанный в настоящем описании или известный специалисту в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, например, последовательности терминации генов, например, такие как терминатор гормона роста бычьих или вирусные последовательности терминации, например, такие как SV40. В определенных вариантах осуществления сигнал терминации может быть лишен транскрибируемой или транслируемой последовательности, например, вследствие укорочения последовательности.

6. Сигналы полиаденилирования

При экспрессии, в частности, эукариотической экспрессии, обычно включают сигнал полиаденилирования для обеспечения надлежащего полиаденилирования транскрипта. Полагают, что природа сигнала полиаденилирования не является ключевой для успешного применения настоящего изобретения на практике и/или можно использовать любую такую последовательность. Предпочтительные варианты осуществления включают сигнал полиаденилирования SV40 и/или сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, являющиеся удобными и/или известными тем, что они хорошо функционируют в различных клетках-мишенях. Полиаденилирование может увеличивать стабильность транскрипта или может облегчать цитоплазматический транспорт.

7. Ориджины репликации

Для увеличения вектора в количестве к клетке-хозяину, он может содержать один или несколько участков ориджина репликации (часто называемых "ori"), которые представляют собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, в которой инициируется репликация. Альтернативно можно использовать автономно реплицирующуюся последовательность (ARS), если хозяином являются дрожжи.

8. Поддающиеся селекции и скринингу маркеры

В определенных вариантах осуществления изобретения клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, могут быть идентифицированы *in vitro* или *in vivo* путем включения маркера в экспрессирующий вектор. Такие маркеры могут обеспечивать поддающееся идентификации изменение клетки, позволяющее легкую идентификацию клеток, содержащих экспрессирующий вектор. Как правило, селективный маркер представляет собой маркер, который сообщает свойство, которое позволяет селекцию. Позитивный селективный маркер представляет собой маркер, где присутствие маркера позволяет его селекцию, в то время как негативный селективный маркер представляет собой маркер, где его присутствие препятствует его селекции. Примером позитивного селективного маркера является маркер резистентности к лекарственному средству.

Обычно включение маркера для селекции с лекарственным средством облегчает клонирование и идентификацию трансформантов, например, пригодными селективными маркерами являются гены, которые сообщают резистентность к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу. В дополнение к маркерам, сообщающим фенотип, который позволяет различение трансформантов на основе выполнения условий, также предусматриваются другие типы маркеров, включающие поддающиеся скринингу маркеры, такие как GFP, в основе которых лежит колориметрический анализ. Альтернативно, можно использовать поддающиеся скринингу ферменты, такие как тимидинкиназа (*tk*) вируса простого герпеса или хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Специалисту в данной области также будет известно, как использовать иммунологические маркеры, возможно совместно с FACS-анализом. Предположительно, используемый маркер не является важным при условии, что он способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Другие примеры поддающихся селекции или скринингу маркеров хорошо известны специалисту в данной области.

9. Вирусные векторы

Способность определенных вирусных векторов эффективно инфицировать или проникать в клетки, интегрироваться в геном клетки-хозяина и стабильно экспрессировать вирусные гены, позволила разработку и применение ряда различных систем на основе вирусных векторов (Robbins *et al.*, 1998). В настоящее время разрабатываются вирусные системы для применения в качестве векторов для переноса генов *ex vivo* и *in vivo*. Например, векторы на основе аденовируса, вируса простого герпеса, ретровируса и аденоассоциированного вируса оценивают в настоящее время для лечения заболеваний, таких как кистозный фиброз, болезнь Гоше, заболевание почек и артрит (Robbins and Ghivizzani, 1998; Imai *et al.*, 1998; патент США 5670488). Различные вирусные векторы, описанные ниже, имеют определенные преимущества и недостатки в зависимости от конкретного генно-терапевтического применения.

Аденовирусные векторы. В конкретных вариантах осуществления предусматривается аденовирусный экспрессирующий вектор для доставки

экспрессирующих конструкций. Подразумевается, что "аденовирусный экспрессирующий вектор" включает конструкции, содержащие аденовирусные последовательности, достаточные для (а) поддержания упаковывания конструкции и (б) в итоге тканеспецифической или клеточно-специфической экспрессии конструкции, клонированной в него.

Аденовирусы содержат линейную двухцепочечную ДНК с размером генома в диапазоне от 30 до 35 т.п.н. (Reddy *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1997; Chillon *et al.*, 1999). Аденовирусный экспрессирующий вектор согласно настоящему изобретению включает генно-модифицированную форму аденовируса. Преимущества аденовирусного генного переноса включают способность к инфицированию широкого множества типов клеток, включая неделящиеся клетки, геном среднего размера, простоту манипулирования, высокую инфекционность и способность расти до высоких титров (Wilson, 1996). Кроме того, аденовирусная инфекция клеток-хозяев не приводит к хромосомной интеграции, поскольку аденовирусная ДНК может реплицироваться эпизодно без потенциальной генотоксичности, ассоциированной с другими вирусными векторами. Аденовирусы также являются структурно стабильными (Marienfeld *et al.*, 1999) и после масштабной амплификации не выявлялось реарранжировки генома (Parks *et al.*, 1997; Bett *et al.*, 1993).

Характерными признаками аденовирусного генома являются ранняя область (гены E1, E2, E3 и E4), промежуточная область (ген pIX, ген Iva2), поздняя область (гены L1, L2, L3, L4 и L5), большой поздний промотор (MLP), инвертированные концевые повторы (ITR) и последовательность ψ (Zheng, *et al.*, 1999; Robbins *et al.*, 1998; Graham and Prevec, 1995). Ранние гены E1, E2, E3 и E4 экспрессируются вирусом после инфекции и кодируют полипептиды, которые регулируют экспрессию вирусных генов, экспрессию клеточных генов, репликацию вируса и ингибирование клеточного апоптоза. Далее, в ходе вирусной инфекции MLP активируется, вызывая экспрессию поздних (L) генов, кодирующих полипептиды, требуемые для инкапсидирования аденовируса. Промежуточная область кодирует компоненты аденовирусного капсида. Аденовирусные инвертированные концевые повторы (ITR; 100-200 п.н. в длину) представляют собой цис-элементы, и они функционируют в качестве ориджинов репликации и необходимы для репликации вирусной ДНК. Последовательность ψ необходима для упаковывания генома аденовируса.

Распространенным подходом для получения аденовирусов для применения в качестве векторов для переноса генов является делеция гена E1 (E1⁻), который вовлечен в индукцию промоторов E2, E3 и E4 (Graham and Prevec, 1995). Затем, терапевтический ген или гены могут быть встроены рекомбинантными способами вместо гена E1, где экспрессия терапевтического гена(ов) запускается промотором E1 или гетерологичным промотором. Затем E1⁻, репликационно-дефектный вирус, подвергают пролиферации в клеточной линии-"помощнике", которая предоставляет полипептиды E1 в транс-формате (например, линия клеток почки эмбриона человека 293). Таким образом, в рамках настоящего изобретения может быть удобным введение трансформирующей конструкции в положении, где последовательности, кодирующие E1, удалены. Однако положение

встраивания конструкции в аденовирусных последовательностях не является критически важным для изобретения. Альтернативно, область E3, участки области E4, или и те, и другие, могут быть удалены, где гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты под контролем промотора, функционального в эукариотических клетках, встраивают в геном аденовируса для применения в переносе генов (патент США 5670488; патент США 5932210, каждый из которых прямо включен в настоящее описание в качестве ссылок).

Хотя векторы на основе аденовируса обеспечивают несколько уникальных преимуществ над другими векторными системами, они часто ограничены иммуногенностью вектора, ограничениями размера для встраивания рекомбинантных генов и низкими уровнями репликации. Получение рекомбинантного аденовирусного вектора с делецией всех рамок считывания, содержащего полноразмерный ген дистрофина и концевые повторы, требуемые для репликации (Haescker *et al.*, 1996), обеспечивает несколько потенциально перспективных преимуществ с точки зрения вышеупомянутых недостатков аденовируса. Вектор выращивали до высокого титра с вирусом-помощником в клетках 293, и он был способен к эффективной трансдукции дистрофина у мышей mdx, в мышечных трубочках *in vitro* и мышечных волокнах *in vivo*. Зависимые от помощника вирусные векторы рассмотрены ниже.

Большое опасение при использовании аденовирусных векторов вызывает образование репликационно-компетентного вируса в ходе продуцирования вектора в упаковывающей клеточной линии или в ходе генной терапии индивидуума. Образование репликационно-компетентного вируса может нести в себе серьезную угрозу ненамеренной вирусной инфекции и патологических последствий для пациента. Armentano *et al.* (1990), описывают получение репликационно-дефектного аденовирусного вектора, у которого, согласно утверждению, устранена возможность ненамеренного образования репликационно-компетентного аденовируса (патент США 5824544, прямо включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Способ репликационно-дефектного аденовируса включает делецию области E1 и перемещение гена белка IX, где вектор экспрессирует гетерологичный ген млекопитающего.

Помимо требования, чтобы аденовирусный вектор был репликационно-дефектным, или по меньшей мере дефектным в зависимости от условий, предполагается, что природа аденовирусного вектора не является ключевой для успешного применения изобретения на практике. Аденовирус может относиться к любому из 42 различных известных серотипов и/или подгрупп А-F. Аденовирус типа 5 подгруппы С является предпочтительным исходным материалом для получения репликационно-дефектного в зависимости от условий аденовирусного вектора для применения в рамках настоящего изобретения. Это является следствием того, что аденовирус типа 5 представляет собой аденовирус человека, о котором имеется множество биохимической и генетической информации, и он исторически используется для большинства конструкций на основе аденовируса в качестве вектора.

Как указано выше, типичный вектор согласно настоящему изобретению является репликационно-дефектным и не имеет области E1 аденовируса. Рост аденовируса и манипулирование с ним известно специалистам в данной области, и для него был продемонстрирован широкий диапазон хозяев *in vitro* и *in vivo* (патент США 5670488; патент США 5932210; патент США 5824544). Эта группа вирусов может быть получена с высокими титрами, например, от 10^9 до 10^{11} бляшкообразующих единиц на мл, и они являются в высокой степени инфекционными. Жизненный цикл аденовируса не требует интеграции в геном клетки-хозяина. Чужеродные гены, доставляемые аденовирусными векторами, являются эписомальными, и, таким образом, имеют низкую генотоксичность для клеток-хозяев. Многие эксперименты, инновации, доклинические исследования и клинические испытания в настоящее время осуществляются в отношении применения аденовирусов в качестве векторов для генной доставки. Например, разрабатываются способы генной терапии на основе аденовирусной доставки для заболеваний печени (Han *et al.*, 1999), психиатрических заболеваний (Lesch, 1999), неврологических заболеваний (Smith, 1998; Hermens and Verhaagen, 1998), коронарных заболеваний (Feldman *et al.*, 1996), мышечных заболеваний (Petrof, 1998), желудочно-кишечных заболеваний (Wu, 1998) и различных злокачественных опухолей, таких как злокачественная опухоль ободочной и прямой кишки (Fujiwara and Tanaka, 1998; Dorai *et al.*, 1999), поджелудочной железы, мочевого пузыря (Irie *et 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 определенных вариантах осуществления изобретения предусматривается использование ретровирусов для доставки генов. Ретровирусы представляют собой РНК-вирусы, содержащие РНК-геном. Когда клетка-хозяин инфицируется ретровирусом, геномная РНК подвергается обратной транскрипции в промежуточную ДНК, которая интегрируется в хромосомную ДНК инфицированных клеток. Эта интегрированная промежуточная ДНК называется провирусом. Конкретным преимуществом ретровирусов является то, что они могут стабильно инфицировать делящиеся клетки представляющим интерес геном (например, терапевтический ген) путем встраивания в ДНК хозяина без экспрессии иммуногенных вирусных белков. Теоретически, интегрированный ретровирусный вектор будет сохраняться на протяжении жизни инфицированной клетки-хозяина, экспрессируя представляющий интерес ген.

Геном ретровируса и провирусная ДНК имеют три гена: gag, pol и env, которые фланкируются двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Ген gag кодирует внутренние структурные (матриксный, капсидный и нуклеокапсидный) белки; ген pol кодирует РНК-направленную ДНК-полимеразу (обратная транскриптаза) и ген env кодирует гликопротеины вирусной оболочки. 5'- и 3'-LTR способствуют транскрипции и полиаденилированию РНК вирионов. LTR содержит все другие цис-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса.

Рекомбинантный ретровирус по настоящему изобретению может быть генно-

модифицирован таким образом, чтобы некоторые из структурных инфекционных генов нативного вируса были удалены и заменены последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей доставке в клетку-мишень (патент США 5858744; патент США 5739018, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки). После инфицирования клетки вирусом вирус инъецирует свою нуклеиновую кислоту в клетку и ретровирусный генетический материал может интегрироваться в геном клетки-хозяина. Затем перенесенный ретровирусный генетический материал транскрибируется и транслируется в белки в клетке-хозяине. Как и в случае других вирусных векторных систем, образование репликационно-компетентного ретровируса в ходе продуцирования вируса или в ходе терапии вызывает серьезные опасения. Ретровирусные векторы, пригодные для применения в рамках настоящего изобретения, как правило, представляют собой дефектные ретровирусные векторы, которые способны инфицировать клетку-мишень, осуществлять обратную транскрипцию их РНК-геномов и интегрировать ДНК после обратной транскрипции в геном клетки-мишени, но неспособны к репликации в клетке-мишени с образованием инфекционных ретровирусных частиц (например, ретровирусный геном, трансфицированный в клетку-мишень, является дефектным в отношении *gag* - гена, кодирующего структурные белки вириона, и/или *pol* - гена, кодирующего обратную транскриптазу). Таким образом, транскрипция провируса и сборка в инфекционный вирус происходит в присутствии соответствующего вируса-помощника или в клеточной линии, содержащей соответствующую последовательность, позволяющие инкапсидирование без сопутствующего продуцирования контаминирующего вируса-помощника.

Выращивание и поддержание ретровирусов известно в данной области (патент США 5955331; патент США 5888502, каждый из которых прямо включен в настоящее описание в качестве ссылки). Nolan *et al.* описывают продуцирование со стабильно высоким титром свободного от помощника ретровируса, содержащего гетерологичный ген (патент США 5830725, прямо включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Способы конструирования упаковывающих клеточных линий, пригодных для получения свободных от помощника рекомбинантных ретровирусов с амфотерными или экотропными диапазонами хозяев, а также способы применения рекомбинантных ретровирусов для введения представляющего интерес гена в эукариотические клетки *in vivo* и *in vitro*, предусматриваются настоящим изобретением (патент США 5955331).

В настоящее время, в большинстве из всех клинических испытаний для вектор-опосредуемой доставки генов используется доставка генов посредством ретровирусного вектора на основе вируса лейкоза мыши (MLV) (Robbins *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1993). Недостатки доставки ретровирусных генов включают необходимость в делении клеток на данный момент для стабильной инфекции и кодирующую емкость, которая препятствует доставке больших генов. Однако, недавняя разработка векторов, таких как векторы на основе лентивируса (например, ВИЧ), вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV), которые могут инфицировать определенные

неделяющиеся клетки, потенциально позволяет использование *in vivo* ретровирусных векторов для применения в генной терапии (Amado and Chen, 1999; Klimatcheva *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999; Case *et al.*, 1999). Например, векторы на основе ВИЧ используются для инфицирования неделящихся клеток, таких как нейроны (Miyatake *et al.*, 1999), островковые клетки (Leibowitz *et al.*, 1999) и мышечные клетки (Johnston *et al.*, 1999). Терапевтическая доставка генов через ретровирусы в настоящее время оценивается для лечения различных нарушений, таких как воспалительное заболевание (Moldawer *et al.*, 1999), СПИД (Amado and Chen, 1999; Engel and Kohn, 1999), злокачественная опухоль (Clay *et al.*, 1999), цереброваскулярное заболевание (Weihl *et al.*, 1999) и гемофилия (Kau, 1998).

Герпесвирусные векторы. Вирус простого герпеса (HSV) типа I и типа II содержит двухцепочечный линейный ДНК-геном размером приблизительно 150 т.п.н., кодирующий 70-80 генов. HSV дикого типа способны инфицировать клетки литически и обеспечивать латентность в определенных типах клеток (например, нейронах). Аналогично аденовирусу, HSV также может инфицировать различные типы клеток, включая клетки мышцы (Yeung *et al.*, 1999), уха (Derby *et al.*, 1999), глаза (Kaufman *et al.*, 1999), опухолей (Yoon *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1999), легкого (Kohut *et al.*, 1998), нейроны (Garrido *et al.*, 1999; Lachmann and Efstatiou, 1999), клетки печени (Miyatake *et al.*, 1999; Kooby *et al.*, 1999) и островков поджелудочной железы (Rabinovitch *et al.*, 1999).

Гены вируса HSV транскрибируются клеточной РНК-полимеразой II и имеют временную регуляцию, что приводит к транскрипции и последующему синтезу продуктов генов в приблизительно трех различных фазах или кинетических классах. Эти фазы генов обозначаются как предранние (IE) или α -гены, ранние (E) или β -гены и поздние (L) или γ -гены. Сразу после поступления генома вируса в ядро вновь инфицированной клетки транскрибируются гены IE. Эффективная экспрессия этих генов не требует предшествующего синтеза вирусных белков. Продукты генов IE необходимы для активации транскрипции и регуляции остального вирусного генома.

Для применения в терапевтической доставке генов HSV необходимо сделать репликационно-дефектным. Протоколы получения клеточных линий, свободных от вируса-помощника для репликационно-дефектного HSV, описаны (патент США 5879934; патент США 5851826, каждый из которых прямо включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Один белок IE, ICP4, также известный как $\alpha 4$ или Vmw175, абсолютно необходим как для инфекционности вируса, так и для перехода из IE в более позднюю транскрипцию. Таким образом, вследствие его комплексной мультифункциональной природы и центральной роли в регуляции экспрессии генов HSV, ICP4 часто является предметом генетических исследований HSV.

Фенотипические исследования вирусов HSV с делецией ICP4 показывают, что такие вирусы потенциально являются пригодными для целей генного переноса (Krisky *et al.*, 1998a). Одним из свойств вирусов с делецией ICP4, которое делает их желательными для генного переноса, является то, что они экспрессируют только пять других генов IE:

ICP0, ICP6, ICP27, ICP22 и ICP47 (DeLuca *et al.*, 1985) без экспрессии вирусных генов, кодирующих белки, которые направляют синтез вирусной ДНК, а также структурные белки вируса. Это свойство является желательным для минимизации возможных вредоносных эффектов на метаболизм клеток-хозяев или иммунный ответ после переноса генов. Дальнейшая делеция генов IE ICP22 и ICP27, в дополнение к ICP4, существенно улучшала снижение цитотоксичности HSV и препятствовала экспрессии ранних и поздних вирусных генов (Krisky *et al.*, 1998b).

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

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов. Аденоассоциированный вирус (AAV), представитель семейства парвовирусов, представляет собой вирус человека, который все в большей степени используется для доставки терапевтических средств с генной доставкой. AAV имеет несколько преимущественных признаков, не встречающихся в других вирусных системах. Во-первых, AAV может инфицировать широкий диапазон клеток-хозяев, включая неделяющиеся клетки. Во-вторых, AAV может инфицировать клетки отличающегося вида. В-третьих, AAV не ассоциирован с каким-либо заболеванием человека или животного и, по-видимому, не изменяет биологические свойства клетки-хозяина при интеграции. Например, согласно оценке 80-85% человеческой популяции подвергались воздействию AAV. Наконец, AAV является стабильным в широком диапазоне физических и химических условий, удовлетворяя требованиям продуцирования, хранения и транспортировки.

Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, содержащую 4681 нуклеотид. Геном AAV, как правило, включает внутренний неповторяющийся геном, фланкированный на каждом конце инвертированными концевыми повторами (ITR) длиной приблизительно 145 п.н. ITR имеют множество функций, включая функции ориджинов репликации ДНК и сигналов упаковки вирусного генома. Внутренняя неповторяющаяся 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 упаковывают вирусный геном в вирион. С области *rep* AAV экспрессируется семейство из по меньшей мере четырех вирусных белков: Rep 78, Rep 68, Rep 52 и Rep 40, названных согласно их кажущейся молекулярной массе. Область *cap* AAV кодирует по меньшей мере три белка: VP1, VP2 и VP3.

AAV представляет собой зависимый от помощника вирус, требующий совместного инфицирования с вирусом-помощником (например, аденовирус, вирус герпеса и вирус осповакцины) для образования вирионов AAV. В отсутствие соинфекции с вирусом-

помощником AAV переходит в латентное состояние, в котором вирусный геном встраивается в хромосому клетки-хозяина, однако инфекционные вирионы не продуцируются. Последующая инфекция вирусом-помощником "спасает" интегрированный геном, позволяя ему реплицироваться и упаковывать геном в инфекционные вирионы AAV. Хотя AAV может инфицировать клетки разных видов, вирус-помощник должен быть инфекционным для того же вида, что и клетка-хозяин (например, AAV человека будет реплицироваться в клетках собаки, соинфицированных аденовирусом собаки).

AAV модифицируют для доставки представляющих интерес генов путем делеции внутренней неповторяющейся области генома AAV и встраивания гетерологичного гена между ITR. Гетерологичный ген может быть функционально связан с гетерологичным промотором (конститутивный, клеточно-специфический или индуцибельный), способным запускать экспрессию гена в клетках-мишенях. Для продуцирования инфекционного рекомбинантного AAV (rAAV), содержащего гетерологичный ген, подходящую продуцирующую клеточную линию трансфицируют вектором rAAV, содержащим гетерологичный ген. Продуцирующую клетку одновременно трансфицируют второй плазмидой, содержащей гены гер и сар AAV под контролем их соответствующих эндогенных промоторов или гетерологичных промоторов. Наконец, продуцирующую клетку инфицируют вирусом-помощником.

После объединения этих факторов гетерологичный ген реплицируется и упаковывается, как если бы это был геном AAV дикого типа. Когда клетки-мишени инфицируют полученными вирионами rAAV, гетерологичный ген попадает и экспрессируется в клетках-мишенях. Поскольку клетки-мишени лишены генов гер и сар и генов-помощников аденовируса, rAAV не может далее реплицироваться, упаковываться или образовывать AAV дикого типа.

Использование вируса-помощника, однако, представляет ряд проблем. Во-первых, использование аденовируса в системе продуцирования rAAV вызывает продуцирование клетками-хозяевами как rAAV, так и инфекционного аденовируса. Контаминирующий инфекционный аденовирус может быть инактивирован посредством обработки нагреванием (56°C в течение 1 часа). Однако обработка нагреванием приводит к приблизительно 50% снижению титра функциональных вирионов rAAV. Во-вторых, в этих препаратах присутствуют различные количества аденовирусных белков. Например, приблизительно 50% или более от всего белка, полученного в таких препаратах вирионов rAAV, представляют собой свободный аденовирусный фиберный белок. Если их не удалить полностью, эти аденовирусные белки потенциально могут индуцировать иммунный ответ у пациента. В-третьих, способы продуцирования вектора на основе AAV, в которых используется вирус-помощник, требуют применения и манипулирования большими количествами инфекционного вируса-помощника с высоким титром, что вызывает ряд угроз здоровью и безопасности, в частности, при использовании вируса герпеса. В-четвертых, сопутствующее продуцирование частиц вируса-помощника в

клетках, продуцирующих вирион гAAV, уводит большие количества ресурсов клетки-хозяина от продуцирования вирионов гAAV, потенциально вызывая более низкий выход вирионов гAAV.

Лентивирусные векторы. Лентивирусы представляют собой комплексные ретровирусы, которые, в дополнение к распространенным ретровирусным генам *gag*, *pol* и *env*, содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Более высокая комплексность позволяет вирусу модулировать свой жизненный цикл, как в случае латентной инфекции. Некоторые примеры лентивируса включают вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вирус иммунодефицита обезьян: SIV. Лентивирусные векторы получают путем многократного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, удаляют гены *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*, что делает вектор биологически безопасным.

Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки и могут использоваться для переноса генов как *in vivo*, так и *ex vivo*, и экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Лентивирусный геном и провирусная ДНК имеют три гена, встречающихся в ретровирусах: *gag*, *pol* и *env*, которые фланкируются двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Ген *gag* кодирует внутренние структурные (матриксный, капсидный и нуклеокапсидный) белки; ген *pol* кодирует РНК-направляемую ДНК-полимеразу (обратная транскриптаза), протеазу и интегразу; и ген *env* кодирует гликопротеины оболочки вируса. 5'- и 3'-LTR служат для способствования транскрипции и полиаденилированию РНК вирионов. LTR содержит все другие цис-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса. Лентивирусы имеют дополнительные гены, включающие *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef* и *vpx*.

Рядом с 5'-LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (участок связывания тРНК-праймера) и для эффективного инкапсидирования вирусной РНК в частицы (участок *Psi*). Если последовательности, необходимые для инкапсидирования (или упаковывания ретровирусной РНК в инфекционные вирионы) отсутствуют в вирусном геноме, цис-дефект препятствует инкапсидированию геномной РНК. Однако, полученный мутант остается способным направлять синтез всех вирионных белков.

Лентивирусные векторы известны в данной области, см. Naldini *et al.*, (1996); Zufferey *et al.*, (1997); патенты США 6013516 и 5994136. Как правило, векторы основаны на плазмиде или вирусе и они содержат необходимые последовательности для встраивания чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Гены *gag*, *pol* и *env* представляющих интерес векторов также известны в данной области. Таким образом, соответствующие гены клонируют в выбранный вектор, а затем используют для трансформации представляющей интерес клетки-мишени.

Рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, где подходящую клетку-хозяина трансфицируют двумя или более векторами, имеющим

упаковывающие функции, а именно, *gag*, *pol* и *env*, а также *rev* и *tat*, описан в патенте США 5994136, включенном в настоящее описание в качестве ссылки. В нем описан первый вектор, который может предоставить нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный ген *gag* и *pol*, и другой вектор, который может предоставить нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный ген *env*, для продуцирования упаковывающей клетки. Введение вектора, предоставляющего гетерологичный ген, такой как ген *STAT-1 α* , по настоящему изобретению в упаковывающую клетку приводит к продуцирующей клетке, которая высвобождает инфекционные вирусные частицы, содержащие представляющий интерес чужеродный ген. Предпочтительно *env* представляет собой амфотропный белок оболочки, который позволяет трансдукцию клеток человека и других видов.

Вектор, предоставляющий последовательность нуклеиновой кислоты вирусного *env*, функционально связан с регуляторными последовательностями, например, промотором или энхансером. Регуляторная последовательность может представлять собой любой эукариотический промотор или энхансер, включая, например, элемент промотор-энхансер вируса лейкоза мышей Молони, энхансер цитомегаловируса человека или промотор P7.5 вируса осповакцины. В некоторых случаях, таких как элемент промотор-энхансер вируса лейкоза мышей Молони, элементы промотор-энхансер находятся в или рядом с последовательностями LTR.

Гетерологичная или чужеродная последовательность нуклеиновой кислоты, такая как кодирующая *STAT-1 α* полинуклеотидная последовательность, описанная в настоящем описании, функционально связана с регуляторной последовательностью нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, гетерологичная последовательность связана с промотором с образованием химерного гена. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты также может быть под контролем либо сигналов промотор-энхансер вирусных LTR, либо внутреннего промотора, и сохраненные сигналы в ретровирусном LTR все еще могут обеспечивать эффективную экспрессию трансгена. Для анализа присутствия вектора, и, таким образом, для подтверждения инфекции и интеграции можно использовать маркерные гены. Присутствие маркерного гена обеспечивает селекцию и рост только тех клеток-хозяев, которые экспрессируют вставки. Типичные гены для селекции кодируют белки, которые сообщают резистентность антибиотикам и другим токсичным веществам, например, гистидинолу, пурамицину, гигромицину, неомицину, метотрексату и т.д., и маркеры клеточной поверхности.

Векторы вводят в упаковывающую клеточную линию посредством трансфекции или инфекции. Упаковывающая клеточная линия продуцирует вирусные частицы, которые содержат геном вектора. Способы трансфекции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области. После котрансфекции упаковывающих векторов и вектора для переноса в упаковывающую клеточную линию рекомбинантный вирус извлекают из культуральной среды и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области. Таким образом, упаковывающие конструкции могут быть введены в клеточные линии человека посредством 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 подходящего лекарственного средства и выделением клонов. Ген селективного маркера может быть физически соединен с упаковывающими генами в конструкции.

Лентивирусные векторы для переноса, согласно Naldini *et al.* (1996), использовались для инфицирования клеток человека после остановки роста *in vitro* и для трансдукции нейронов после прямой инъекции в головной мозг взрослых крыс. Вектор был эффективным в отношении переноса маркерных генов *in vivo* в нейроны и достигалась длительная экспрессия в отсутствие поддающейся обнаружению патологии. Животные, проанализированные через десять месяцев после однократной инъекции, продемонстрировали отсутствие снижения среднего уровня экспрессии трансгена и отсутствие признака патологии ткани или иммунной реакции (Blomer *et al.*, 1997). Таким образом, в рамках настоящего изобретения можно пересаживать или трансплантировать клетки, инфицированные рекомбинантным лентивирусом *ex vivo*, или инфицировать клетки *in vivo*.

Другие вирусные векторы. Разработка и применимость вирусных векторов для доставки генов постоянно улучшается и развивается. 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) предусматриваются для применения в рамках настоящего изобретения и могут быть выбраны в соответствии с необходимыми свойствами целевой системы.

В определенных вариантах осуществления для применения в рамках настоящего изобретения предусматриваются векторы на основе вируса осповакцины. Вирус осповакцины является особенно пригодной эукариотической вирусной векторной системой для экспрессии гетерологичных генов. Например, когда рекомбинантный вирус осповакцины сконструирован надлежащим образом, белки синтезируются, процессируются и транспортируются на 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), клетки внутреннего уха (Derby *et al.*, 1999), клетки глиомы, например, р53 (Timiryasova *et al.*, 1999) и различные клетки млекопитающих, например, Р₄₅₀ (патент США 5506138). Получение, рост и манипулирование вирусами осповакцины описаны в патенте США 5849304 и патенте США 5506138 (каждый из которых прямо включен в настоящее описание в качестве ссылки).

В других вариантах осуществления для применения для доставки генов предусматриваются векторы на основе вируса Синдбис. Вирус Синдбис представляет собой вид рода альфавирусов (Garoff and Li, 1998), который включает такие важные патогены, как вируса венесуэльского, западного и восточного энцефалита лошадей (Sawai

et al., 1999; Mastrangelo *et al.*, 1999). *In vitro*, вирус Синдбис инфицирует различные клетки птиц, млекопитающих, пресмыкающихся и земноводных. 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 служит в качестве мРНК. Трансляция мРНК 26S вируса осповакцины приводит к продуцированию полибелка, который расщепляется ко- и посттрансляционно комбинацией вирусных и предположительно кодируемых у хозяина протеаз с получением трех структурных белков вируса: капсидного белка (С) и двух гликопротеинов оболочки (Е1 и Е2, предшественники вириона Е2).

Три признака вируса Синдбис указывают на то, что он может быть пригодным вектором для экспрессии гетерологичных генов. Во-первых, это его широкий диапазон хозяев как в природе, так и в лаборатории. Во-вторых, экспрессия генов происходит в цитоплазме клетки-хозяина и является быстрой и эффективной. В-третьих, являются доступными чувствительные к температуре мутации в РНК, которые можно использовать для модулирования экспрессии гетерологичных кодирующих последовательностей путем простого переключения культур на непермиссивную температуру в различные моменты времени после инфицирования. Рост и поддержание вируса Синдбис известны в данной области (патент США 5217879, прямо включенный в настоящее описание в качестве ссылки).

Химерные вирусные векторы. Химерные или гибридные вирусные векторы разрабатываются для применения в терапевтической генной доставке, и они предусматриваются для применения в рамках настоящего изобретения. Описаны химерные поксвирусные/ретровирусные векторы (Holzer *et al.*, 1999), аденовирусные/ретровирусные векторы (Feng *et al.*, 1997; Bilbao *et al.*, 1997; Caplen *et al.*, 1999) и аденовирусные/аденоассоциированные вирусные векторы (Fisher *et al.*, 1996; патент США 5871982).

В этих "химерных" вирусных системах для переноса генов могут использоваться полезные признаки двух или более родительских видов вирусов. Например, в Wilson *et al.*, описана химерная векторная конструкция, которая содержит часть аденовируса, 5'- и 3'-последовательности ITR AAV и выбранный трансген, описанный ниже (патент США 5871983, прямо включенный в настоящее описание в качестве ссылки).

Химерные вирусы аденовирус/AAV используют последовательности нуклеиновых кислот аденовируса в качестве транспорта для доставки генома рекомбинантного AAV/трансгена в клетку-мишень. Последовательности нуклеиновых кислот аденовируса, используемые в гибридном векторе, могут находиться в диапазоне от минимального количества последовательностей, которое требует применения вируса-помощника для продуцирования гибридной вирусной частицы, до только отдельных делеций аденовирусных генов, и продукты таких генов с делециями могут быть предоставлены в процессе продуцирования гибридного вируса посредством выбранной упаковывающей клетки. Как минимум, аденовирусные последовательности нуклеиновых кислот,

используемые в челночном векторе pAdA, представляют собой аденовирусные геномные последовательности, из которых все вирусные гены удалены, и которые содержат только те последовательности аденовируса, которые требуются для упаковывания аденовирусной геномной ДНК в предварительно сформированную капсидную головку. Более конкретно, используемые аденовирусные последовательности представляют собой последовательности цис-действующих 5'- и 3'-инвертированных концевых повторов (ITR) аденовируса (которые функционируют в качестве ориджинов репликации) и нативный 5'-упаковывающий/энхансерный домен, который содержит последовательности, необходимые для упаковывания линейных генов Ad, и энхансерные элементы для промотора E1. Аденовирусные последовательности могут быть модифицированы так, чтобы они содержали желаемые делеции, замены или мутации, при условии, что желаемая функция не устраняется.

Последовательности AAV, пригодные для описанного выше химерного вектора, представляют собой вирусные последовательности, из которых удалены последовательности, кодирующие полипептиды гер и сар. Более конкретно, используемые последовательности AAV представляют собой последовательности цис-действующего 5'- и 3'-инвертированного концевого повтора (ITR). Эти химеры характеризуется доставкой трансгена с высоким титром в клетку-хозяина и способностью стабильно интегрировать трансген в хромосому клетки-хозяина (патент США 5871983, прямо включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В гибридной векторной конструкции последовательности AAV фланкированы выбранными аденовирусными последовательностями, описанными выше. Сами последовательности 5'- и 3'-ITR AAV фланкируют выбранную последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы, описанные ниже. Таким образом, последовательность, образованная трансгеном и фланкирующими 5'- и 3'-последовательностями AAV, может быть встроена в любой участок делеции в аденовирусных последовательностях вектора. Например, последовательности AAV желателно встраивают в участок делеции генов E1a/E1b аденовируса. Альтернативно, последовательности AAV могут быть встроены в области делеции E3, делеции E2a и т.д. Если только последовательности 5'-ITR/упаковывающие последовательности и 3'-последовательности ITR аденовируса используются в гибридном вирусе, последовательности AAV встраивают между ними.

Последовательности трансгена вектора и рекомбинантного вируса могут представлять собой ген, последовательность нуклеиновой кислоты или ее обратный транскрипт, гетерологичные последовательности аденовируса, которые кодируют представляющий интерес белок, полипептид или пептидный фрагмент. Трансген функционально связан с регуляторными компонентами так, чтобы позволить транскрипцию трансгена. Композиция последовательности трансгена будет зависеть от применения полученного гибридного вектора. Например, один из типов последовательностей трансгена включает терапевтический ген, который экспрессирует желаемый продукт гена в клетке-хозяине. Эти терапевтические гены или

последовательности нуклеиновых кислот, как правило, кодируют продукты для введения и экспрессии у пациента *in vivo* или *ex vivo* для замены или коррекции наследственного или ненаследственного генетического дефекта или лечения эпигенетического расстройства или заболевания.

10. Невирусная трансформация

Подходящие способы доставки нуклеиновых кислот для трансформации органеллы, клетки, ткани или организма для применения в рамках настоящего изобретения предположительно включают практически любой способ, посредством которого нуклеиновая кислота (например, ДНК) может быть введена в органеллу, клетку, ткань или организм, как описано в настоящем описании или как будет известно специалисту в данной области. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку ДНК, например, посредством инъекции (патенты США 5994624, 5981274, 5945100, 5780448, 5736524, 5702932, 5656610, 5589466 и 5580859, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки), включая микроинъекцию (Harland and Weintraub, 1985; патент США 5789215, включенный в настоящее описание в качестве ссылки); посредством электропорации (патент США 5384253, включенный в настоящее описание в качестве ссылки); посредством преципитации с фосфатом кальция (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); посредством применения DEAE-декстрана, а затем полиэтиленгликоля (Gopal, 1985); посредством прямой звуковой нагрузки (Fechheimer *et al.*, 1987); посредством опосредуемой 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); посредством бомбардировки микрочастицами (заявки РСТ № WO 94/09699 и 95/06128; патенты США 5610042; 5322783, 5563055, 5550318, 5538877 и 5538880, и каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки); посредством встряхивания с волокнами карбида кремния (Kaerpler *et al.*, 1990; патенты США 5302523 и 5464765, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки); или посредством ПЭГ-опосредуемой трансформации протопластов (Omirulleh *et al.*, 1993; патенты США 4684611 и 4952500, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки); посредством опосредуемого десикацией/ингибированием поглощения ДНК (Potrykus *et al.*, 1985). Посредством применения способов, таких как эти, органелла(ы), клетка(и), ткань(и) или организм(ы) могут быть стабильно или временно трансформированы.

Инъекция. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть доставлена в органеллу, клетку, ткань или организм посредством одной или нескольких инъекций (т.е. инъекция через иглу), как например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно. Способы инъекции вакцин хорошо известны средним специалистам в данной области (например, инъекция композиции, содержащей солевой раствор). Следующие варианты осуществления настоящего изобретения включают введение нуклеиновой кислоты посредством прямой микроинъекции. Прямая микроинъекция использовалась для введения конструкций

нуклеиновых кислот в ооциты *Xenopus* (Harland and Weintraub, 1985).

Электропорация. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту вводят в органеллу, клетку, ткань или организм посредством электропорации. Электропорация вовлекает воздействие на суспензии клеток и ДНК высоковольтного электрического разряда. В некоторых вариантах этого способа используют определенные деградирующие клеточную стенку ферменты, такие как пектин-деградирующие ферменты, для того, чтобы сделать реципиентные клетки более чувствительными к трансформации электропорацией, чем необработанные клетки (патент США 5384253, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Альтернативно реципиентные клетки можно сделать более чувствительными к трансформации посредством механического нанесения повреждений.

Трансфекция эукариотических клеток с использованием электропорации является достаточно успешной. Пре-В-лимфоциты мыши трансфицировали генами к-иммуноглобулина человека (Potter *et al.*, 1984) и гепатоциты крысы трансфицировали геном хлорамфениколацетилтрансферазы (Tur-Kaspa *et al.*, 1986) таким образом.

Для обеспечения трансформации посредством электропорации в клетках, например, таких как клетки растений, можно использовать либо рыхлые ткани, такие как суспензионная культура клеток или эмбриогенный каллюс, или альтернативно можно трансформировать незрелые зародыши или другую организованную ткань прямо. В этом способе можно частично деградировать клеточные стенки выбранных клеток путем воздействия на них пектин-деградирующих ферментов (пектолиаз) или механического нанесения повреждений контролируемым образом. Примеры некоторых видов, которые трансформировали посредством электропорации интактных клеток, включают кукурузу (патент США 5384253; 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 можно использовать протопласты для трансформации клеток растений посредством электропорации (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Например, получение трансгенных растений сои посредством электропорации происходящих из семядоли протопластов описано Dhir и Widholm в международной патентной заявке № WO 92/17598, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Другие примеры вида, для которого описана трансформация протопластов, включает 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 с использованием преципитации с фосфатом кальция. С использованием этого способа клетки KB человека трансфицировали ДНК аденовируса 5 (Graham and Van Der Eb, 1973). Также таким образом клетки L(A9) мыши, C127 мыши, CHO, CV-1, ВНК, NIH3T3 и HeLa трансфицировали маркерным геном неомицина (Chen and Okayama, 1987), и гепатоциты крысы трансфицировали различными маркерными генами (Rippe *et al.*, 1990).

DEAE-декстран: в другом варианте осуществления нуклеиновую кислоту доставляют в клетку с использованием DEAE-декстрана, а затем полиэтиленгликоля. Таким способом репортерные плазмиды вводили в клетки миеломы мыши и эритролейкоза (Gopal, 1985).

Обработка звуком. Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают введение нуклеиновой кислоты посредством прямой звуковой нагрузки. Фибробласты LTK⁻ были трансфицированы геном тимидинкиназы посредством звуковой нагрузки (Fechheimer *et al.*, 1987).

Опосредуемая липосомами трансфекция. В следующем варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота может быть заключена в липидный комплекс, например, такой как липосома. Липосомы представляют собой везикулярные структуры, характеризующиеся фосфолипидной бислоидной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют множество липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипид суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают самоперестройку перед образованием закрытых структур и заключают воду и растворенные растворимые вещества в липидные бислои (Ghosh and Bachhawat, 1991). Также предусматривается нуклеиновая кислота в комплексе с Lipofectamine (Gibco BRL) или Superfect (Qiagen).

Опосредуемая липосомами доставка нуклеиновых кислот и экспрессия чужеродной ДНК *in vitro* является очень успешной (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). Также была продемонстрирована осуществимость опосредуемой липосомами доставки и экспрессии чужеродной ДНК в культивируемом эмбрионе курицы, клетках HeLa и клетках гепатомы (Wong *et al.*, 1980).

В определенных вариантах осуществления изобретения липосома может быть в комплексе с гемагглютинирующим вирусом (HVJ). Было показано, что это облегчает слияние с клеточной мембраной и способствует проникновению в клетку инкапсулированной в липосому ДНК (Kaneda *et al.*, 1989). В других вариантах осуществления липосома может быть в комплексе или использоваться совместно с ядерными негистоновыми хромосомными белками (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). В следующих вариантах осуществления липосома может быть в комплексе или может использоваться совместно как с HVJ, так и с HMG-1. В других вариантах осуществления носитель для доставки может содержать лиганд и липосому.

Рецептор-опосредуемая трансфекция. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть доставлена в клетку-мишень посредством носителей для рецептор-опосредуемой доставки. Преимуществом этого является селективное поглощение макромолекул посредством рецептор-опосредуемого эндоцитоза, который будет происходить в клетке-мишени. Ввиду специфического для типов клеток распределения различных рецепторов, этот способ доставки обеспечивает дополнительную степень специфичности настоящему изобретению.

Определенные носители для рецептор-опосредуемого нацеливания генов включают

специфичный к клеточному рецептору лиганд и связывающую нуклеиновую кислоту структуру. Другие включают специфичный к клеточному рецептору лиганд, с которым функционально связана нуклеиновая кислота, подлежащая доставке. Для рецептор-опосредуемого переноса генов используется несколько лигандов (Wu and Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), что обеспечивает функциональность способа. Описана специфическая доставка в контексте другого типа клеток млекопитающих (Wu and Wu, 1993; включенная в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых аспектах настоящего изобретения лиганд выбирают так, чтобы он соответствовал рецептору, специфически экспрессируемому на популяции клеток-мишеней.

В других вариантах осуществления компонент носителя для доставки нуклеиновых кислот в клеточно-специфическом носителе для нацеливания нуклеиновых кислот может содержать специфический связывающий лиганд в комбинации с липосомой. Нуклеиновая кислота(ы), подлежащая доставке, находится в липосоме и специфический связывающий лиганд функционально встроен в липосомальную мембрану. Таким образом, липосома будет специфически связываться с рецептором(ами) клетки-мишени и доставлять содержимое в клетку. Было показано, что такие системы являются функциональными с использованием систем, в которых, например, эпидермальный фактор роста (EGF) используется в рецептор-опосредуемой доставке нуклеиновой кислоты в клетки, которые демонстрируют активацию рецептора EGF.

В следующих вариантах осуществления компонент носителя для доставки нуклеиновой кислоты в носителе для направленной доставки может представлять собой саму липосому, которая предпочтительно содержит один или несколько липидов или гликопротеинов, которые направляют клеточно-специфическое связывание. Например, лактозил-церамид, асиалганглиозид с концевыми остатками галактозы, включали в липосомы, и было выявлено, что он повышает захват гена инсулина гепатоцитами (Nicolau *et al.*, 1987). Предусматривается, что тканеспецифические конструкции для трансформации по настоящему изобретению могут быть специфически доставлены в клетку-мишень аналогичным образом.

11. Системы экспрессии

Существуют многочисленные системы экспрессии, которые содержат по меньшей мере часть или все из композиций, рассмотренных выше. Для получения последовательностей нуклеиновых кислот или их соответствующих полипептидов, белков и пептидов можно использовать системы на основе прокариот и/или эукариот для применения в рамках настоящего изобретения. Многие системы являются коммерчески и общедоступными.

Системы клетка насекомого/бакуловирус могут обеспечивать высокий уровень экспрессии белка гетерологичного сегмента нуклеиновой кислоты, как описано в патентах США 5871986 и 4879236, оба из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок, и они могут быть приобретены, например, под наименованием MaxVac[®] 2.0 от

Invitrogen[®] и бакуловирусная система экспрессии BacPack[™] от Clontech[®].

Другие примеры систем экспрессии включают индуцибельную систему экспрессии млекопитающих Complete Control[™] от Stratagene[®], которая вовлекает синтетический экдизон-индуцируемый рецептор, или систему экспрессии pET, систему экспрессии *E. coli*. Другой пример индуцибельной системы экспрессии доступен от Invitrogen[®], которая включает систему T-Rex[™] (тетрациклин-регулируемая экспрессия), индуцибельную систему экспрессии млекопитающих, в которой используется полноразмерный промотор CMV. Invitrogen[®] также предоставляет систему дрожжевой экспрессии, называемую *Pichia methanolica* Expression System, которая предназначена для продуцирования на высоком уровне рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах *Pichia methanolica*. Специалисту в данной области известно, как экспрессировать вектор, такой как экспрессирующая конструкция, для продуцирования последовательности нуклеиновой кислоты или ее соответствующего полипептида, белка или пептида.

Первичные культуры клеток млекопитающих могут быть получены разными способами. Для поддержания клеток жизнеспособными, когда они находятся *in vitro* и в контакте с экспрессирующей конструкцией, является необходимым обеспечить поддержание контакта клеток с правильным соотношением кислорода и диоксида углерода, и питательными веществами, и при этом защиту от микробной контаминации. Способы культивирования клеток широко освещены.

Один вариант осуществления вышеуказанного вовлекает применение генного переноса для иммортализации клеток для продуцирования белков. Ген для представляющего интерес белка может быть перенесен, как описано выше, в соответствующие клетки-хозяева с последующим культивированием клеток в соответствующих условиях. Таким образом можно использовать ген для практически любого полипептида. Получение рекомбинантных экспрессирующих векторов и элементов, включенных в них, рассмотрено выше. Альтернативно белок, подлежащий продуцированию, может представлять собой эндогенный белок, в норме синтезируемый рассматриваемой клеткой.

Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются клетки Vero и HeLa и клеточные линии яичника китайского хомячка, клетки W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, NIH3T3, RIN и MDCK. Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Разные клетки-хозяева имеют характеристики и специфические механизмы для посттрансляционного процессинга и модификации белков. Соответствующие клеточные линии или системы хозяев могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка.

Можно использовать ряд систем селекции, включая, но не ограничиваясь ими,

гены тимидинкиназы HSV, гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и аденинфосфорибозилтрансферазы, в *tk-*, *hgprrt-* или *aprt-* клетках, соответственно. Также в качестве основы для селекции можно использовать резистентность к антиметаболитам посредством *dhfr*, который сообщает резистентность к; *gpt*, который сообщает резистентность к микофеноловой кислоте; *neo*, который сообщает резистентность к аминогликозиду G418; и *hygro*, который сообщает резистентность к гигромицину.

Е. Очистка

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть очищенными. Подразумевается, что термин "очищенный", как используют в рамках изобретения, относится к композиции, поддающейся изоляции от других компонентов, где белок очищают до любой степени относительно его природного состояния. Таким образом, очищенный белок также относится к белку, свободному от окружения, в котором он может встречаться в природе. Когда используют термин "по существу очищенный", это обозначение относится 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 более белков в композиции.

Способы очистки белков хорошо известны специалистам в данной области. Эти способы вовлекают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточного окружения на полипептидные и неполипептидные фракции. После отделения полипептида от других белков, представляющий интерес полипептид может быть далее очищен с использованием хроматографических и электрофоретических способов для достижения частичной или полной очистки (или очистки до однородного состояния). Аналитическими способами, особенно пригодными для получения чистого пептида, являются ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография; полиакриламидный гель-электрофорез; изоэлектрическое фокусирование. Другие способы очистки белков включают преципитацию с сульфатом аммония, ПЭГ, антитела и т.п., денатурацию нагреванием, за которой следует центрифугирование; гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, гидроксилapatитную и аффинную хроматографию; и комбинации таких и других способов.

При очистке конструкций антител по настоящему изобретению может быть желательной экспрессия полипептида в прокариотической или эукариотической экспрессирующей системе и экстракция белка с использованием денатурирующих условий. Полипептид может быть очищен от других клеточных компонентов с использованием аффинной колонки, которая связывается с меченой частью полипептида. Как общеизвестно в данной области, полагают, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен или что определенные стадии могут быть пропущены и все еще обеспечивать надлежащий способ получения по существу очищенного белка или пептида.

Обычно полные антитела фракционируют с использованием средств (т.е. белок А),

которые связывают Fc-часть конструкции антитела. Альтернативно антигены могут использоваться для одновременной очистки и селекции соответствующих антител. В таких способах часто используется агент селекции, связанный с подложкой, такой как колонка, фильтр или микроноситель. Антитела связываются с подложкой, примеси удаляют (например, смывают) и антитела высвобождают путем применения условий (соль, нагревание и т.д.).

Различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида будут известны специалистам в данной области с учетом настоящего изобретения. Они включают, например, определение удельной активности активной фракции или оценку количества полипептидов во фракции посредством анализа SDS/PAGE. Другим способом оценки чистоты фракции является вычисление удельной активности фракции, сравнение ее с удельной активностью первоначального экстракта и, таким образом, вычисление степени чистоты. Фактические элементы, используемые для отображения величины активности, будут, безусловно, зависеть от конкретного способа анализа, выбранного для исследования очистки, и того, демонстрирует ли экспрессируемый белок или пептид поддающуюся детекции активность.

Известно, что миграция полипептида может варьироваться, иногда значительно, в разных условиях SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Таким образом, будет понятно, что в разных условиях электрофореза кажущиеся молекулярные массы очищенных или частично очищенных продуктов экспрессии могут варьироваться.

F. Мультиспецифические форматы конструкций антител

Мультиспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных эпитопов или антигенов. Эти форматы отличаются от того, что считается традиционным двухвалентным антителом с разными специфичностями связывания, трансплантированными в плечи переменных областей тяжелой/легкой цепей. В других форматах используются двойные или тройные одноцепочечные схемы, в некоторых из которых используется Fc-компонент, в то время как в других он не используется. Различные форматы представлены на фиг. 1A-J.

В дополнение к наличию одной или двух отдельных специфичностей связывания для MUC1-C, мультиспецифические антитела в рамках настоящей заявки также могут связывать один или два из следующих антигенов:

CD3. CD3 (кластер дифференцировки 3) представляет собой белковый комплекс и T-клеточный корцептор, который вовлечен в активацию как цитотоксических T-клеток (CD8+ наивные T-клетки), так и T-хелперных клеток (CD4+ наивные T-клетки). Он состоит из четырех отдельных цепей. У млекопитающих, комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Эти цепи ассоциируют с T-клеточным рецептором (TCR) и ζ -цепью (зета-цепь) с образованием сигнала активации в T-лимфоцитах. TCR, ζ -цепь и молекулы CD3 вместе составляют комплекс TCR.

Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ являются в высокой степени родственными белками

клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими единичный внеклеточный домен иммуноглобулинов. Структура внеклеточной и трансмембранной областей комплекса CD3 γ ϵ /CD3 δ ϵ /CD3 ζ /TCR α β была решена посредством CryoEM, впервые продемонстрировав, как трансмембранные области CD3 охватывают трансмембранные области TCR в открытом бочонке. Имея аспартатные остатки, трансмембранная область цепей CD3 является отрицательно заряженной, что является характеристикой, которая позволяет этим цепям ассоциировать с положительно заряженными цепями TCR. Каждая из внутриклеточных хвостовых частей молекул CD3 γ , CD3 ϵ и CD3 δ содержит один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый мотив активации, или сокращенно ITAM, который необходим для способности TCR к передаче сигнала. Внутриклеточная хвостовая часть CD3 ζ содержит 3 мотива ITAM.

Коммерчески доступные антитела против CD3 включают мурмонаб, олтеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

CD16. CD16, также известный как Fc γ RIII, представляет собой молекулу кластера дифференцировки, встречающуюся на поверхности натуральных киллеров, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. CD16 идентифицирован как Fc-рецепторы Fc γ RIIIa (CD16a) и Fc γ RIIIb (CD16b), которые участвуют в передаче сигнала. Являясь наиболее хорошо изученным мембранным рецептором, вовлеченным в запуск лизиса NK-клетками, CD16 представляет собой молекулу суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), вовлеченную в антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Также его можно использовать для выделения популяций специфических иммунных клеток посредством сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или сортировки магнитно-активированных клеток с использованием антител, направленных на CD16.

CD16 является Fc γ -рецептором типа III. У человека он существует в двух разных формах: Fc γ RIIIa (CD16a) и Fc γ RIIIb (CD16b), которые обладают 96% сходством последовательности внеклеточных иммуноглобулин-связывающих областей. В то время как Fc γ RIIIa экспрессируется на тучных клетках, макрофагах и натуральных киллерах в качестве трансмембранного рецептора, Fc γ RIIIb экспрессируется только на нейтрофилах. Кроме того, Fc γ RIIIb является единственным Fc-рецептором, заякоренным на клеточной мембране посредством гликозил-фосфатидилинозитольного (GPI) линкера, и также играет значительную роль в запуске мобилизации кальция и дегрануляции нейтрофилов. Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIb вместе способны активировать дегрануляцию, фагоцитоз и оксидативный взрыв, которые позволяют нейтрофилам устранять опсонизированные патогены.

Коммерчески доступные антитела против CD28 доступны от Novus Biologicals, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Bio-Rad, Miltenyi Biotec, BD Biosciences и Agilent.

CD28. CD28 (кластер дифференцировки 28) является одним из белков, экспрессируемых на Т-клетках, которые предоставляют костимулирующие сигналы, требуемые для активации и выживания Т-клеток. Стимуляция Т-клеток через CD28 в дополнение к Т-клеточному рецептору (TCR) может обеспечить мощный сигнал к

продуцированию различных интерлейкинов (в частности, IL-6).

CD28 представляет собой рецептор для белков CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2). При активации лигандами Toll-подобного рецептора в антигенпредставляющих клетках активируется экспрессия CD80 (APC). Экспрессия CD86 на антигенпредставляющих клетках является конститутивной (экспрессия не зависит от факторов внешней среды). CD28 является единственным рецептором B7, конститутивно экспрессируемым на наивных Т-клетках. Связывание TCR наивной Т-клетки с комплексом МНС:антиген без взаимодействия CD28:B7 приводит к Т-клетке, которая является анергичной.

CD28 имеет внутриклеточный домен с несколькими остатками, которые имеют ключевое значение для эффективной передачи сигнала. Мотив YMNM, начинающийся с тирозина 170, в частности, является критически важным для привлечения белков, содержащих SH2-домен, особенно PI3K, Grb2 и Gads. Остаток Y170 является важным для индукции Vcl-xL через mTOR и усиления транскрипции IL-2 через PKC θ , но не имеет эффекта на пролиферацию и приводит к небольшому снижению продуцирования IL-2. Остаток N172 (в качестве части YMNM) является важным для связывания Grb2 и Gads и, по-видимому, способен индуцировать стабильность мРНК IL-2, но не транслокацию NF- κ B. Индукция NF- κ B, по-видимому, является значительно более зависимой от связывания Gads как с YMNM, так и с двумя пролин-богатыми мотивами в молекуле. Однако мутация последней аминокислоты мотива M173, который неспособен связывать PI3K, но способен связывать Grb2 и Gads, обеспечивает мало NF- κ B или IL-2, что указывает на то, что эти Grb2 и Gads неспособны компенсировать утрату PI3K. Транскрипция IL-2, по-видимому, имеет две стадии; Y170-зависимая, PI3K-зависимая первоначальная фаза, которая обеспечивает транскрипцию, и PI3K-независимая вторая фаза, которая зависит от образования иммунного синапса, который приводит к повышению стабильности мРНК IL-2. Обе они необходимы для полного продуцирования IL-2.

CD28 также содержит два пролин-богатых мотива, которые способны связывать SH3-содержащие белки. Itk и Tec способны связываться с N-концом этих двух мотивов, которые идут непосредственно после Y170 YMNM; Lck связывает C-конец. Как Itk, так и Lck, способны фосфорилировать остатки тирозина, которые затем обеспечивают связывание SH2-содержащих белков с CD28. Связывание Tec с CD28 усиливает продуцирование IL-2 в зависимости от связывания его доменов SH3 и PH с CD28 и PIP3, соответственно. C-концевой пролин-богатый мотив в CD28 является важным для доставки Lck и липидных рафтов в иммунный синапс через филамин-A. Мутация двух остатков пролина в C-концевом мотиве приводит к снижению пролиферации и продуцирования IL-2, но нормальной индукции Vcl-xL. Фосфорилирование тирозина в мотиве PYAP (Y191 в зрелом CD28 человека) формирует высокоаффинный участок связывания для SH2-домена src-киназы Lck, которая в свою очередь связывается с сериновой киназой PKC θ .

Коммерчески доступные антитела против CD28 доступны от Novus Biologicals, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Bio-Rad, Miltenyi Biotec, BD Biosciences и Beckman Coulter.

Миелоидный специфический антиген. Миелоидный специфический антиген CD33 или Siglec-3 (связывающий сиаловые кислоты Ig-подобный лектин 3, SIGLEC3, SIGLEC-3, gp67, p67) представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессируемый на клетках миелоидного ростка. Обычно он считается миелоид-специфическим, но также может встречаться на некоторых лимфоидных клетках. Он связывает сиаловые кислоты, и, таким образом, является представителем семейства лектинов SIGLEC. Внеклеточная часть этого рецептора содержит два иммуноглобулиновых домена (один домен IgV и один домен IgC2), помещая CD33 в суперсемейство иммуноглобулинов. Внутриклеточная часть CD33 содержит иммунорецепторные тирозиновые ингибиторные мотивы (ITIM), которые вовлечены в ингибирование клеточной активности.

CD33 может стимулироваться любой молекулой с остатками сиаловой кислоты, такой как гликопротеины или гликолипиды. При связывании иммунорецепторный тирозин-связывающий ингибирующий мотив (ITIM) CD33, присутствующий на цитозольной части белка, фосфорилируется и выступает в качестве участка связывания белков, содержащих домен Src homology 2 (SH2), таких как фосфатазы SHP. Это приводит к каскаду, который ингибирует фагоцитоз в клетке.

CD33 является мишенью гемтузумаба озагомицина (торговое наименование: Милотарг®; Pfizer/Wyeth-Ayerst Laboratories), конъюгата антитело-лекарственное средство для лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом. Лекарственное средство представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело против CD33 (антитело IgG4к hP67.6), ковалентно связанное с цитотоксическим противоопухолевым антибиотиком калихеамицином (N-ацетил-γ-калихеамицин) через бифункциональный линкер (4-(4-ацетилфенокси)бутановая кислота). 1 сентября 2017 года FDA одобрило Милотарг от Pfizer. Гемтузумаб озагомицин первоначально был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США в 2000 году. Однако в ходе клинических испытаний после выпуска в продажу исследователи выявили большее количество смертей в группе пациентов, которым вводили гемтузумаб озагомицин, по сравнению с пациентами, которым проводили только химиотерапию. Ввиду этих результатов, Pfizer добровольно отозвал гемтузумаб озагомицин из продажи в середине 2010-х годов, но он был вновь внедрен на рынок в 2017 году. CD33 также является мишенью вадастуксимаба талирина (SGN-CD33A), нового конъюгата антитело-лекарственное средство, разрабатываемого Seattle Genetics с использованием технологии ADC этой компании.

Макрофагальный специфический антиген. CD47 представляет собой широко распространенный пятикратно проходящий через мембрану рецептор массой 50 кДа, который принадлежит суперсемейству иммуноглобулинов. Этот рецептор, также известный как интегрин-ассоциированный белок, опосредует коммуникацию клетка-клетка посредством лигирования с трансмембранными регулирующими сигнал белками SIRPα и SIRPγ и взаимодействует с интегринами. CD47 также вовлечен во взаимодействия клетка-внеклеточный матрикс посредством лигирования с

тромбоспондинами. Более того, CD47 вовлечен во многие и разнообразные клеточные процессы, включая апоптоз, пролиферацию, адгезию и миграцию. Он также играет ключевую роль во многих иммунных и сердечно-сосудистых ответах. Таким образом, этот многофункциональный рецептор может быть центральным участником микроокружения опухоли. Солитарные опухоли состоят не только из злокачественных клеток, которые активно пролиферируют, но также из других типов клеток, включая иммунные клетки и фибробласты, которые составляют микроокружение опухоли. Пролиферация опухолевых клеток во многом поддерживается непрерывным прорастанием новых сосудов, которые также являются воротами для метастазирования. Более того, в большинстве новообразований наблюдается инфильтрация воспалительных клеток. Были собраны многочисленные данные, которые показали, что инфильтрирующие лейкоциты способствуют прогрессированию злокачественной опухоли. С учетом его повсеместной экспрессии на всех разнообразных типах клеток, которые составляют микроокружение опухоли, нацеливание на CD47 может стать оригинальной терапевтической стратегией в области онкологии.

Ключевой макрофагальной точкой контроля врожденного иммунитета является каскад CD47/сигнал-регулирующего белка альфа (SIRP α), являющийся возможной мишенью лекарственных средств, которая доставляет макрофагам антифагоцитарный сигнал, который ингибирует разрушение злокачественных клеток, сверхэкспрессирующих CD47 (кластер дифференцировки 47). Опухоли, которые сверхэкспрессируют CD47, включают острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, множественную миелому, миелодиспластический синдром (MDS), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток мантийной зоны и лимфому из маргинальных клеток, а также рак мочевого пузыря, головного мозга, молочной железы, толстого кишечника, пищевода, желудка, почки, лейомиосаркому, рак печени, легкого, меланому, рак яичника, поджелудочной железы и предстательной железы. В дополнение к способствованию опосредуемому макрофагами фагоцитозу, антагонизм CD47 ассоциирован с увеличенной цитотоксичностью дендритных клеток и натуральных киллеров, что приводит к повышенному интересу к антагонизму CD47/SIRP α .

Магролимаб представляет собой моноклональное антитело против CD47 и ингибитор макрофагальной точки контроля, которое предназначено для предотвращения распознавания CD47 рецептором SIRP α на макрофагах, таким образом, блокируя сигнал, используемый злокачественными клетками для избегания поглощения макрофагами. Другие антитела против CD47 являются коммерчески доступными от Abcam, Invitrogen-Thermo Fisher, R&D Systems, Bio-Rad и Biovision Inc.

SIRP α . Сигнал-регулирующий белок α (SIRP α) представляет собой регуляторный мембранный гликопротеин семейства SIRP, экспрессируемый, в основном, миелоидными клетками, а также стволовыми клетками или нейронами. SIRP α выступает в качестве ингибиторного рецептора и взаимодействует с широко экспрессируемым

трансмембранным белком CD47, также называемым сигналом "don't eat me". Это взаимодействие осуществляет негативный контроль эффекторной функции клеток врожденного иммунитета, такой как фагоцитоз клеток организма. SIRP α диффундирует латерально на мембране макрофагов и накапливается у фагоцитарного синапса, связывая CD47 и передавая сигнал "свое", который ингибирует интенсивный осуществляемый цитоскелетом процесс фагоцитоза макрофагами. Это является аналогичным сигналам "свое", предоставляемым молекулами MHC класса I NK-клеткам через Ig-подобные рецепторы или Lu49. Белок, показанный с правой стороны, представляет собой CD47, не SIRP α .

Цитоплазматическая область SIRP α является высококонсервативной у крыс, мышей и людей. Цитоплазматическая область содержит ряд остатков тирозина, которые, вероятно, выступают в качестве ITIM. При связывании CD47 SIRP α фосфорилируется и привлекает фосфатазы, такие как SHP1 и SHP2. Внеклеточная область содержит три домена суперсемейства иммуноглобулина - один домен V-set и два домена C1-set IgSF. SIRP β и γ имеют сходную внеклеточную структуру, но разные цитоплазматические области, обеспечивающие противоположные типы сигналов. В лиганд-связывающем домене V-set IgSF встречаются полиморфизмы SIRP α , но они не влияют на связывание лиганда. Одной из идей является то, что полиморфизм является важным для защиты рецептора от связывания патогенами. SIRP α распознает CD47, антифагоцитарный сигнал, который отличает живые клетки от погибающих клеток. CD47 имеет один Ig-подобный внеклеточный домен и пять проходящих через мембрану областей. Взаимодействие между SIRP α и CD47 может быть модифицировано посредством эндоцитоза или расщепления рецептора или взаимодействия с сурфактантными белками. Сурфактантные белки A и D представляют собой растворимые лиганды, на высоком уровне экспрессируемые в легких, которые связываются с той же областью SIRP α , что и CD47 и, таким образом, могут конкурентно блокировать связывание.

Внеклеточный домен SIRP α связывается с CD47 и передает внутриклеточные сигналы через его цитоплазматический домен. Связывание CD47 опосредуется NH₂-концевым V-подобным доменом SIRP α . Цитоплазматическая область содержит четыре ITIM, которые фосфорилируются после связывания лиганда. Фосфорилирование опосредует активацию тирозинкиназы SHP2. Было показано, что SIRP α связывает также фосфатазу SHP1, адаптерный белок SCAP2 и FYN-связывающий белок. Привлечение фосфатаз SHP к мембране приводит к ингибированию накопления миозина на клеточной поверхности и приводит к ингибированию фагоцитоза.

Злокачественные клетки на высоком уровне экспрессируют CD47, который активирует SIRP α и ингибирует опосредуемое макрофагами разрушение. В одном испытании были сконструированы высокоаффинные варианты SIRP α , которые были антагонистами CD47 на злокачественных клетках и вызывали повышение фагоцитоза злокачественных клеток. Другое испытание (у мышей) показало, что антитела против SIRP α помогали макрофагам снижать рост и метастазирование злокачественных клеток,

отдельно или в синергии с другими способами лечения злокачественной опухоли.

Существуют многочисленные коммерчески доступные антитела против $SIRP\alpha$ от компаний, таких как Bio X Cell, Biologend, Sino Biologicals, Thermo-Fisher, R&D Systems и Arigo Bio.

erbB2. Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-2, также известная как CD340 (кластер дифференцировки 340), протоонкоген Neu, ErbB2 (грызуны) или ERBB2 (человек), представляет собой белок, который у человека кодируется геном ERBB2. ERBB является сокращенным обозначением эритробластного онкогена B - гена, выделенного из генома птиц. Также он часто называется HER2 (от рецептора эпидермального фактора роста рецептор человека 2) или HER2/neu.

HER2 является представителем семейства рецепторов эпидермального фактора роста (HER/EGFR/ERBB) человека. Было показано, что амплификация или сверхэкспрессия этого онкогена играет важную роль в развитии и прогрессировании определенных агрессивных типов рака молочной железы. В последние годы белок стал важным биомаркером и мишенью терапии для приблизительно 30% пациентов с раком молочной железы.

HER2 имеет такое наименование, поскольку он имеет сходную структуру с рецептором эпидермального фактора роста человека, или HER1. Neu имеет такое наименование, поскольку он происходит из клеточной линии глиобластомы грызунов, типа нейрональных опухолей. ErbB-2 получил свое название вследствие сходства с ErbB (онкоген B эритробластома птиц), онкогеном, для которого позже было обнаружено, что он кодирует EGFR. Молекулярное клонирование гена продемонстрировало, что все из HER2, Neu и ErbB-2 кодируются одними и теми же ортологами.

Семейство erbB состоит из четырех связанных с плазматической мембраной рецепторных тирозинкиназ. Одной из таких является erbB-2, а другими представителями являются рецептор эпидермального фактора роста, erbB-3 (нейрорегулин-связывающий; лишен киназного домена) и erbB-4. Все четыре содержат внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, который может взаимодействовать с множеством сигнальных молекул и демонстрирует как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую активность. Примечательно, лиганды HER2 еще не были идентифицированы. HER2 может гетеродимеризоваться с любым из других трех рецепторов, и он считается предпочтительным партнером димеризации для других рецепторов ErbB. Димеризация приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецепторов и инициирует различные каскады передачи сигнала.

Существуют коммерчески доступные антитела против erbB2, включающие трастузумаб, пертузумаб и маргетуксимаб.

EGFR. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR; ErbB-1; HER1 у человека) представляет собой трансмембранный белок, который является рецептором для членов семейства эпидермального фактора роста (семейство EGF) внеклеточных белковых

лигандов. Рецептор эпидермального фактора роста является представителем семейства ErbB рецепторов, подсемейства из четырех близкородственных рецепторных тирозинкиназ: EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) и Her 4 (ErbB-4). Во многих типах злокачественных опухолей мутации, влияющие на экспрессию или активность EGFR, могут приводить к злокачественной опухоли. Дефицитная передача сигнала EGFR и других рецепторных тирозинкиназ у человека ассоциирована с заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, в то время как сверхэкспрессия ассоциирована с развитием широкого множества опухолей. Прерывание передачи сигнала EGFR, либо путем блокирования участков связывания EGFR на внеклеточном домене рецептора, либо путем ингибирования внутриклеточной тирозинкиназной активности, может препятствовать росту EGFR-экспрессирующих опухолей и улучшать состояние пациента.

EGFR представляет собой трансмембранный белок, который активируется посредством связывания его специфических лигандов, включая эпидермальный фактор роста и трансформирующий фактор роста α (TGF α). ErbB2 не имеет прямого активирующего лиганда и может быть в активированном состоянии конститутивно или становится активным при гетеродимеризации с другими представителями семейства, такими как EGFR. После активации посредством его лигандов факторов роста, EGFR претерпевает переход из неактивной мономерной формы в активный гомодимер - хотя существуют некоторые признаки, что предварительно сформированные неактивные димеры также могут существовать до связывания лиганда. В дополнение к образованию гомодимеров после связывания лиганда, EGFR может образовывать пару с другим представителем семейства рецепторов ErbB, таким как ErbB2/Her2/neu, с образованием активированного гетеродимера. Также существуют признаки, указывающие на то, что образуются кластеры активированных EGFR, хотя остается неясным, является ли эта кластеризация важной для активации сама по себе или происходит ли она после активации индивидуальных димеров.

Димеризация EGFR стимулирует присущую ему внутриклеточную протеинтирозинкиназную активность. В результате, происходит аутофосфорилирование нескольких остатков тирозина (Y) в C-концевом домене EGFR. Они включают Y992, Y1045, Y1068, Y1148 и Y1173, как показано на соседней диаграмме. Это аутофосфорилирование индуцирует последующую активацию и передачу сигнала несколькими другими белками, которые ассоциируют с фосфорилированными остатками тирозина через их собственные фосфотирозин-связывающие SH2 домены. Эти нижеследующие сигнальные белки иницируют несколько каскадов передачи сигнала, в основном, каскады MAPK, Akt и JNK, ведущие к синтезу ДНК и пролиферации клеток. Такие белки модулируют фенотипы, такие как клеточная миграция, адгезия и пролиферация. Активация рецептора является важной для врожденного иммунного ответа в коже человека. Киназный домен EGFR также может перекрестно фосфорилировать остатки тирозина других рецепторов, с которыми он агрегируется, и сам по себе может

активироваться таким образом.

Существуют коммерчески доступные антитела против EGRF, включая цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб и нецитумумаб.

PD1. Белок запрограммированной клеточной смерти 1, также известный как PD1 и CD279 (кластер дифференцировки 279), представляет собой белок на поверхности клеток, который играет роль в регуляции ответа иммунной системы на клетки организма человека посредством подавления иммунной системы и способствования толерантности к своему путем подавления воспалительной активности Т-клеток. Это предотвращает аутоиммунные заболевания, но также может препятствовать уничтожению иммунной системой злокачественных клеток. PD-1 представляет собой иммунную точку контроля, и он защищает против аутоиммунитета посредством двух механизмов. Во-первых, он способствует апоптозу (запрограммированная клеточная смерть) антиген-специфических Т-клеток в лимфатических узлах. Во-вторых, он снижает апоптоз в регуляторных Т-клетках (противовоспалительные супрессивные Т-клетки). Ингибиторы PD-1, новый класс лекарственных средств, которые блокируют PD-1, активируют иммунную систему для атаки на опухоли, и их используют для лечения определенных типов злокачественной опухоли.

Белок PD-1 у человека кодируется геном *PDCD1*. PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на Т-клетках и про-В-клетках. PD-1 связывает два лиганда: PD-L1 и PD-L2. PD-1 представляет собой мембранный белок типа I из 288 аминокислот. PD-1 является представителем обширного семейства CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток. Структура белка включает внеклеточный домен IgV, за которым следует трансмембранная область и внутриклеточная хвостовая часть. Внутриклеточная хвостовая часть содержит два участка фосфорилирования, находящихся в иммунорецепторном тирозиновом ингибиторном мотиве и иммунорецепторном тирозиновом мотиве переключения, что указывает на то, что PD-1 является негативным регулятором сигналов Т-клеточного рецептора TCR. Это согласуется со связыванием фосфатаз SHP-1 и SHP-2 с цитоплазматической хвостовой частью PD-1 при связывании лиганда. Кроме того, связывание PD-1 стимулирует E3-убиквитинлигазы CBL-b и c-CBL, которые запускают подавление Т-клеточного рецептора. PD-1 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, В-клеток и макрофагов, что указывает на то, что, по сравнению с CTLA-4, PD-1 осуществляет более широкую негативную регуляцию иммунных ответов.

PD-1 имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2, которые являются представителями семейства B7. Белок PD-L1 активируется на макрофагах и дендритных клетках (DC) в ответ на введение LPS и GM-CSF, и на Т-клетках и В-клетках при передаче сигнала TCR и В-клеточного рецептора, в то время как у мышей в покое мРНК PD-L1 может обнаруживаться в сердце, легких, тимусе, селезенке и почке. PD-L1 экспрессируется практически на всех опухолевых клеточных линиях мыши, включая миелому RA1,

мастоцитому P815 и меланому B16, при обработке IFN- γ . Экспрессия PD-L2 является наиболее ограниченной, и он экспрессируется в основном DC и несколькими опухолевыми линиями.

Несколько наборов данных указывают на то, что PD-1 и его лиганды осуществляют негативную регуляцию иммунных ответов. Было показано, что у мышей C57BL/6 и BALB/c с нокаутом PD-1 развивается волчаночный гломерулонефрит и дилатационная кардиомиопатия, соответственно. Обработка *in vitro* стимулированных антителом против CD3 T-клеток посредством PD-L1-Ig приводит к снижению пролиферации T-клеток и секреции IFN- γ . IFN- γ является ключевым провоспалительным цитокином, который способствует воспалительной активности T-клеток. Снижение пролиферации T-клеток также коррелировало со снижением секреции IL-2 и, взятые вместе, эти данные указывают на то, что PD-1 является негативным регулятором T-клеточных ответов.

Эксперименты с использованием DC с трансфицированным PD-L1 и экспрессирующих PD-1 трансгенных (Tg) CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток указывают на то, что CD8⁺ T-клетки являются более подверженными ингибированию PD-L1, хотя это может зависеть от силы передачи сигнала TCR. В соответствии с ролью в негативной регуляции CD8⁺ T-клеточных ответов с использованием модели хронической инфекции с вирусным вектором LCMV, группа Rafi Ahmed продемонстрировала, что взаимодействие PD-1-PD-L1 ингибирует активацию, экспансию и приобретение эффекторных функций вирус-специфическими CD8⁺ T-клетками, что может быть обращено вспять посредством блокирования взаимодействия PD-1-PD-L1.

Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках ингибирует противоопухолевую активность посредством связывания PD-1 на эффекторных T-клетках. Экспрессия PD-L1 на опухолях коррелирует со снижением выживаемости при злокачественных опухолях пищевода, поджелудочной железы и других типах злокачественных опухолей, что указывает на этот каскад как на мишень иммунотерапии. Запуск PD-1, экспрессируемого на моноцитах и активируемого при активации моноцитов посредством его лиганда PD-L1, индуцирует продуцирование IL-10, которое ингибирует функцию CD4 T-клеток.

У мышей экспрессия этого гена индуцируется в тимусе, когда инъецируют антитела против CD3 и большие количества тимоцитов претерпевают апоптоз. У мышей с дефектом этого гена, выведенных на фоне BALB/c, развивалась дилатационная кардиомиопатия, и они погибали от застойной сердечной недостаточности. Эти исследования указывают на то, что продукт этого гена также может быть важным для функции T-клеток и может участвовать в предупреждении аутоиммунных заболеваний.

Существует множество коммерчески доступных антител против PD1, которые включают пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, атезолизумаб, дуравалумаб и авелумаб.

NKG2D. NKG2D представляет собой трансмембранный белок, принадлежащий семейству NKG2 лектин-подобных рецепторов C-типа. NKG2D кодируется геном *KLRK1*, который находится в генном комплексе NK (NKC), находящемся на хромосоме 6 у мышей

и хромосоме 12 у человека. У мышей он экспрессируется NK-клетками, NK1.1⁺ T-клетками, $\gamma\delta$ T-клетками, активированными CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клетками и активированными макрофагами. У человека он экспрессируется NK-клетками, $\gamma\delta$ T-клетками и CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клетками. NKG2D распознает индуцированные собственные белки семейств MIC и RAET1/ULBP, которые появляются на поверхности подвергнутых стрессовому воздействию, злокачественной трансформации и инфицированных клеток.

Рецепторный комплекс NKG2D человека собирается в гексамерную структуру. NKG2D сам по себе образует гомодимер, чьи эктодомены служат для связывания лиганда. Каждый мономер NKG2D ассоциирован с димером DAP10. Эта ассоциация поддерживается ионным взаимодействием положительно заряженного аргинина, присутствующего в трансмембранном сегменте NKG2D, и негативно заряженных остатков аспарагиновой кислоты в обеих трансмембранных областях димера DAP10. DAP10 функционирует как адаптерный белок и передает сигнал после связывания лиганда посредством привлечения субъединицы p85 PI3K и комплекса Grb2-Vav1, которые ответственны за последующие события.

У мышей альтернативный сплайсинг образует две разных изоформы NKG2D: одну длинную (NKG2D-L) и одну короткую (NKG2D-S). NKG2D-L связывает DAP10 аналогично NKG2D человека. Напротив, NKG2D-S ассоциирует с двумя адаптерными белками: DAP10 и DAP12. DAP10 привлекает субъединицу p85 PI3K и комплекс Grb2 и Vav1. DAP12 содержит мотив ITAM и активирует передачу сигнала протеинкиназами Syk и Zap70.

NKG2D является основным распознаваемым рецептором для детекции и элиминации трансформированных и инфицированных клеток, поскольку его лиганды индуцируются в ходе клеточного стресса либо в результате инфекции, либо в результате геномного стресса, такого как в злокачественной опухоли. В NK-клетках, NKG2D служит в качестве активирующего рецептора, который сам по себе способен запускать цитотоксичность. Функцией NKG2D на CD8⁺ T-клетках является передача костимулирующих сигналов для их активации.

Лиганды NKG2D представляют собой индуцируемые собственные белки, которые полностью отсутствуют или присутствуют только на низких уровнях на поверхности нормальных клеток, но они сверхэкспрессируются инфицированными, трансформированными, стареющими и подвергнутыми стрессовому воздействию клетками. Их экспрессия регулируется на разных стадиях (транскрипция, стабилизация мРНК и белка, отщепление от клеточной поверхности) посредством различных стрессовых каскадов. Среди них, одним из наиболее выраженных стрессовых каскадов является ответ на повреждение ДНК. Генотоксический стресс, застревание репликации ДНК, плохо регулируемая пролиферация клеток при образовании опухоли, вирусная репликация и некоторые вирусные продукты активируют ATM- и ATR-киназы. Эти киназы инициируют каскад ответа на повреждение ДНК, который участвует в регуляции лиганда NKG2D. Таким образом, ответ на повреждение ДНК участвует в изменении

иммунной системы ввиду присутствия потенциально опасных клеток.

Все лиганды NKG2D являются гомологичными молекулам МНС класса I, и их подразделяют на два семейства: MIC и RAET1/ULBP. Коммерчески доступные антитела против NKG2D доступны от Invitrogen, Abcam, BioLegend, Bio X Cell, R&D Systems, EMD Millipore и Milteny Biotec.

Siglec-9. Вследствие aberrантного гликозилирования, присутствующего в злокачественной опухоли, множество O-связанных гликанов, содержащихся в MUC1, в основном, являются короткими и сиалированными, в противоположность длинным разветвленным цепям, наблюдаемым на MUC1, экспрессируемом нормальными эпителиальными клетками. В карциномах aberrантное O-связанное гликозилирование MUC1 может изменять взаимодействие MUC1 с лектинами иммунной системы и, таким образом, может влиять на взаимодействие опухоль-иммунная система. Siglec-9 экспрессируется преимущественно на миелоидных клетках. Siglec ("связывающие сиаловые кислоты иммуноглобулин-подобные лектины") представляют собой семейство связывающих сиаловую кислоту лектинов, которые экспрессируются на различных клетках иммунной системы. Цитоплазматические домены большинства Siglec содержат иммунорецепторные тирозиновые ингибиторные мотивы (ITIM), которые привлекают тирозинфосфатазы SHP-1 и SHP-2 и, таким образом, регулируют клетки врожденного и адаптивного иммунных ответов. Становится очевидным, что Siglec играют роль в иммунной супрессии злокачественной опухоли, поскольку гиперсиалирование, наблюдаемое в злокачественных опухолях, индуцирует связывание с этими лектинами.

III. Фармацевтические составы и лечение злокачественной опухоли

A. Злокачественные опухоли

Злокачественная опухоль возникает в результате разрастания клональной популяции клеток из ткани. Развитие злокачественной опухоли, называемое канцерогенезом, может быть смоделировано и охарактеризовано рядом путей. Ассоциация между развитием злокачественной опухоли и воспалением давно является общепризнанной. Воспалительный ответ вовлечен в защиту хозяина против микробной инфекции, а также он запускает репарацию и регенерацию тканей. Многочисленные данные указывают на связь между воспалением и риском развития злокачественной опухоли, т.е. воспаление может приводить к дисплазии.

Злокачественные клетки, на которые могут быть направлены способы по настоящему изобретению, включают, главным образом, любую клетку, которая экспрессирует MUC1, и, более конкретно, которая сверхэкспрессирует MUC1. Соответствующая злокачественная клетка может представлять собой клетку рака молочной железы, рака легкого, рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почки, рака желудка, рака печени, рака костей, гематологической злокачественной опухоли (например, лейкоз или лимфома), злокачественной опухоли нервных тканей, меланомы, рака яичника, рака яичка, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака влагалища или рака мочевого пузыря. Кроме того, способы по изобретению можно

применять к широкому диапазону видов, например, людям, не являющимся человеком приматам (например, обезьянам, павианам или шимпанзе), лошадям, крупному рогатому скоту, свиньям, овцам, козам, собакам, кошкам, кроликам, морским свинкам, песчанкам, хомячкам, крысам и мышам. Злокачественные опухоли также могут быть рецидивирующими, метастазирующими и/или имеющими множественную лекарственную резистентность, и способы по настоящему изобретению, в частности, могут быть применены к таким злокачественным опухолям, чтобы сделать их резектабельными, чтобы продлить или реиндуцировать ремиссию, чтобы ингибировать ангиогенез, чтобы предупредить или ограничить метастазирование и/или чтобы лечить злокачественные опухоли с множественной лекарственной резистентностью. На клеточном уровне это может транслироваться в уничтожение злокачественных клеток, ингибирование роста злокачественных клеток или иную реверсию или уменьшение злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

В. Составление и введение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конструкции антител против MUC1-C. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный органом регулирования федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, и, более конкретно, у человека. Термин "носитель" относится к разбавителю, эксципиенту или переносчику, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая жидкости нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Другие подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, солевой раствор, декстрозу, желатин, солод, рис, муку, известняк, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п.

Композиции могут быть составлены в качестве нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как анионы, происходящие из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, шавелевой, виннокаменной кислот, и т.д., и анионы, образованные с катионами, такими как катионы, происходящие из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Антитела по настоящему изобретению могут включать классические фармацевтические препараты. Введение этих композиций согласно настоящему изобретению будет проводиться любым общеизвестным путем при условии, что ткань-мишень является доступной через этот путь. Это включает пероральный, назальный, буккальный, ректальный, вагинальный или местный пути. Альтернативно введение может быть осуществлено посредством внутрикожной, подкожной, внутримышечной,

внутрибрюшинной или внутривенной инъекции. Такие композиции обычно вводят в качестве фармацевтически приемлемых композиций, описанных выше. Особый интерес представляет прямое внутриопухолевое введение, перфузия опухоли или локальное или регионарное введение в опухоль, например, в локальные или регионарные сосуды или лимфатическую систему, или в ложе резецированной опухоли.

Активные соединения также можно вводить парентерально или внутрибрюшинно. Растворы активных соединений в качестве свободного основания или фармацевтически приемлемых солей могут быть получены в воде в подходящей смеси с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

С. Комбинированные способы терапии

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что конструкции антител против MUC1-C, описанные в настоящем описании, можно использовать аналогичным образом совместно с химиотерапевтическим или радиотерапевтическим вмешательством, или другими способами лечения. Также может оказаться эффективным, в частности, комбинирование антител против MUC1-C/ECD с другими способами терапии, которые нацелены на отличающиеся аспекты функции MUC1, такими как пептиды и низкомолекулярные соединения, которые нацелены на цитоплазматический домен MUC1.

Для уничтожения клеток, ингибирования клеточного роста, ингибирования метастазирования, ингибирования ангиогенеза или иного обращения вспять или уменьшения злокачественного фенотипа опухолевых клеток с использованием способов и композиций по настоящему изобретению, как правило, клетку-"мишень" приводят в контакт с конструкцией антитела против MUC1-C по настоящему изобретению и по меньшей мере одним другим средством. Эти композиции могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клетки. Этот процесс может вовлекать приведение клеток в контакт с конструкцией антитела против MUC1-C по настоящему изобретению и одновременно другим средством(ом) или фактором(ами). Этого можно достигать путем приведения клетки в контакт с одной композицией или фармакологическим составом, которые включают оба средства, или путем приведения клетки в контакт с двумя разными композициями или составами одновременно, где одна композиция включает конструкцию антитела против MUC1-C по настоящему изобретению, а другая включает другое средство.

Альтернативно терапия конструкцией антитела против MUC1-C может предшествовать или следовать после лечения другим средством с интервалами в диапазоне от минут до недель. В вариантах осуществления, где другое средство и конструкцию антитела против MUC1 применяют отдельно к клетке, обычно необходимо

убедиться, что между моментами времени каждой доставки не пройдет значительный период времени, так чтобы средство и экспрессирующая конструкция все еще были способны преимущественно продемонстрировать комбинированный эффект на клетку. В таких случаях предполагается, что клетку можно приводить в контакт с обоими средствами в пределах 12-24 часов друг от друга и, более предпочтительно, в пределах приблизительно 6-12 часов друг от друга, причем наиболее предпочтительным является интервал только приблизительно 12 часов. В некоторых ситуациях может быть желательным значительное продление периода времени лечения, однако, где между соответствующими введениями проходит от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Также является возможным, чтобы было желательным более одного введения либо конструкции антитела против MUC1, либо другого средства. Можно использовать различные комбинации, где конструкция антитела против MUC1-С в соответствии с терапией по настоящему изобретению представляет собой "А", а другая терапия представляет собой "В", как проиллюстрировано ниже:

A/B/A	V/A/V	V/B/A	A/A/V	V/A/A	A/B/V	V/B/V/A	V/B/A/V
A/A/V/V	A/V/A/V	A/V/B/A	V/B/A/A	V/A/V/A	V/A/A/V	V/B/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/B/A/V	

Предусматриваются другие комбинации. Вновь, для достижения уничтожения клеток оба средства доставляют в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки.

Средства или факторы, пригодные для терапии злокачественной опухоли, включают любое химическое соединение или способ лечения, которые индуцируют повреждение ДНК при применении к клетке. Такие средства и факторы включают радиацию и волны, которые индуцируют повреждение ДНК, такие как радиационное излучение, микроволны, испускание электронов и т.п. Можно использовать различные химические соединения, также описываемые как "химиотерапевтические" или "генотоксические средства". Этого можно достигать путем облучения радиационным излучением локализованной области опухоли; альтернативно опухолевые клетки можно приводить в контакт со средством путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции.

Предусматривается применение различных классов химиотерапевтических средств совместно с настоящим изобретением. Например, предусматриваются селективные антагонисты рецепторов эстрогена ("SERM"), такие как Тамоксифен, 4-Гидрокситамоксифен (Афимоксфен), Фаслодекс, Ралоксифен, Базедоксифен, Кломифен, Фемарелл, Лазофоксифен, Ормелоксифен и Торемифен.

Химиотерапевтические средства, предусматриваемые для применения, включают, например, камптотecin, актиномицин-D, митомицин С. Изобретение также охватывает применение комбинации одного или нескольких повреждающих ДНК средств, как на основе радиации, так и фактических соединений, как например, применение

рентгеновских лучей с цисплатином или применение цисплатина с этопозидом. Средство можно получать и использовать в качестве комбинированной терапевтической композиции или набора, путем комбинирования его с пептидом MUC1, как описано выше.

Белок теплового шока 90 представляет собой регуляторный белок, встречающийся во многих эукариотических клетках. Было показано, что ингибиторы HSP90 являются пригодными для лечения злокачественной опухоли. Такие ингибиторы включают Гелданамицин, 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин, PU-H71 и Рифабутин.

Также предусматриваются средства, которые прямо сшивают ДНК или образуют аддукты. Можно использовать средства, такие как цисплатин, и другие алкилирующие ДНК средства. Цисплатин широко используется для лечения злокачественной опухоли с эффективными дозировками, используемыми в клинических применениях, составляющими 20 мг/м^2 в течение 5 суток каждые три недели на протяжении всего трех курсов. Цисплатин не всасывается перорально и, таким образом, должен доставляться посредством инъекции внутривенно, подкожно, внутриопухолевым путем или внутрибрюшинно.

Средства, которые повреждают ДНК, также включают соединения, которые препятствуют репликации ДНК, митозу и расхождению хромосом. Такие химиотерапевтические соединения включают адриамицин, также известный как доксорубицин, этопозид, верапамил, подофиллотоксин и т.п. Широко используемые в клинических условиях для лечения новообразований, эти соединения вводят посредством болюсных инъекций внутривенно в дозах в диапазоне от $25\text{-}75 \text{ мг/м}^2$ с интервалами 21 сутки для доксорубицина, до $35\text{-}50 \text{ мг/м}^2$ для этопозида внутривенно, или в двукратной внутривенной дозе перорально. Также предусматриваются ингибиторы микротрубочек, такие как таксаны. Эти молекулы представляют собой дитерпены, продуцируемые растениями рода *Taxus*, и включают паклитаксел и доцетаксел.

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста включают Ирессу. mTOR, мишень рапамицина у млекопитающих, также известный как FK506-связывающий ассоциированный с 12-рапамицином белок 1 (FRAP1), представляет собой сериновую/треониновую протеинкиназу, которая регулирует клеточный рост, пролиферацию клеток, подвижность клеток, выживание клеток, синтез белков и транскрипцию. Таким образом, рапамицин и его аналоги ("рапалоги") предусматриваются для применения в терапии злокачественной опухоли в соответствии с настоящим изобретением.

Другой возможной терапией является TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа) - цитокин, вовлеченный в системное воспаление, и представитель группы цитокинов, который стимулирует реакцию острой фазы. Основной ролью TNF является регуляция иммунных клеток. TNF также способен индуцировать гибель апоптотических клеток, индуцировать воспаление и ингибировать образование опухоли и репликацию вируса.

Средства, которые нарушают синтез и точность предшественников нуклеиновых кислот и субъединиц, также приводят к повреждению ДНК. В связи с этим, был

разработан ряд предшественников нуклеиновых кислот. Особенно пригодными являются средства, которые прошли тщательное тестирование и являются хорошо доступными. По сути, средства, такие как 5-фторурацил (5-FU), предпочтительно используются неопластической тканью, что делает это средство особенно пригодным для нацеливания на неопластические клетки. Хотя он и является достаточно токсичным, 5-FU применим для широкого диапазона носителей, включая местные, однако часто используется внутривенное введение в дозах в диапазоне от 3 до 15 мг/кг/сутки.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают то, что широко известно как γ -лучи, рентгеновские лучи и/или прямая доставка радиоизотопов в опухолевые клетки. Также предусматриваются другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны и УФ-излучение. Наиболее вероятно, что все из этих факторов обеспечивают широкий диапазон повреждений ДНК в отношении предшественников ДНК, репликации и репарации ДНК, и сборки и поддержания хромосом. Диапазоны дозирования для рентгеновских лучей находятся в пределах от суточных доз 50-200 рентген для длительных периодов времени (3-4 недели) до однократных доз 2000-6000 рентген. Диапазоны дозировок для радиоизотопов широко варьируются и зависят от времени полужизни изотопа, силы и типа испускаемого радиационного излучения и поглощения неопластическими клетками.

Конкретным способом доставки радиотерапевтических средств являются наночастицы. Например, золотые наночастицы (NP) были первыми радиоэнхансерами на основе NP, протестированными на мелких животных для терапии опухоли. Было обнаружено, что их способность повышать эффективность дистанционной лучевой терапии опосредуется фотоэлектрическим эффектом и ливнем Оже-электронов, которые возникают в результате взаимодействий между атомами золота и низкоэнергетическими фотонами, генерируемыми внешним пучком. Исходя из этих ранних данных, были разработаны различные неорганические NP, чтобы аналогичным образом повышать эффективность лучевой терапии, включая NP, состоящие из висмута, гафния и гадолия, среди прочих. Для повышения интернализации радиоэнхансеров в доклинических моделях опухолей пробовали различные подходы, в том числе функционализацию NP посредством антител, для способствования нацеливанию на опухоль. Усилия также были сфокусированы на оптимизации времени облучения путем визуализации той же конструкции NP посредством компьютерной томографии (СТ) или посредством магнитно-резонансной томографии.

NP на основе оксида гафния (NBTXR3), инъецируемые внутрь опухоли в форме гидрогеля, эффективно визуализируются посредством КТ, демонстрируя персистенцию внутри опухолевого ложа после имплантации, а также ограниченную диффузию за пределами области инъекции. Параллельно, содержавшие гадолий NP (AGuIX), которые вводили внутривенно (в/в), успешно отслеживали посредством магнитно-резонансной томографии, позволяя проведение лучевой терапии только после локализации опухоли. Оба подхода являются перспективными и подтверждают общую

способность неорганических NP служить в качестве радиоэнхансеров в клинических применениях. Хотя в/в инъекция визуализирующих агентов обеспечивает доступность множества злокачественных опухолей, было показано, что NP, вводимые в/в путем, быстро вымываются из опухолей без интернализации опухолевыми клетками, как наблюдали в испытании NANO-RAD (NCT02820454).

В недавнем исследовании Detappe *et al.* (2020) предположили, что NP, которые сконструированы для персистенции в окружении опухоли, могут более эффективно повышать дозу фракционированной лучевой терапии и могут устранять необходимость в повторном введении радиоэнхансера, что может снизить потенциальные осложнения и/или связанные с лечением расходы. Авторы конъюгировали множество NP с одним опухолеспецифическим моноклональным антителом (mAb) для повышения дозы радиоэнхансера, доставляемой в опухолевые клетки. В качестве мишени для этих конъюгированных с антителом NP они выбрали муцин 1 (MUC1), исходя из его высоких уровней экспрессии среди различных солидных и гематологических опухолей. Для сравнения радиоэнхансерных свойств конъюгированных с антителом против MUC1-C NP с их неконъюгированными аналогами авторы использовали тот же тип наночастиц, который использовался в испытании NANO-RAD, и обе композиции вводили в комбинации либо с однократной высокой дозой внешнего пучка, либо с фракционированной лучевой терапией, и эффекты лечения сравнивали в различных моделях рака легкого и тройного негативного рака молочной железы. Было выявлено, что %ID/г анти-MUC1-C/NP, которые накапливались в опухолях, был сходен с %ID/г их неконъюгированных аналогов. Важно, анти-MUC1-C/NP продемонстрировали более длительное удержание в микроокружении опухоли *in vivo*; в результате усиление радиационного излучения сохранялось в ходе фракционированной терапии (3×5,2 Гр). Авторы обнаружили, что путем введения анти-MUC1-C/NP с ХРТ было возможно значительно усилить ингибирование роста опухоли и продлить общую выживаемость животного (46,2±3,1 суток) по сравнению с введением контрольных NP с ХРТ (31,1±2,4 суток) или с ХРТ отдельно (27,3±1,6 суток; P<0,01, логарифмический ранговый критерий).

Кроме того, также предусматривается, что можно использовать иммунотерапию, гормональную терапию, терапию токсинами и хирургическую операцию. В частности, можно использовать средства таргетной терапии, такие как Авастин, Эрбитукс, Гливек, Герцептин и Ритуксан.

Одним особенно преимущественным подходом для комбинированной терапии является выбор второго средства, которое нацелено на MUC1. В совместно рассматриваемой заявке, поданной авторами настоящего изобретения, описаны способы ингибирования MUC1-положительной опухолевой клетки у индивидуума, включающие введение указанному индивидууму пептида MUC1 по меньшей мере из 4 последовательно расположенных остатков MUC1 и не более 20 последовательно расположенных остатков MUC1, и содержащие последовательность CQC, где N-концевой цистеин CQC закрыт на

его NH₂-конце по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не должен соответствовать нативной трансмембранной последовательности MUC-1. Пептид может содержать по меньшей мере 5 последовательно расположенных остатков MUC1, по меньшей мере 6 последовательно расположенных остатков MUC1, по меньшей мере 7 последовательно расположенных остатков MUC1, по меньшей мере 8 последовательно расположенных остатков MUC1, и последовательность, более конкретно, может содержать CQCR (SEQ ID NO: 15), CQCRR (SEQ ID NO: 16), CQCRRR (SEQ ID NO: 17), CQCRRRR (SEQ ID NO: 18), CQCRRK (SEQ ID NO: 19), CQCRRKN (SEQ ID NO: 20) или RRRRRRRRCQCRRKN (SEQ ID NO: 21). Пептид может содержать не более 10 последовательно расположенных остатков, 11 последовательно расположенных остатков, 12 последовательно расположенных остатков, 13 последовательно расположенных остатков, 14 последовательно расположенных остатков, 15 последовательно расположенных остатков, 16 последовательно расположенных остатков, 17 последовательно расположенных остатков, 18 последовательно расположенных остатков или 19 последовательно расположенных остатков MUC1. Пептид может быть слит с доменом для доставки в клетки, таким как поли-D-R, поли-D-P или поли-D-K. Пептид может иметь все L-аминокислоты, все D-аминокислоты, или смесь L- и D-аминокислот. См. патент США № 8524669.

Вариант этой технологии описан в патентной заявке США с серийным номером № 13/026858. В этой заявке описаны способы ингибирования MUC1-положительных злокачественных клеток, включающие приведение в контакт клетки с пептидом MUC1 из по меньшей мере 4 последовательно расположенных остатков MUC1 и не более 20 последовательно расположенных остатков MUC1 и содержащие последовательность CQC, где (i) N-концевой цистеин CQC закрыт на его NH₂-конце по меньшей мере одним аминокислотным остатком, который не должен соответствовать нативной трансмембранной последовательности MUC1; и (ii) пептид содержит 3-5 последовательно расположенных положительно заряженных аминокислотных остатков в дополнение к положительно заряженным аминокислотным остаткам, соответствующим нативным остаткам MUC1. MUC1-положительная клетка может представлять собой клетку солидной опухоли, такую как клетка рака легкого, клетка злокачественной опухоли 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 толстого кишечника, клетка рака прямой кишки, клетка рака тела матки, клетка рака шейки матки, клетка рак яичника, клетка рака яичка, клетка рака кожи или клетка рака пищевода. MUC1-положительная клетка может представлять собой клетку лейкоза или миеломы, таких как острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественная миелома. Пептид может представлять собой сшитый пептид, циклизованный пептид, пептидомиметик или пептоид. Кроме того, способ может включать приведение клетки в контакт со вторым средством против злокачественной опухоли, например, где второе средство против злокачественной опухоли приводят в

контакт до пептида, после пептида или одновременно с пептидом. Ингибирование может включать ингибирование роста злокачественных клеток, пролиферацию злокачественных клеток или индукцию гибели злокачественных клеток, например, посредством апоптоза.

Специалист в данной области может см. "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, Chapter 33, в частности, страницы 624-652. Не обязательно будет происходить некоторое варьирование дозировки в зависимости от состояния индивидуума, подвергаемого лечению. Лицо, ответственное за введение, будет, в любом случае, определять соответствующую дозу для конкретного индивидуума. Более того, для введения человеку препараты должны удовлетворять стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, согласно требованиям Офиса биологических стандартов FDA.

IV. Наборы

В следующих вариантах осуществления предусматриваются наборы для применения со способами, описанными в настоящем описании. Наборы, таким образом, содержат в подходящем контейнере антительную конструкцию, как описано в настоящем описании. Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Наборы также могут включать инструкции по применению антительных конструкций.

Контейнеры набора, как правило, включают по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнеры, в которые может быть помещена конструкция антитела, или, предпочтительно, подходящим образом распределена на аликвоты. Наборы также включают приспособление для вмещения контейнеров с антителом, антигеном и любым другим реагентом в тесном ограниченном пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать изготавливаемые литьем под давлением или литьем с раздувом пластмассовые контейнеры, в которых содержатся желаемые флаконы.

V. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления. Специалистам в данной области должно быть понятно, что способы, описанные в примерах, которые следуют далее, представляют собой способы, разработанные авторами изобретения для надлежащего функционирования на практике вариантов осуществления, и, таким образом, они могут считаться предпочтительными способами для его применения на практике. Однако специалисты в данной области должны, ввиду настоящего изобретения, понять, что многие изменения можно вносить в конкретные варианты осуществления, которые описаны, и все еще получать подобный или сходный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

ПРИМЕР 1

Биспецифическое антитело h3D1-hCD3 с отдельной легкой цепью. h3D1-hCD3 представляет собой гомодимер, который содержит бивалентный связывающий паратоп h3D1 и бивалентный связывающий hCD3 паратопы вместе с мутацией LALA-PG для

устранения какого-либо опосредуемого Fc-рецептором эффекторного механизма. Конструкцию, содержащую формат scFv, получали путем слияния различных доменов двух антител в следующем порядке: N-конец ScFv, содержащий VH-домен антитела 3D1 вместе с CH1-доменом, за которым следует Fc-область IgG1 человека. C-конец Fc слит с доменами VL и VH антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и фолдинг индивидуальных доменов. Также получали вторую конструкцию, содержащую области VL и CL h3D1. Когда эти конструкции совместно экспрессируют в клетках CHO, это приводит к образованию канонической структуры иммуноглобулина путем образования пары между легкой цепью h3D1 и тяжелой цепью h3D1, а также приводит к образованию гомодимера белка через дисульфидные мостики в Fc-области подобно нативной молекуле иммуноглобулина. Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G), которые устраняют связывание с Fc-рецепторами кровяных клеток и C1q, компонентом системы комплемента, и, таким образом, это может минимизировать вторичные иммунологические реакции, такие как синдром высвобождения цитокинов и активация комплемента. См. фиг.1А.

Биспецифическое антитело h7B8-1-hCD3. h7B8-1-hCD3 представляет собой мономер, содержащий отдельную легкую цепь. Аффинность гуманизированного 7B8-1 (h7B8-1) в 10 раз превышает аффинность гуманизированного 3D1. Таким образом, биспецифическая конструкция h7B8-1-hCD3 была получена так, чтобы она имела один участок связывания MUC1, путем включения мономерного Fc, который имеет лучшую стабильность и не димеризуется. Конструкцию получали путем слияния разных доменов антитела 7B8-1 и антитела против CD3 в следующем порядке: N-конец конструкции, содержащий VH-домен антитела 7B8-1 вместе с CH1-доменом, за которым следует мономерная Fc-область человека. C-конец мономерного Fc человека слит с VL- и VH-доменами антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Также экспрессировали вторую конструкцию, содержащую VL- и VH-домены антитела h3D1, которая может образовывать пару с VH h3D1. См. фиг.1В.

Биспецифическое антитело h3D1-hCD3. h3D1-hCD3 представляет собой гетеродимер, в котором scFv сведены вместе через связывание по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1 и одновалентный участок связывания для CD3 вследствие гетеродимеризации путем применения технологии "выступ в полости" с указанными мутациями (T366S, T368A, Y407V против T366W) в Fc-области. Технология "выступ в полости" использует большие аминокислоты в одной цепи для создания "выступа" и использует меньшие аминокислоты для соответствующей "полости" на другой цепи. Кроме того, электростатическое движение двух противоположно заряженных тяжелых цепей в комбинации с технологией одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) обеспечивает надлежащую сборку цепи. Конструкцию получали путем слияния разных доменов гуманизированного антитела 3D1 и гуманизированного антитела против CD3 в следующем порядке: N-конец

конструкции, содержащий VH-домен антитела h3D1, слит с VL-доменом с использованием глицин-серинового линкера, за которым следует Fc-область IgG1 человека. С-конец Fc слит с доменами VL и VH антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Fc-область содержит три мутации (T366S, T368A, Y407V), которые образуют полость, и другую мутацию (K392D), которая создает электростатическое движение для надлежащего спаривания цепей. Была получена вторая конструкция, содержащая VH-домен, слитый с VL-доменом через глицин-сериновый линкер, за которым следует Fc-область hIgG1 с мутацией, которая образует выступ (T366W). Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G), которые устраняют связывание с Fc-рецепторами кровяных клеток, и C1q, компонент системы комплемента, и, тем самым, он минимизирует вторичные иммунологические реакции, такие как синдром высвобождения цитокинов и активация комплемента. См. фиг.1С.

Биспецифическое антитело h3D1-hCD3 (scFv). Этот формат биспецифического антитела имеет одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который имеет один участок связывания для каждого из MUC1 и CD3 и остается мономером вследствие указанных мутаций. Конструкция была получена путем слияния VL-домена h3D1 с Fc IgG1 человека с последующим присоединением VL-домена гуманизированного антитела против CD3. VH-домен h3D1 добавляли на N-конец и VH-домен гуманизированного антитела против CD3 добавляли на С-конец конструкции с использованием глицин-серинового линкера на обоих концах. Fc IgG1 человека содержит мутации (L234A, L235A, P329G) для устранения опосредуемого Fc-рецептором эффекторного механизма, а также связывания C1q. См. фиг.1D.

Триспецифическое антитело h3D1-hCD3-hPD1. В этом формате двойного активатора иммунных клеток (DICE) используется та же стратегия гетеродимеризации, что и на фиг.1С, однако он включает участок связывания для PD1 на N-конце второй конструкции. Добавление участка связывания PD-1 усиливает активацию Т-клеток путем блокирования ингибирования точки контроля, вызываемого взаимодействием PD-1 и PD-L1. См. фиг.1E.

Триспецифическое антитело h3D1-hCD3-hPD1. h3D1-hCD3-hPD1 представляет собой гетеродимер, в котором scFv сведены вместе посредством связывания по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1, и одновалентный участок связывания для CD3, и одновалентный участок связывания для PD1. Для гетеродимеризации использовалась технология "выступ в полости" с указанными мутациями (T366S, T368A, Y407V против T366W) в Fc-области. Конструкцию получали путем слияния различных доменов гуманизированного антитела h3D1 и гуманизированных антител против CD3 и PD1 в следующем порядке: N-конец конструкции, содержащий VL домен антитела h3D1, слит с VH-доменом с использованием глицин-серинового линкера, за которым следует Fc-область IgG1 человека. С-конец Fc слит с VH- и VL-доменами антитела против CD3 через глицин-

сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Этот двойной активатор иммунных клеток (DICE) также включает участок связывания для PD1 на N-конце второй конструкции. Добавление участка связывания PD-1 усиливает активацию Т-клеток путем блокирования ингибирования точки контроля, вызываемого взаимодействием PD-1 и PD-L1. Область Fc содержит три мутации (T366S, T368A, Y407V), которые образуют полость, и другую мутацию (K392D), которая обеспечивает электростатическое движение для надлежащего спаривания цепей. Получали вторую конструкцию, содержащую VL-домен, слитый с VH-доменом через глицин-сериновый линкер, за которым следовала Fc-область hIgG1 с мутацией, которая образует выступ (T366W). Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G), которые устраняют связывание с Fc-рецепторами кровяных клеток, и C1q, компонентом системы комплемента, и, тем самым, это может минимизировать вторичные иммунологические реакции, такие как синдром высвобождения цитокинов и активация комплемента. См. фиг. 1F.

Триспецифическое антитело h7B8-1-hCD3-hPD1. h7B8-1-hCD3-hPD1 представляет собой гетеродимер, в котором scFv сведены вместе посредством связывания по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1 и одновалентный участок связывания для CD3 и одновалентный участок связывания для PD1. Для гетеродимеризации использовалась технология "выступ в полости" с указанными мутациями (T366S, T368A, Y407V против T366W) в Fc-области. Конструкцию получали путем слияния различных доменов гуманизированного антитела h7B8-1 и гуманизированных антител против CD3 и PD1 в следующем порядке: N-конец конструкции, содержащий VH домен антитела h7B8-1, слит с VL-доменом с использованием глицин-серинового линкера, за которым следует Fc-область IgG1 человека. C-конец Fc слит с VH- и VL-доменами антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Этот двойной активатор иммунных клеток (DICE) также включает участок связывания для PD1 на N-конце второй конструкции. Fc-область содержит три мутации (T366S, T368A, Y407V), которые образуют полость, и другую мутацию (K392D), которая обеспечивает электростатическое движение для надлежащего спаривания цепей. Получали вторую конструкцию, содержащую VH-домен, слитый с VL-доменом через глицин-сериновый линкер, за которым следовала Fc-область hIgG1 с мутацией, которая образует выступ (T366W). Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G), которые устраняют связывание с Fc-рецепторами кровяных клеток, и C1q, компонентом системы комплемента, и, тем самым, это может минимизировать вторичные иммунологические реакции, такие как синдром высвобождения цитокинов и активация комплемента. См. фиг. 1G.

Триспецифическое антитело h7B8-1-hCD3-hPD1. h7B8-1-hCD3-hPD1 представляет собой гетеродимер, в котором scFv сведены вместе посредством связывания по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для

MUC1, и одновалентный участок связывания для CD3, и одновалентный участок связывания для PD1. Для гетеродимеризации использовалась технология "выступ в полости" с указанными мутациями (T366S, T368A, Y407V против T366W) в Fc-области. Конструкцию получали путем слияния различных доменов гуманизированного антитела h7B8-1 и гуманизированных антител против CD3 и PD1 в следующем порядке: N-конец конструкции, содержащий VL домен антитела h7B8-1 слит с VH-доменом с использованием глицин-серинового линкера, за которым следует Fc-область IgG1 человека. C-конец Fc слит с VH- и VL-доменами антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Этот двойной активатор иммунных клеток (DICE) также включает участок связывания для PD1 на N-конце второй конструкции. Fc-область содержит три мутации (T366S, T368A, Y407V), которые образуют полость, и другую мутацию (K392D), которая обеспечивает электростатическое движение для надлежащего спаривания цепей. Получали вторую конструкцию, содержащую VL-домен, слитый с VH-доменом через глицин-сериновый линкер, за которым следовала Fc-область hIgG1 с мутацией, которая образует выступ (T366W). Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G). См. фиг. 1Н.

Биспецифическое антитело h7B8-1-hCD3. h7B8-1-hCD3 представляет собой гетеродимер, в котором scFv сведены вместе посредством связывания по типу "выступ в полости". Эта конструкция имеет двухвалентный участок связывания для MUC1 и одновалентный участок связывания для CD3 вследствие гетеродимеризации с использованием технологии "выступ в полости" с указанными мутациями (T366S, T368A, Y407V против T366W) в Fc-области. В технологии "выступ в полости" используются большие аминокислоты в одной цепи для создания "выступа" и используются аминокислоты меньшего размера для соответствующей "полости" в другой цепи. Кроме того, электростатическое движение двух противоположно заряженных тяжелых цепей в комбинации с технологией одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) обеспечивает надлежащую сборку цепи. Конструкцию получали путем слияния разных доменов гуманизированного антитела 7B8-1 и гуманизированного антитела против CD3 в следующем порядке: N-конец конструкции, содержащий VH-домен антитела h7B8-1, слит с VL-доменом с использованием глицин-серинового линкера, за которым следует Fc-область IgG1 человека. C-конец Fc слит с VL- и VH-доменами антитела против CD3 через глицин-сериновый линкер, который обеспечивает гибкость и укладку индивидуальных доменов. Fc-область содержит три мутации (T366S, T368A, Y407V), которые образуют полость, и другую мутацию (K392D), которая обеспечивает электростатическое движение для надлежащего спаривания цепей. Получали вторую конструкцию, содержащую VH-домен, слитый с VL-доменом через глицин-сериновый линкер, за которым следовала Fc-область hIgG1 с мутацией, которая образует выступ (T366W). Fc IgG1 человека включает три мутации (L234A, L235A, P329G), которые устраняют связывание с Fc-рецепторами кровяных клеток, и C1q, компонентом системы комплемента, и, тем самым, это может минимизировать вторичные иммунологические реакции, такие как синдром

высвобождения цитокинов и активация комплемента. См. фиг.1I.

Биспецифическое антитело h3D1-hCD3 (scFv) Эта форма биспецифического антитела имеет одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который имеет один участок связывания для каждого из MUC1 и CD3 и остается мономером вследствие указанных мутаций. Конструкция была получена путем слияния VL-домена h7B8-1 с Fc IgG1 человека с последующим присоединением VL-домена гуманизированного антитела против CD3. VH-домен h7B8-1 добавляли на N-конец и VH-домен гуманизированного антитела против CD3 добавляли на C-конец конструкции с использованием глицин-серинового линкера на обоих концах. Fc IgG1 человека содержит мутации (L234A, L235A, R329G) для устранения опосредуемого Fc-рецептором эффекторного механизма, а также связывания C1q. См. фиг.1J.

Очистка различных биспецифических антител. Все указанные конструкции экспрессировали в клетках CHO-K1 и получали клоны единичных клеток для каждого биспецифического формата. Клетки клонов увеличивали в количестве и поддерживали суспензионные культуры, и биспецифические антитела очищали с использованием колонок с белком А. Очищенные белки проверяли посредством SDS-PAGE. Дорожки 1-3 содержат указанные биспецифические белки в восстанавливающих условиях. Дорожки 4-6 содержат те же белки в невосстанавливающих условиях. Белок D является одноцепочечным с молекулярной массой 78500 дальтон, и он имеет один и тот же размер в дорожках с восстановлением и без восстановления. Белок A имеет две легких цепи по 23515 дальтон и более крупные фрагменты массой 75679 дальтон каждый. Эти полосы наблюдаются в восстанавливающих условиях геля, и в невосстанавливающих условиях наблюдается полоса, соответствующая приблизительно 200000 дальтон. Белок B имеет более крупную цепь размером 75679 дальтон и легкую цепь размером 23885 дальтон; они наблюдаются в восстанавливающих условиях, и в невосстанавливающих условиях наблюдается полоса, соответствующая 100000. Эти результаты подтверждают получение правильных белков. См. фиг.2.

Оценка связывания биспецифического антитела h3D1-hCD3 с MUC1 клеточной поверхности посредством проточной цитометрии на клеточной линии аденокарциномы молочной железы ZR75-1. Клетки ZR75-1 собирали и инкубировали с 1% BSA/PBS для блокирования участков неспецифического связывания в течение 20 мин и инкубировали с 4 мкг/мл тестируемого антитела (биспецифические антитела) или изотипического контрольного IgG1-антитела. В качестве отрицательного и положительного контролей связывания использовали совпадающие по изотипу IgG1 и h3D1, соответственно. После инкубации в течение 60 минут клетки промывали 2х посредством PBS. Клетки инкубировали с соответствующим вторичным антителом в течение 45 мин и промывали 3х посредством PBS. В качестве вторичного реагента использовали конъюгированный с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) F(ab')₂ козы против иммуноглобулинов человека. Связывание антитела с клеточной поверхностью оценивали с использованием проточной цитометрии и данные анализировали с использованием программного обеспечения

FlowJo. См. фиг.3.

Оценка связывания биспецифического антитела h3D1-hCD3 с CD3 клеточной поверхности посредством проточной цитометрии на линии Т-клеток Jurkat. Клетки Jurkat собирали и инкубировали с 1% BSA/PBS для блокирования участков неспецифического связывания в течение 20 мин и инкубировали с 4 мкг/мл тестируемого антитела (биспецифические антитела) или изотипического контрольного IgG1-антитела. В качестве отрицательного и положительного контролей связывания использовали совпадающие по изотипу IgG1 и антитело против hCD3. После инкубации в течение 60 минут клетки промывали 2х посредством PBS. Клетки инкубировали с соответствующим вторичным антителом в течение 45 мин и промывали 3х посредством PBS. В качестве вторичного реагента использовали конъюгированный с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) F(ab')₂ козы против иммуноглобулинов человека. Связывание антитела с клеточной поверхностью оценивали с использованием проточной цитометрии и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. См. фиг.4.

Активация Т-клеток биспецифическими антителами в клетках, эндогенно экспрессирующих MUC1 (ZR75-1). Клетки-мишени (ZR75-1, клетки аденокарциномы молочной железы) высевали в среде для роста в 96-луночном планшете (10000 клеток/луночка) и инкубировали в течение ночи. К клеткам добавляли различные концентрации биспецифических антител (D, B или A), начиная с 20 мкг/мл с 2-кратным серийным разведением, а затем эффекторные клетки TCR/CD3 (NFAT-Jurkat, 100000 клеток/луночка) и инкубировали в течение 6 часов. Добавляли реагент Bio-Glo™ и люминесценцию количественно определяли с использованием устройства для считывания Molecular Devices FilterMax F5. Данные аппроксимировали к кривой 4PL с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. См. фиг.5A

Активация Т-клеток биспецифическими антителами. Клетки-мишени (ZR75-1, клетки аденокарциномы молочной железы) высевали в среду для роста в 96-луночном планшете (40000 клеток/луночка) и инкубировали в течение ночи. К клеткам добавляли различные концентрации биспецифических антител (B или A) начиная с 30 мкг/мл с 3-кратным серийным разведением, а затем эффекторные клетки TCR/CD3 (NFAT-Jurkat, 100000 клеток/луночка) и инкубировали в течение 6 часов. Добавляли реагент Bio-Glo™ и люминесценцию количественно определяли с использованием устройства для считывания Molecular Devices FilterMax F5. Данные аппроксимировали к кривой 4PL с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. См. фиг.5B.

Активация Т-клеток биспецифическими антителами в клетках со стабильной экспрессией НСТ116/вектор и НСТ116/MUC1. Клетки НСТ116, экспрессировавшие MUC1 (НСТ/MUC1) или вектор (НСТ116/вектор) (10000 клеток/луночка), обрабатывали указанными биспецифическими антителами (D, B или A), начиная с 10 мкг/мл с 3-кратными серийными разведениями и NFAT-Jurkat, 100000 клеток/луночка, и инкубировали в течение 6 часов. Добавляли реагент Bio-Glo™ и люминесценцию количественно определяли с использованием устройства для считывания Molecular Devices FilterMax F5.

Данные аппроксимировали к кривой 4PL с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. См. фиг.5С.

Связывание бипаратопного биспецифического компонента против MUC1-С с антигеном MUC1-С. Связывание бипаратопного биспецифического компонента против MUC1-С с антигеном MUC1-С определяли посредством ELISA с использованием положительного контроля (3D1) и среды в качестве отрицательного контроля. Результаты представлены в таблице ниже:

Таблица 6 - ELISA (для проверки трансфекции) для бипаратопного биспецифического антитела (конструкция 4)		
	OD	
Супернатант (3 сутки)	2,39	2,338
Супернатант (7 сутки)	2,06	2,335
Только среда	0,046	0,47
положительный контроль, 1 мкг/мл 3D1	2,681	2,786

ПРИМЕР 2 - ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОНСТРУКЦИЙ АНТИТЕЛ

1) h3D1(VH-VL)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 3D1-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека-G4S-вариабельная область легкой цепи антитела против CD3-(G4S)3-вариабельная область тяжелой цепи антитела против CD3:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSNFWM
 NWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT
 AMYYCARSYYRSAWFA YWGQGLTVTVSLGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVT
 PKEKVTITCRASQSIGTSHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTIN
 SLEAEDAATYYCQQSNNWPLTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
 TCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE
 DFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG
 SLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVDK
 SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:
 22)

2) h3D1(VH-VL)-hFc-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 3D1-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSNFWM
 NWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT

AMYYCARSYYRSAWFAYWGQGLVTVSLGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVT
 PKEKVTITCRASQSIGTSHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTIN
 SLEAEDAATYYCQQSNNWPLTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)

3) h3D1(VL-VH)-hFc-hCD3(VH-VL)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 3D1-(G4S)3-
 вариабельная область тяжелой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека-G4S-вариабельная область
 тяжелой цепи антитела против CD3-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи антитела
 против CD3:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSH
 WYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQSNNW
 PLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSN
 FWMNWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLK
 ASDTAMYYCARSYYRSAWFAYWGQGLVTVSLGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSAFLVSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLVESGGGLVQP
 GGS LRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKS
 KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGG
 SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL
 ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
 NO: 24)

4) h3D1(VL-VH)-hFc-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 3D1-(G4S)3-
 вариабельная область тяжелой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSH
 WYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQSNNW
 PLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSN
 FWMNWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLK
 ASDTAMYYCARSYYRSAWFAYWGQGLVTVSLGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

5) h7B8-1(VH-VL)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 7B8-1-(G4S)3-

вариабельная область легкой цепи 7B8-1-G4S-Fc IgG1 человека-G4S-вариабельная область легкой цепи антитела против CD3-(G4S)3-вариабельная область тяжелой цепи антитела против CD3:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFNYFWIE
WVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM
YYCARYDYTSSMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQQNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDREV
TITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQP
EDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVD
KSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 26)

6) h7B8-1(VH-VL)-hFc-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 7B8-1-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи 7B8-1-G4S-Fc IgG1 человека:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFNYFWIE
WVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM
YYCARYDYTSSMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQQNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

7) h7B8-1(VL-VH)-hFc-CD3 (VH-VL)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 7B8-1-(G4S)3-вариабельная область тяжелой цепи 7B8-1-G4S-Fc IgG1 человека-G4S-вариабельная область легкой цепи антитела против CD3-(G4S)3-вариабельная область тяжелой цепи антитела против CD3:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSG
TSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ
QNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS
GFTFNYFWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQW
SSLKASDTAMYYCARYDYTSSMDYWGQGLTVTVSSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLVSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLVESGGGLVQP
 GGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISV
 DSKSNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGSDSWYFDVWVGQGLTVTVSSGGGGSG
 GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
 TSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 28)

8) h7B8-(VL-VH)-hFc-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 7B8-1-(G4S)3-
 вариабельная область тяжелой цепи 7B8-1-G4S-Fc IgG1 человека:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSG
 TSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ
 QNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS
 GFTFNFWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQW
 SSLKASDTAMYYCARYDYTSSMDYWQGLTVTVSSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29)

9) h3D1(VH-CH1)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv

VH гуманизированного антитела против MUC-1 3D1, CH1 IgG1 человека, Fc IgG1
 человека с мутациями LALA-PG, линкер=VL антитела против CD3 человека, линкер=VH
 антитела против CD3 человека:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSNFWMNWVRQMPGKGLEWMGQIY
 PGDGDNTYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSYYRSAWFAYW
 GQGLTVTVSLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSDIQMTQSP
 SLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSG
 TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV
 ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYAD
 SVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGSDSWYFDVWVGQGLTVT
 VSS (SEQ ID NO: 30)

10) h3D1 (VL-CL)

VL гуманизированного антитела против MUC-1 3D1, CL IgG1 человека:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISG

VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPRESKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

11) h7B8-1(VH-CH1)-mhFc-hCD3 (VL-VH)-scFv

VH гуманизированного антитела против MUC-1 7B8-1, CH1 IgG1 человека, mhFc
 IgG1 человека, линкер= VL антитела против CD3 человека, линкер= VH антитела против
 CD3 человека:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFNYFWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPG
 TGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARYDYTSSMDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTYTGPPGP
 APELLGGPSVFCFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIECTISKAKGQCREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLRCHVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFFL
 YSTLTVDKSRWQQGNVFCFSSVLECLHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSDIQMTQSPSSLSA
 SVGDRVITICRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTL
 TISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
 GLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKG
 RFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 32)

12) h7B8-1 (VL-CL)

VL гуманизированного антитела против MUC-1 7B8-1, CL IgG1 человека:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGA
 SNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQNWKVPWTFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

13) h3D1 (VH-VL)-hFc-hPD-1(VL-VH)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 3D1-(G4S)3-
 вариабельная область легкой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека-вариабельная область
 легкой цепи антитела против PD1-(G4S)3-вариабельная область тяжелой цепи антитела
 против PD1:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSNFWM
 NWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT
 AMYYCARSYYRSAWFA YWGQGLVTVSLGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVT
 PKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTIN
 SLEAEDAATYYCQQSNNWPLTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCFSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL

SCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLESGV PARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGVEVKK
PGASVKV SCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTL
TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSS (SEQ ID
NO: 34)

14) h3D1(VL-VH)-hFc-hPD-1(VH-VL)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 3D1-(G4S)3-
вариабельная область тяжелой цепи 3D1-G4S-Fc IgG1 человека-G4S-вариабельная область
тяжелой цепи антитела против PD1-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи антитела
против PD1:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIH
WYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNW
PLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSN
FWMNWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLK
ASDTAMYYCARSYYRSAWFAYWGQGLVTVSLGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGVQLVQSGVEVKKPGA
SVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTD
SSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA
SYLESGV PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 35)

15) h7B8-1 (VH-VL)-hFc-hPD-1 (VL-VH)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 7B8-(G4S)3-
вариабельная область легкой цепи 7B8-G4S-Fc IgG1 человека-вариабельная область
легкой цепи антитела против PD1-(G4S)3-вариабельная область антитела против PD1
человека:

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFNYFWIE
WVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM
YYCARYDYTSSMDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASESVQYSGTSLMHYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQQNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT
LSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLESGV PARFSGSGSGTDFTLTIS
SLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGVEVKK

KPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT
 LTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID
 NO: 36)

16) h7B8-1 (VL-VH)-hFc-hPD-1 (VH-VL)-scFv

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 7B8-(G4S)3-
 вариабельная область тяжелой цепи 7B8-G4S-Fc IgG1 человека - G4S-вариабельная
 область тяжелой цепи антитела против PD1-(G4S)3-вариабельная область легкой цепи
 антитела против PD1:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSG
 TSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ
 QNWKVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS
 GFTFNYFWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQW
 SSLKASDTAMYYCARYDYTSSMDYWGQGTLVTVSSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSQVQLVQSGVEVKK
 PGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTL
 TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG
 GGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLI
 YLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 37)

h7B8/h3D1-hCD3, бипаратопное биспецифическое

7B8 (VH-CH1)-Fc-CD3 (VL-VH):

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 7B8(VH5)-
 константная область IgG1 человека-CD3 (VL-VH)

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGFTFNYFWIE
 WVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM
 YYCARYDYTSSMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPVLDSDGSFFLVSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GKGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS
 RLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGG
 GGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEW
 VALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS
 DWYFDVWGQGTLVTVSS* (SEQ ID NO: 38)

7B8 (VH-CH1)-Fc-CD3 (VH-VL):

Лидерная последовательность-вариабельная область тяжелой цепи 7B8 (VH5)-
константная область IgG1 человека-CD3-CD3 (VH-VL)

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFNYFWIE
WVRQMPGKGLEWMGEILPGTGSTNYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM
YYCARYDYTSSMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYDTPPVLDSDGSFFLVSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVAL
INPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDW
YFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDI
RNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQ
QGNTLPWTFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 39)

Легкая цепь h7B8 (VL-CL):

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 7B8 (VL3)-
константная область Ig-каппа человека

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVQYSG
TSLMHWYQQKPGQAPRLLIYGASNVETGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ
QNWKVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 40)

3D1 (VH5-VL1) с Fc аллотипа 2:

Лидерная последовательность-вариабельная последовательность тяжелой цепи
3D1-линкер (G4S)3-вариабельная область легкой цепи 3D1-Fc IgG1 человека

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSNFWM
NWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT
AMYYCARSYYRSAWFA YWGQGLTVTVSLGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVT
PKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTIN
SLEAEDAATYYCQQSNNWPLTFGQGTKVEIKGGGGSEPKSCDKTYTCCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
KEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

3D1 (VL1-VH5) с Fc аллотипа 2:

Лидерная последовательность-вариабельная область легкой цепи 3D1-(G4S)3-
вариабельная область тяжелой цепи 3D1 G4S-Fc IgG1 человека

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIH
WYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNNW

PLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFSN
 FWMNWVRQMPGKGLEWMGQIYPGDGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLK
 ASDTAMYYCARSYYRSAWFAYWGQGLVTVSLGGGGSEPKSCDKTYTCPPCPAPEAA
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRKEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSLKLT
 VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

Все из композиций и способов, описанных и заявленных в настоящем описании, могут быть получены и выполнены без излишнего экспериментирования ввиду настоящего изобретения. Между тем как композиции и способы по настоящему изобретению описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать варианты композиций и способов и стадий или последовательности стадий способа, описанного в настоящем описании, без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет понятно, что средства, описанные в настоящем описании, могут быть заменены определенными средствами, которые являются как химически, так и физиологически сходными, при достижении таких же или сходных результатов. Все такие сходные замены и модификации, понятные специалистам в данной области, считаются входящими в пределы сущности, объема и концепции изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

VI. ССЫЛКИ

Следующие ссылки, в той степени, что они предоставляют иллюстративные методические или другие детали, дополнительные к деталям, приведенным в настоящем описании, прямо включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Патент США 3817837
 Патент США 3850752
 Патент США 3939350
 Патент США 3996345
 Патент США 4196265
 Патент США 4275149
 Патент США 4277437
 Патент США 4366241
 Патент США 4472509
 Патент США 4554101
 Патент США 4680338
 Патент США 4683202
 Патент США 4684611
 Патент США 4816567
 Патент США 4867973
 Патент США 4879236

Патент США 4938948
Патент США 4952500
Патент США 5021236
Патент США 5141648
Патент США 5196066
Патент США 5217879
Патент США 5302523
Патент США 5322783
Патент США 5384253
Патент США 5464765
Патент США 5506138
Патент США 5538877
Патент США 5538880
Патент США 5550318
Патент США 5563055
Патент США 5563250
Патент США 5565332
Патент США 5580859
Патент США 5589466
Патент США 5610042
Патент США 5656610
Патент США 5670488
Патент США 5702932
Патент США 5736524
Патент США 5739018
Патент США 5780448
Патент США 5789215
Патент США 5824544
Патент США 5830725
Патент США 5849304
Патент США 5851826
Патент США 5856456
Патент США 5858744
Патент США 5871982
Патент США 5871983
Патент США 5871986
Патент США 5879934
Патент США 5880270
Патент США 5888502
Патент США 5925565

Патент США 5928906

Патент США 5932210

Патент США 5935819

Патент США 5945100

Патент США 5955331

Патент США 5981274

Патент США 5994136

Патент США 5994624

Патент США 6013516

Патент США с серийным номером № 12/789127

Патент США с серийным номером № 13/026858

Патент США с серийным номером № 13/045033

"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.

Blanar *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.
- Detappe *et al.*, *Int. J. Radiation Oncol.* 108(5):1380-1389, 2020.
- 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 125023
- Заявка EP 171496
- Заявка EP 173494
- Заявка EP 184187
- 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.
- Foecking 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.
- 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.
- Kaeppeler *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.
- 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.
- Verhoeyen *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.
- 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. Рекомбинантная антителная конструкция, которая селективно связывается с внеклеточным доменом MUC1-C (MUC1-C/ECD), определяемым SEQ ID NO: 2, где указанная антителная конструкция также связывается с:

- (a) CD3;
- (b) CD16;
- (c) CD28;
- (d) миелоид-специфическим антигеном;
- (e) ErbB2;
- (f) EGFR;
- (г) CD3 и PD1;
- (h) CD16 и PD1;
- (i) CD47;
- (j) SIRP α ;
- (k) NKG2D или
- (l) Siglec 9.

2. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция является двухвалентной.

3. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция является трехвалентной.

4. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция является четырехвалентной.

5. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция имеет две отдельных специфичности связывания для MUC1-C/ECD.

6. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция имеет специфичность связывания для MUC1, обеспечиваемую последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, 5 и 7, соответственно, и последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 8, соответственно; и/или специфичность связывания для MUC1, обеспечиваемую последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, 11, и 13, соответственно, и последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 10, 12 и 14, соответственно.

7. Антителная конструкция по п.1, где указанная антителная конструкция содержит одну или несколько мутаций, позволяющих закрытие двух отдельных цепей антител.

8. Антителная конструкция по п.7, где указанная антителная конструкция содержит последовательности IgG.

9. Антителная конструкция по п.1, где антителная конструкция представляет собой гуманизованную версию антитела мыши.

10. Антителная конструкция по п.9, где указанная конструкция

гуманизованного антитела содержит последовательности IgG.

11. Антительная конструкция по п.1, где указанная антительная конструкция дополнительно содержит метку.

12. Антительная конструкция по п.11, где указанная метка представляет собой пептидную метку, фермент, магнитную частицу, хромофор, флуоресцентную молекулу, хемилюминесцентную молекулу или краситель.

13. Антительная конструкция по п.1, где указанная антительная конструкция дополнительно содержит противоопухолевое лекарственное средство, связанное с ней.

14. Антитело по п.13, где указанное противоопухолевое лекарственное средство соединено с указанной антительной конструкцией через фотолабильный линкер.

15. Антительная конструкция по п.13, где указанное противоопухолевое лекарственное средство соединено с указанной антительной конструкцией через расщепляемый ферментом линкер.

16. Антительная конструкция по п.13, где указанное противоопухолевое лекарственное средство представляет собой токсин, радиоизотоп, цитокин или фермент.

17. Антительная конструкция по п.1, где указанная антительная конструкция содержит последовательность SEQ ID NO: 22-42.

18. Антитело по п.1, где указанная антительная конструкция содержит последовательность, обладающую 80%, 85%, 90%, 95% или 99% гомологией с SEQ ID NO: 22-42.

19. Антительная конструкция по п.1, где указанная антительная конструкция конъюгирована с наночастицей или липосомой.

20. Антительная конструкция по п.1, где индукция клеточной смерти включает антителозависимую клеточную цитотоксичность или комплемент-опосредуемую цитотоксичность.

21. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий приведение в контакт MUC1-положительной злокачественной клетки индивидуума с антительной конструкцией по пп.1-20.

22. Способ по п.21, где указанная MUC1-положительная злокачественная клетка представляет собой клетку солидной опухоли.

23. Способ по п.22, где указанная клетка солидной опухоли представляет собой клетку рака легкого, клетку злокачественной опухоли головного мозга, клетку рака головы и шеи, клетку рака молочной железы, клетку рака кожи, клетку рака печени, клетку рака поджелудочной железы, клетку рака желудка, клетку рака толстого кишечника, клетку рака прямой кишки, клетку рака тела матки, клетку рака шейки матки, клетку рака яичника, клетку рака яичка, клетку рака кожи или клетку рака пищевода.

24. Способ по п.21, где указанная клетка MUC1-положительной злокачественной опухоли представляет собой клетку лейкоза или миеломы.

25. Способ по п.24, где указанный лейкоз или миелома представляет собой острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз или множественную миелому.

26. Способ по п.21, дополнительно включающий приведение MUC1-положительной злокачественной клетки в контакт со вторым средством или способом лечения против злокачественной опухоли.

27. Способ по п.26, где указанное второе средство или способ лечения против злокачественной опухоли выбран из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии или терапии токсинами.

28. Способ по п.26, где указанное второе средство или способ лечения против злокачественной опухоли ингибирует функцию внутриклеточного MUC1.

29. Способ по п.26, где указанное второе средство или способ лечения против злокачественной опухоли применяют одновременно с указанной антительной конструкцией.

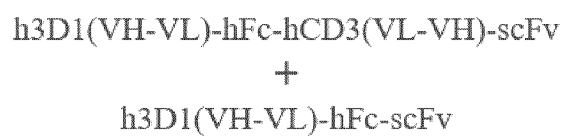
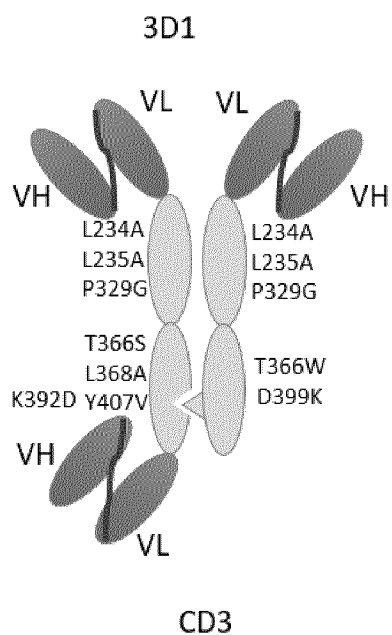
30. Способ по п.26, где указанное второе средство или способ лечения против злокачественной опухоли применяются до и/или после указанной антительной конструкции.

31. Способ по п.21, где указанная MUC1-положительная злокачественная клетка представляет собой клетку метастазирующей злокачественной опухоли, клетку злокачественной опухоли с множественной лекарственной резистентностью или клетку рецидивирующей злокачественной опухоли.

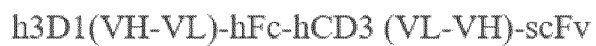
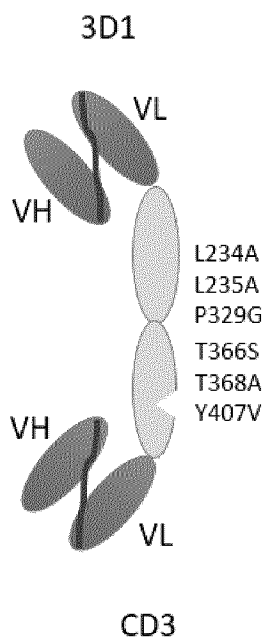
32. Способ по п.21, где указанное антитело приводит к индукции клеточной смерти, например, посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности или комплемент-опосредуемой цитотоксичности.

33. Клетка, экспрессирующая антительную конструкцию по пп. 1-20.

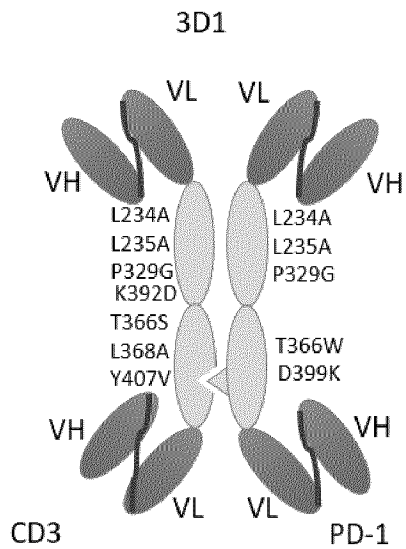
ΦΙΓ.1C



ΦΙΓ.1D

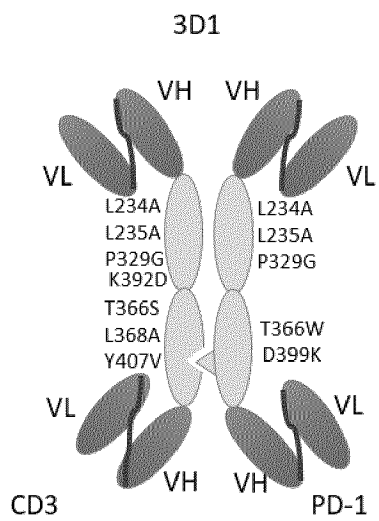


ΦΙΓ.1Ε



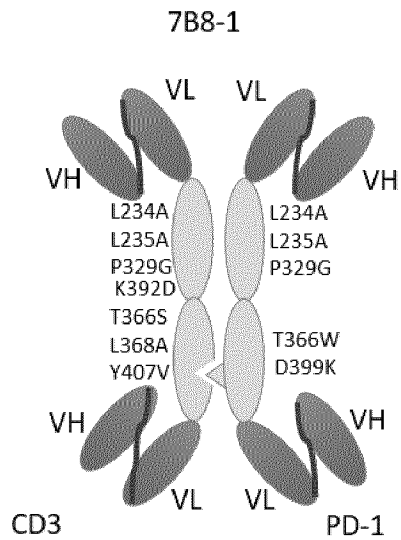
h3D1(VH-VL)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv
+
h3D1(VH-VL)-hFc-hPD-1(VL-VH)-scFv

ΦΙΓ.1F



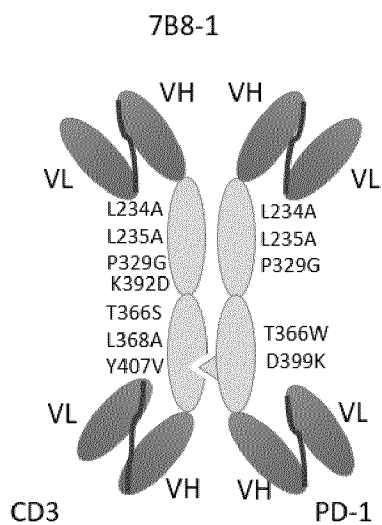
h3D1(VL-VH)-hFc-hCD3(VH-VL)-scFv
+
h3D1(VL-VH)-hFc-hPD-1(VH-VL)-scFv

ФИГ.1G



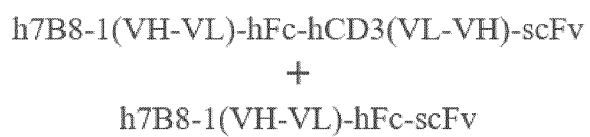
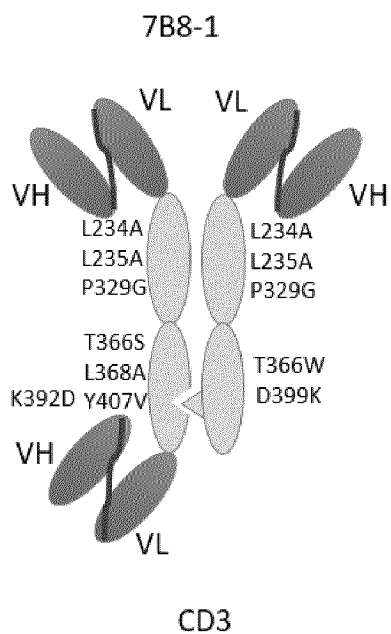
h7B8-1(VH-VL)-hFc-hCD3(VL-VH)-scFv
+
h7B8-1(VH-VL)-hFc-hPD-1(VL-VH)-scFv

ФИГ.1H

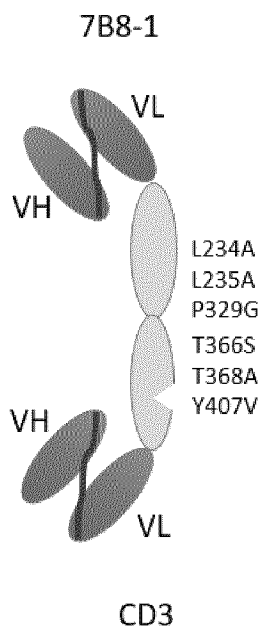


h7B8-1(VL-VH)-hFc-hCD3(VH-VL)-scFv
+
h7B8-1(VL-VH)-hFc-hPD-1(VH-VL)-scFv

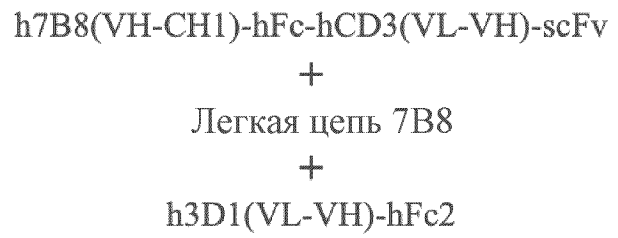
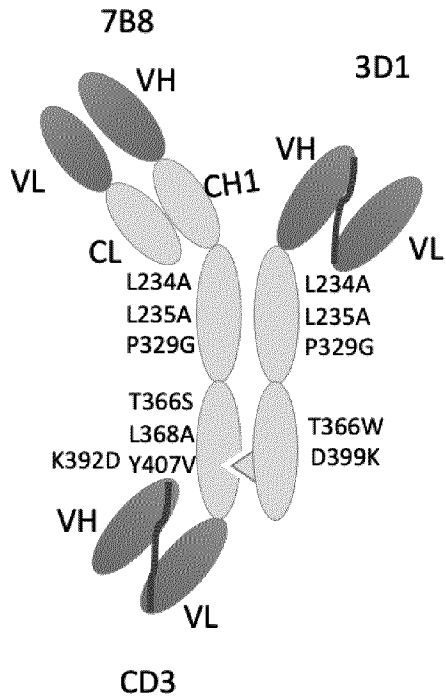
ФИГ.1I



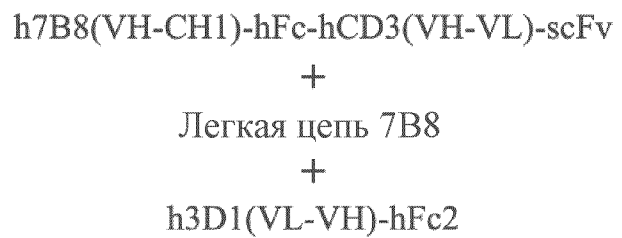
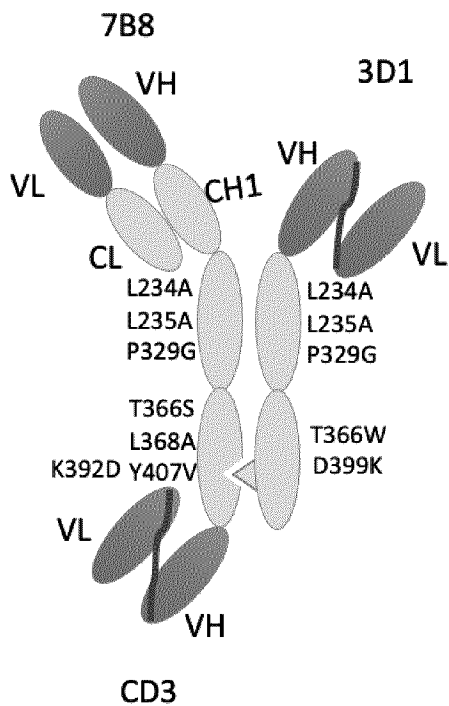
ФИГ.1J



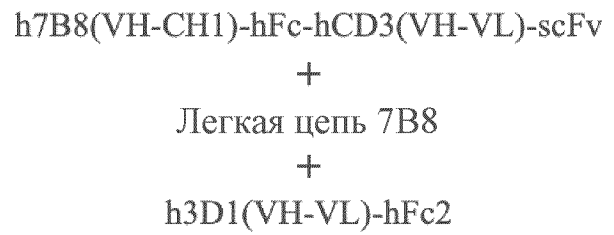
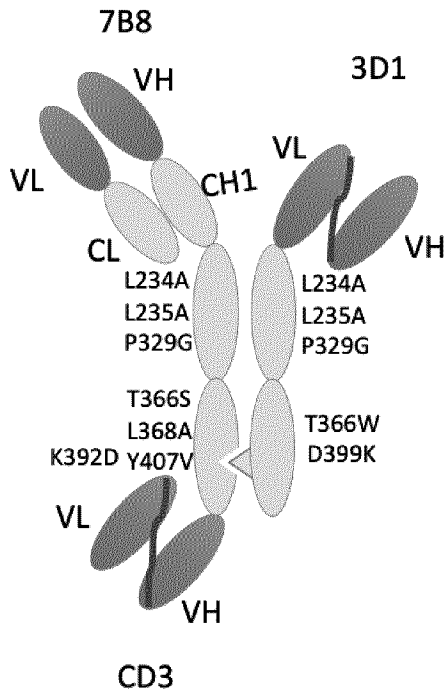
ФИГ.1К



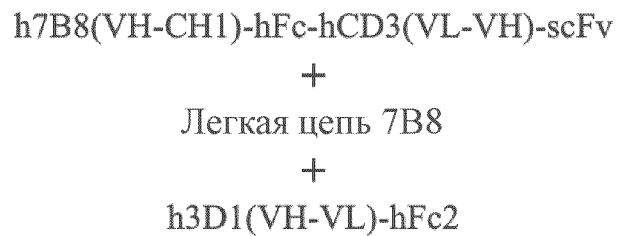
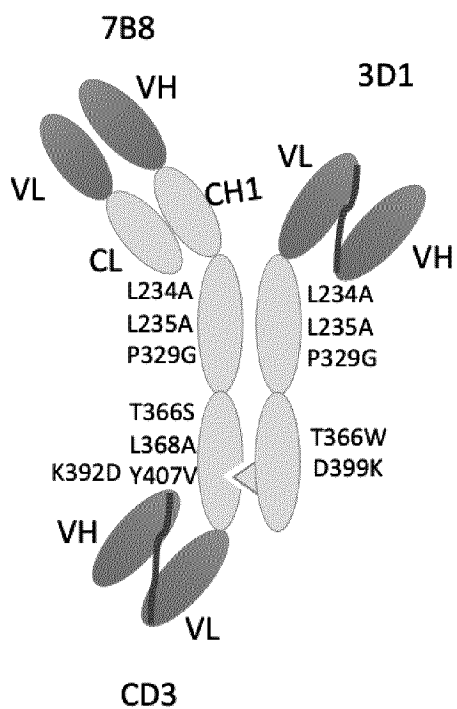
ФИГ.1L



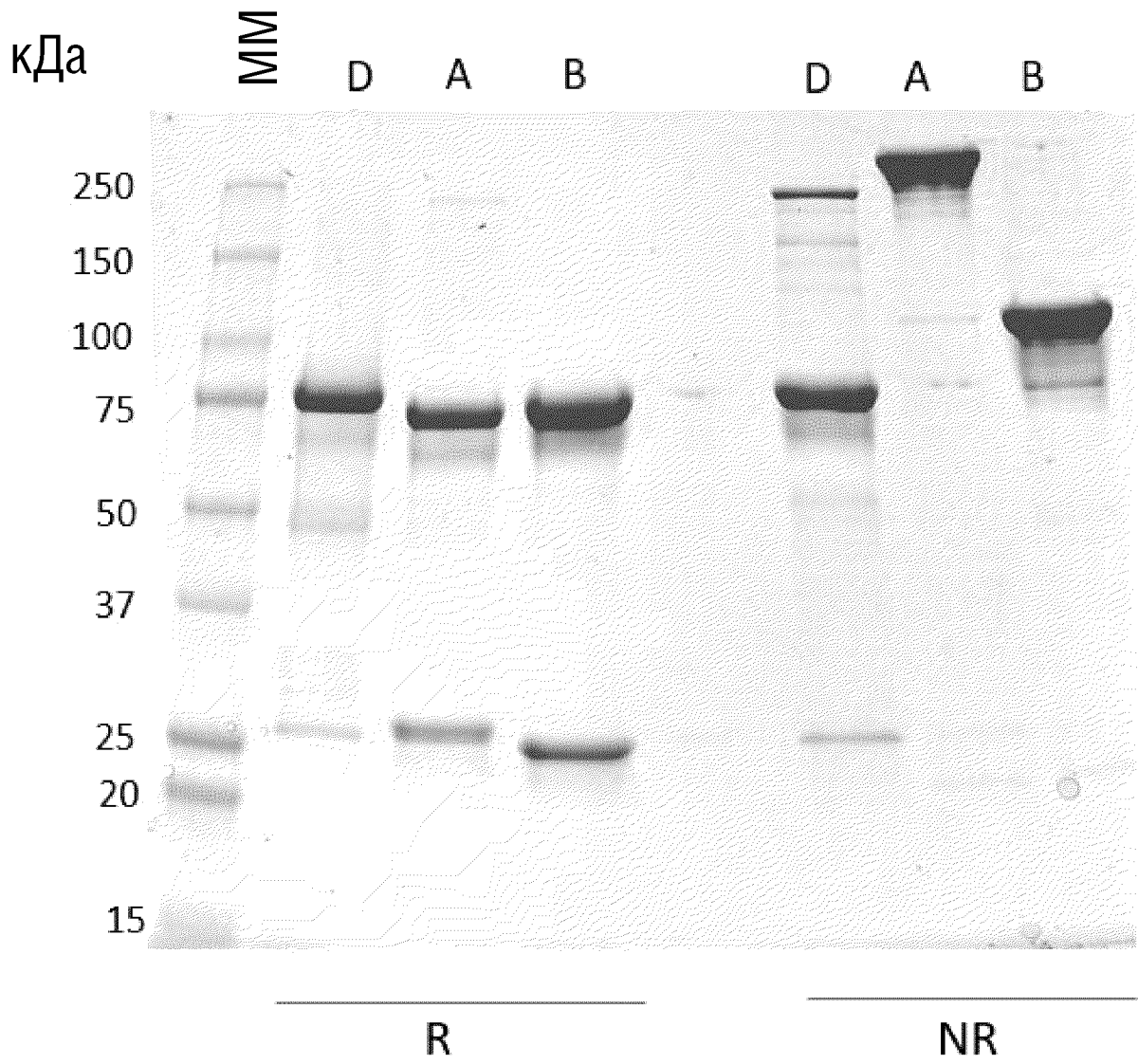
ФИГ.1М



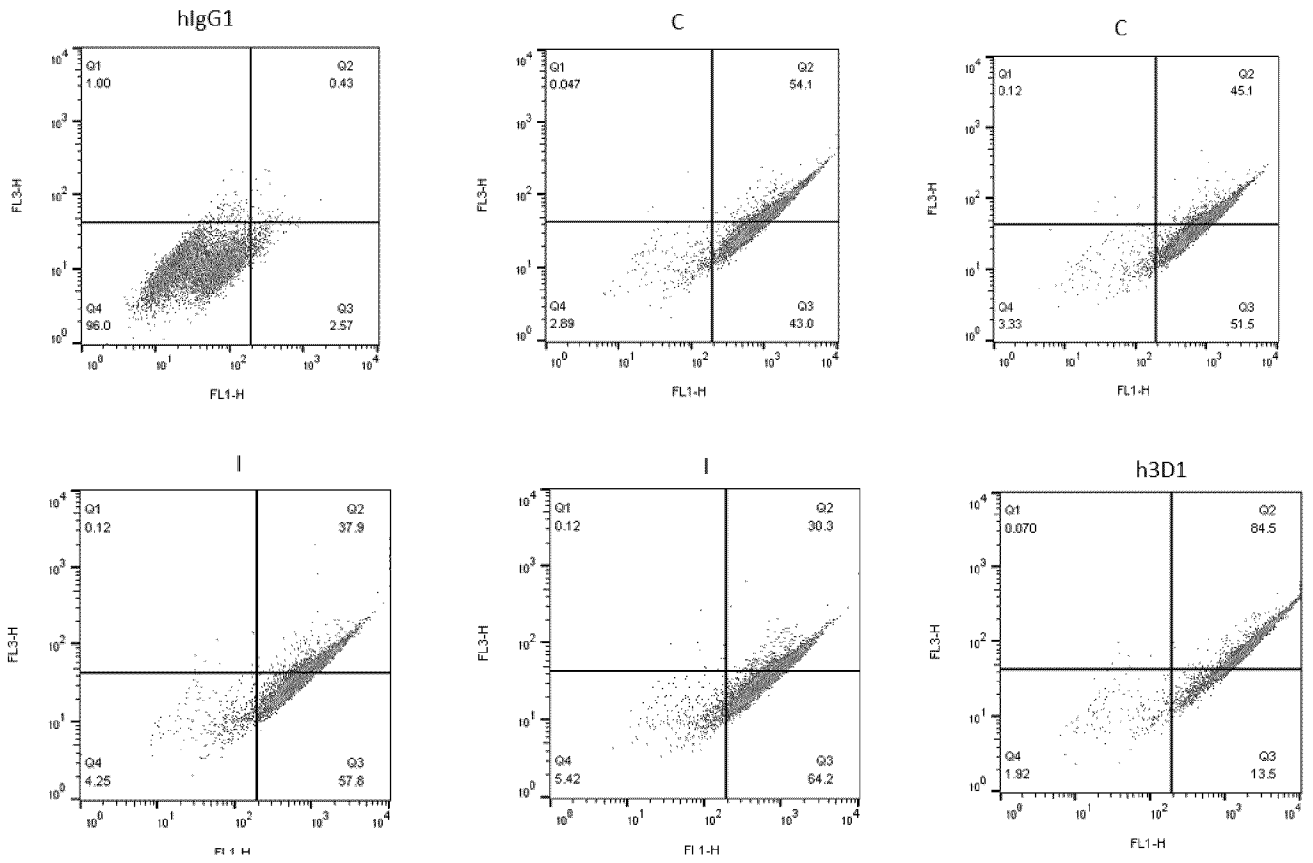
ФИГ.1N



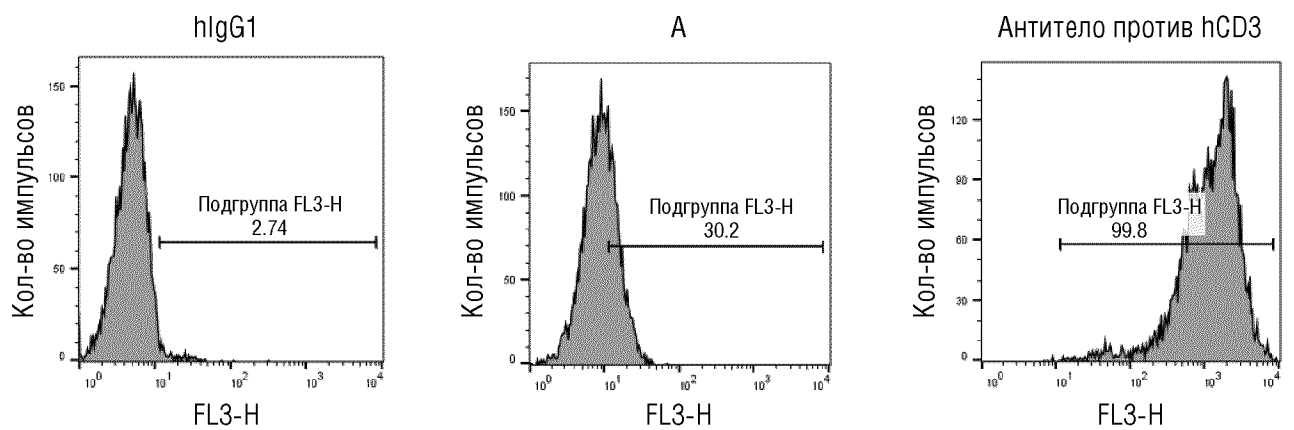
ФИГ.2



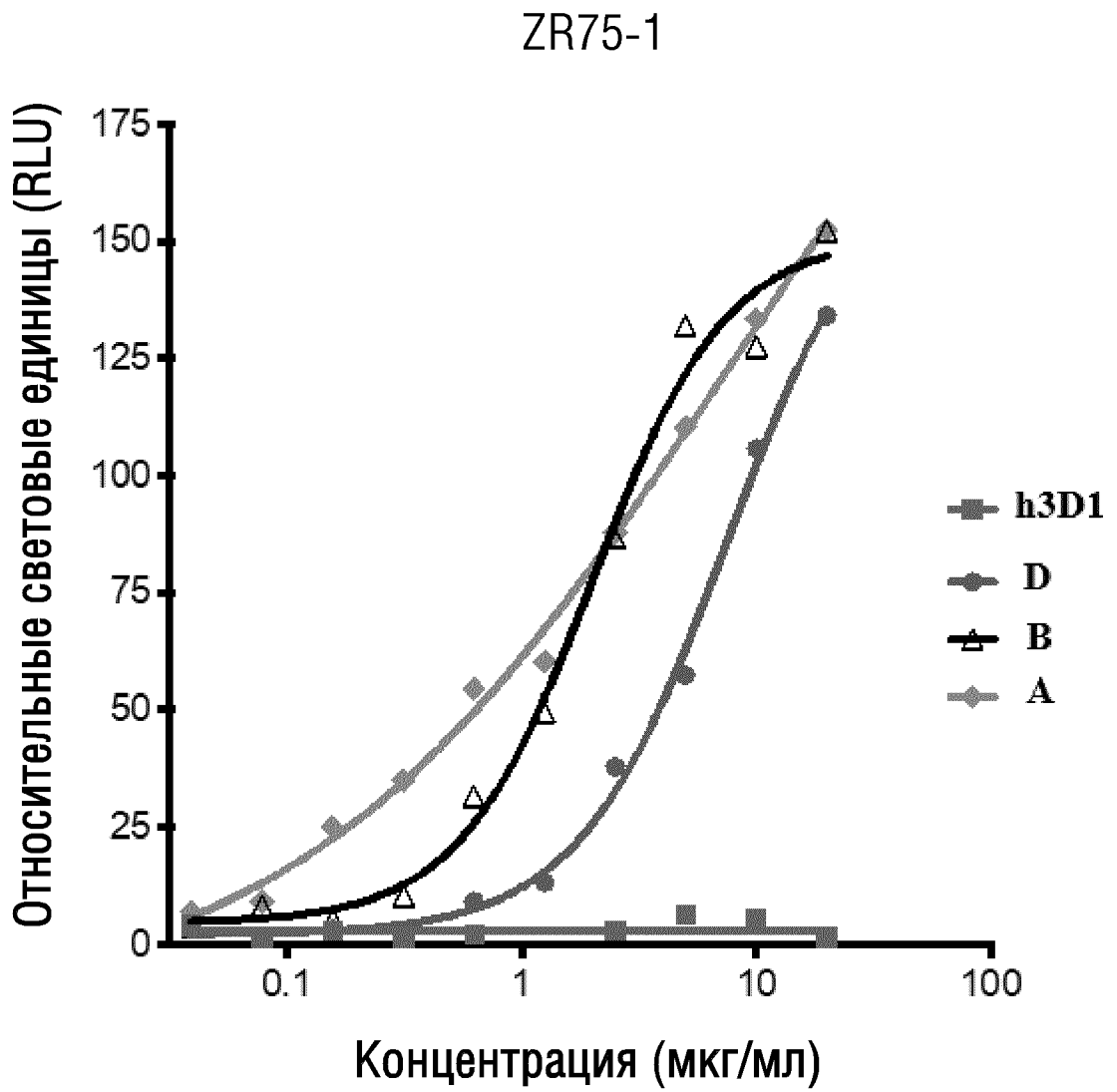
ФИГ.3



ФИГ.4

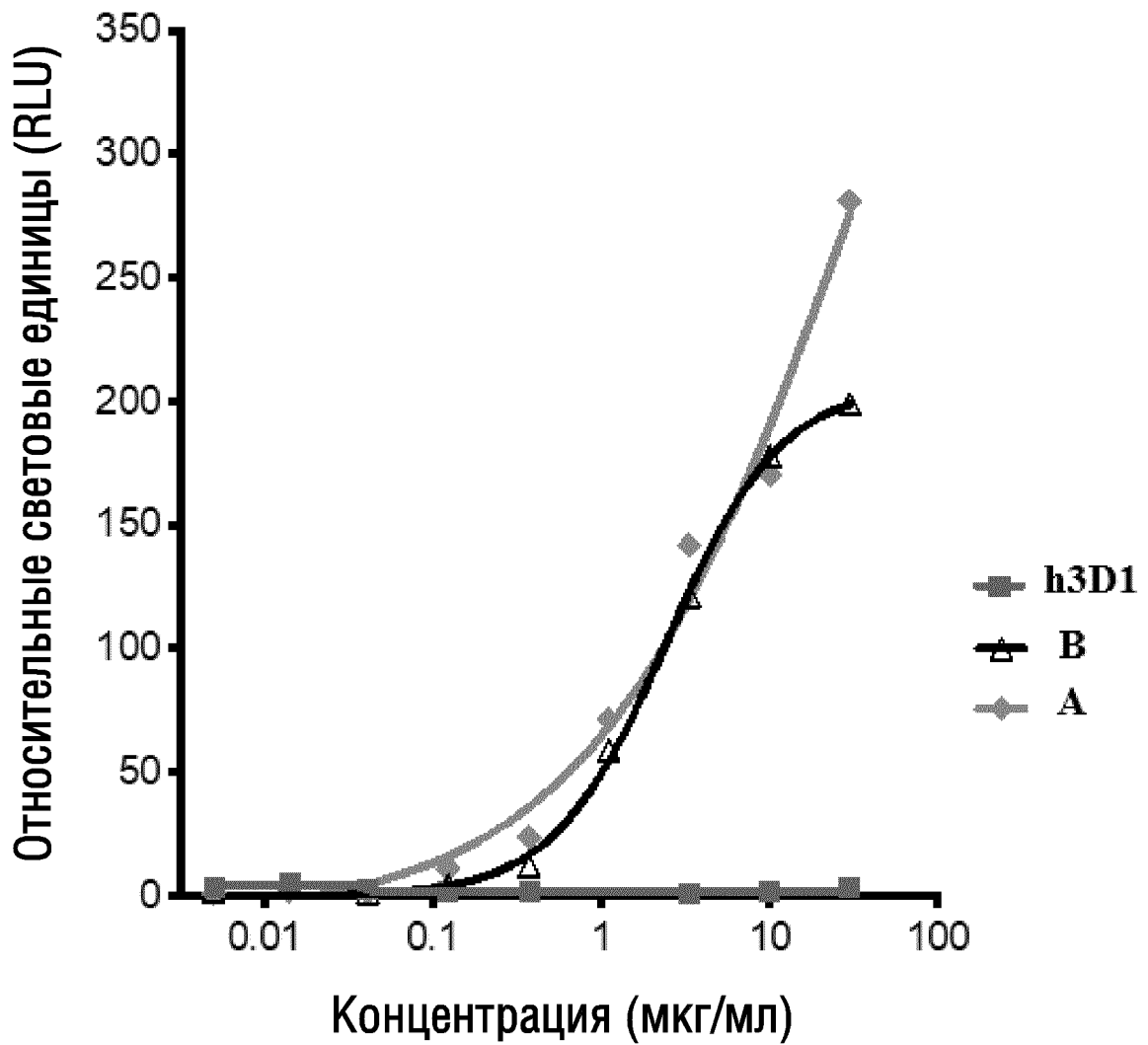


ФИГ.5А



ФИГ.5В

ZR75-1: 40000 клеток/лунка
NFAT-Jurkat: 100000 клеток/лунка



ФИГ.5С

