(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 045016 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.26

(21) Номер заявки
201891851

(22) Дата подачи заявки
2017.02.16

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ BCMA И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

(31) **62/296,594; 62/396,084**
(32) **2016.02.17; 2016.09.16**
(33) **US**
(43) **2019.04.30**
(86) **PCT/US2017/018177**
(87) **WO 2017/143069 2017.08.24**

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

(72) Изобретатель:
Сассман Джанго, Райан Морин, Вестендорф Лори, Фельдхаус Майкл (US)

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

(56) WO-A2-2010104949
WO-A1-2015158671
RYAN et al. "Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells," Molecular Cancer Therapeutics, 19 November 2007 (19.11.2007), Vol. 6, Iss 11, Pgs. 3009-3018. entire document
WO-A1-2012163805
TAI et al. "Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma," Immunotherapy, 15 September 2015 (15.09.2015), Vol. 7, No. 11, Pgs. 1187-1199. entire document

(57) Данное изобретение обеспечивает гуманизированные антитела, которые специфически связываются с BCMA. Указанные антитела полезны для лечения и диагностики различных видов злокачественных новообразований и иммунологических нарушений, а также для выявления BCMA.

045016 B1

045016 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/296,594, поданный 17 февраля 2016 года, и предварительной заявки США № 62/396,084, поданной 16 сентября 2016 года, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Ссылка на перечень последовательностей

Последовательности, раскрытые в заявке, содержатся в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

Уровень техники

B-клеточный антиген созревания (BCMA, CD269) является членом суперсемейства рецептора ФНО. Экспрессия BCMA ограничена B-клеточной линией, где он преимущественно экспрессируется в интрафолликулярной области зародышевых центров, а также на дифференцированных плазматических клетках и плазмобластах. BCMA связывается с двумя различными лигандами, лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL), и фактором активации B-лимфоцитов (BAFF, также известным как BlyS, TALL-1 и THANK). Лиганды BCMA связывают два дополнительных рецептора ФНО, трансмембранный активатор и партнер модулятора кальция и лиганда циклофилина (TACI) и рецептор BAFF (BAFF-R, также называющийся BR3). TACI связывает APRIL и BAFF, тогда как BAFF-R демонстрирует ограниченное, но высокоаффинное связывание с BAFF. Вместе BCMA, TACI, BAFF-R и их соответствующие лиганды регулируют различные аспекты гуморального иммунитета, развития B-клеток и гомеостаза.

BCMA практически отсутствует в наивных B-клетках и B-клетках памяти (Novak и соавт., Blood 103, 689-94 (2004 год)), но он избирательно индуцируется в процессе дифференцировки плазматических клеток, где он может поддерживать гуморальный иммунитет, способствуя выживанию нормальных плазматических клеток и плазмобластов (O'Conner и соавт., J. Exp Med. 199, 91-98 (2004 год)). Сообщается, что BCMA экспрессируется в образцах первичной множественной миеломы (ММ). BCMA также обнаружен на клетках Рида-Штернберга ($CD30^{+}$) у пациентов с болезнью Ходжкина. На основании экспериментов с применением нокдауна, сообщается, что BCMA способствовало как пролиферации, так и выживанию клеточной линии болезни Ходжкина (Chiu и соавт., Blood 109, 729-39 (2007 год)).

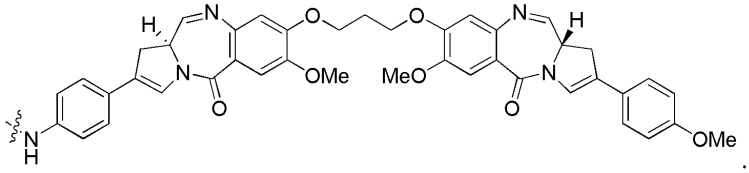
Сущность изобретения

Изобретение относится к гуманизированному, химерному или венированному антителу, которое представляет собой гуманизированную или химерную форму антитела, депонированного как ATCC PTC-6937. Необязательно, антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13), и зрелую вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Необязательно, антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13), и зрелую вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Необязательно, антитело, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L и положение L53 может быть занято S или R. Необязательно, антитело содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Необязательно, положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Необязательно, положения H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, а положения L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно. Необязательно, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13), а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19).

Изобретение дополнительно относится к гуманизированному химерному или венированному антителу, которое представляет собой гуманизированную, химерную или венированную форму антитела SG16.45 крысы, имеющую последовательности VH (SEQ ID NO: 23) и VK (SEQ ID NO: 33). Необязательно, антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31), и зрелую вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36). Необязательно, антитело содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и зрелую вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36). Необязательно, содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36) при условии, что положения H50 могут быть заняты A или S, и положение L24 может быть занято R или L, а положение L26 может быть занято S или T. Необязательно, антитело содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 179-181) из

hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36). Необязательно, положения H30, H93 и H94 занято N, T и S, соответственно. Необязательно, зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31), а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36) или зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO: 27), а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK1 (SEQ ID NO: 35), или зрелая вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO: 27), а зрелая вариабельная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK3 (SEQ ID NO: 37).

В любом из вышеуказанных антител зрелая вариабельная область тяжелой цепи может быть слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая вариабельная область легкой цепи может быть слита с константной областью легкой цепи. Необязательно, константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, которая имеет ослабленное связывание с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной области человека. Необязательно, константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1. Необязательно, константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5, и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3. Необязательно, константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7 (S239C), и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3. Необязательно, антитело представляет собой не конъюгированное антитело. Необязательно, антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом. Необязательно, антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. Необязательно, цитотоксический агент конъюгирован через линкер, расщепляемый ферментом. Необязательно, цитотоксический агент представляет собой агент связывания по малой борозкде ДНК, например, цитотоксический агент, имеющий формулу



.

Необязательно, цитотоксический агент представляет собой MMAE или MMAF.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим любое из описанных выше антител и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте реализации изобретение относится к антителу, содержащему три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, имеющему зрелую вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и зрелую вариабельную область легкой цепи с последовательностью из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). В другом варианте реализации изобретения зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи. Антитело может быть, например, антителом IgG1. В другом варианте реализации изобретения антитело не фукозилировано фукозой или аналогом фукозы в коре. Антитела могут быть получены в виде фармацевтической композиции, например, с добавлением фармацевтически приемлемого носителя.

В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет множество антител, имеющих зрелую вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и зрелую вариабельную область легкой цепи с последовательностью из hSG16,17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Вариабельные области этих антител предпочтительно слиты с соответствующими константными областями тяжелой и легкой цепей. В другом варианте реализации изобретения антитела представляют собой антитела IgG1. В дополнительном варианте осуществления изобретения множество антител имеет менее чем около 5% антител, имеющих коровое фукозилирование фукозой или аналогом фукозы. В дополнительном варианте осуществления изобретения множество антител имеет менее чем около 10% антител, имеющих коровое фукозилирование фукозой или аналогом фукозы. В другом варианте реализации изобретения множество антител включает около 2% антител с коровым фукозилированием фукозой или аналогом фукозы. В другом варианте реализации изобретения множество антител включает 2% антител с коровым фукозилированием фукозой или аналогом фукозы.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием или имеющего риск возникновения злокачественного новообразования, экспрессирующего BCMA, включающему введение пациенту антител по эффективной схеме лечения, как описано выше. Необязательно злокачественное новообразование представляет собой гематологическую опухоль. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой миелому, лейкемию или лимфому. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой множественную миелому. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ) или лимфому Ходжкина.

Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС), макроглобулинемию Вальденстрема или лимфому Беркитта.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения пациента, страдающего иммунологическим нарушением или имеющего риск развития иммунологического нарушения, опосредованного иммунными клетками, экспрессирующими BCMA, включающему введение пациенту антитела по эффективной схеме лечения, как описано выше. Необязательно, нарушение представляет собой опосредуемое В-клеткой нарушение. Необязательно, иммунологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит, системную волчанку Е (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина".

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А изображена структура BCMA.

На фиг. 1В изображено структурное взаимодействие внеклеточного домена BCMA с BAFF.

На фиг. 2 изображена процедура отбора антител.

На фиг. 3 изображены данные связывания клеток и активность блокады лигандов для лунок неклонированной гибридомы.

На фиг. 4 изображена активность блокады/процентное ингибирование антител к BCMA.

На фиг. 5 изображен ингибитор блокирования APRIL, титрованный антителами к BCMA.

На фиг. 6 изображено титрование блокирования BAFF с применением антител к BCMA.

На фиг. 7 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VH человека, HV1-2/HJ3. Она изображает крысу SG16.17 vH (SEQ ID NO: 8) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 39-41) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 42 и 43); Человеческое HV1-2/HJ3 (SEQ ID NO: 9) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 44 и 45) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 46 и "AR"); hSG16.17 vH1 (SEQ ID NO: 11) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 50-52) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 53 и 54); hSG16.17 vH2 (SEQ ID NO: 12) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 55-57) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 58 и 59); hSG16.17 vH3 (SEQ ID NO: 13) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 63 и 64); и hSG16.17 vH4 (SEQ ID NO: 14) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 65-67) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 68 и 69).

На фиг. 8 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VH человека; HV1-46/HJ3. Она изображает последовательности крысы SG16.17 vH (SEQ ID NO: 8) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 39-41) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 42 и 43); Человеческое HV1-46/HJ3 (SEQ ID NO: 10) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 47 и 48) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 49 и "AR"); hSG16.17 vH5 (SEQ ID NO: 15) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 70-72) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 73 и 74); и hSG16.17 vH6 (SEQ ID NO: 16) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 75-77) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 78 и 79).

На фиг. 9 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17. Она изображает последовательности hSG16.17 vH1-6 (SEQ ID NO: 11-16).

На фиг. 10 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VK человека; KV1-12/KJ5. Она изображает последовательности крысы SG16.17 vK (SEQ ID NO: 17) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 80-82) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 83, "TTS" и SEQ ID NO: 84, соответственно); Человеческое KV1-12/KJ5 (SEQ ID NO: 18) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 85-87) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 88, "AAS" и SEQ ID NO: 89 соответственно); hSG16.17 vK2 (SEQ ID NO: 19) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 93, "TTS" и SEQ ID NO: 94, соответственно); hSG16.17 vK3 (SEQ ID NO: 20) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 95-97) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 98, "TTS" и SEQ ID NO: 99, соответственно); hSG16.17 vK4 (SEQ ID NO: 21) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 100-102) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 103, "TTS" и SEQ ID NO: 104, соответственно); и hSG16.17 vK5 (SEQ ID NO: 22) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 105-107) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 108, "TTS" и SEQ ID NO: 109, соответственно).

На фиг. 11 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17. На фигуре показаны последовательности hSG16.17 vK2, vK3, vK4, vK5 (SEQ ID NO: 19-22).

На фиг. 12 изображен анализ конкурентного связывания, показывающий связывание химерного SG16.17 с человеческим FcRIIIa.

На фиг. 13 изображено, что химерный SG16.17 индуцирует передачу сигнала через FcγRIIIA.

На фиг. 14 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью VH HV3-23/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO: 23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 113-115); человеческое HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO: 24) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 116 и 117) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 118 и 119 и "AK", соответственно); hSG16.45 vH1 (SEQ ID NO: 27) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 128-130) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 131-133); hSG16.45 vH2 (SEQ ID NO: 28) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 134-136) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 137-139); hSG16.45 vH3 (SEQ ID NO: 29) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 140-142) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 143-145); и hSG16.45 vH4 (SEQ ID NO: 30) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 146-148) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 149-151).

На фиг. 15 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последова-

тельностью VH HV3-74/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO: 23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 113-115); человеческое HV3-74/HJ3 (SEQ ID NO: 25) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 120 и 121) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 122 и 123 и "AR", соответственно); hSG16.45 vH5 (SEQ ID NO: 31) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 152-154) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 155-157).

На фиг. 16 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью VH HV3-9/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO: 23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 113-115); человеческое HV3-9/HJ3 (SEQ ID NO: 26) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 124 и 125) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 126 и 127 и "AR", соответственно); hSG16.45 vH6 (SEQ ID NO: 32) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 158-160) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 161-163).

На фиг. 17 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45. На фигуре показаны последовательности hSG16.45 vH1-6 (SEQ ID NO: 27-32).

На фиг. 18 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью KV KV3-20/KJ2 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vK (SEQ ID NO: 33) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 164-166) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 167, "STS") и SEQ ID NO: 168, соответственно); Человеческое KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO: 34) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 169-171) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 172, "STS" и SEQ ID NO: 173, соответственно); hSG16.45 vK1 (SEQ ID NO: 35) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 174-176) и CDR IMGT (SEQ ID NO: 177, "STS" и SEQ ID NO: 178, соответственно); hSG16.45 vK2 (SEQ ID NO: 36) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 179-181) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 182, "STS" и SEQ ID NO: 183, соответственно); hSG16.45 vK3 (SEQ ID NO: 37) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 184-186) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 187, "STS" и SEQ ID NO: 188, соответственно); и hSG16.45 vK5 (SEQ ID NO: 38) с CDR по Кабат (SEQ ID NO: 189-191) и IMGT CDR (SEQ ID NO: 192, "STS" и SEQ ID NO: 193, соответственно).

На фиг. 19 изображено выравнивание вариантов hSG16.45 легкой цепи. На фигуре показаны последовательности hSG16.45 vK1, vK2, vK3, vK5 (SEQ ID NO: 35-38).

На фиг. 20A-C изображена активность in vivo мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID.

На фиг. 21A-C изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG.

На фиг. 22 изображена активность in vivo мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG.

На фиг. 22A, B изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG.

На фиг. 24 изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID.

На фиг. 25 изображена активность ADCC антитела SG16.17 SEA на целевые клетки MM1R.

Определения

"Выделенное" антитело относится к антителу, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонентов естественной среды, и/или к антителу, которое получено рекомбинантным путем. "Очищенное антитело" представляет собой антитело, которое обычно составляет по меньшей мере 50% мас./мас. чистоты от окружающих белков и других контаминантов, возникающих в результате его выделения или очистки, но не исключает возможности сочетания моноклонального антитела с избытком фармацевтически приемлемого носителя(ей) или другого транспортного средства, предназначенного для облегчения его применения. Интерферирующие белки и другие контаминанты могут включать, например, клеточные компоненты клеток, из которых антитело выделено или получено рекомбинантным путем. Иногда моноклональные антитела представляют собой по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас. Окружающих белков и контаминантов от получения или очистки. Антитела, описанные в настоящем документе, включая крысиные, химерные, венированные и гуманизированные антитела, могут быть представлены в выделенной и/или очищенной форме.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, т.е. отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью гибридомного метода, впервые описанного Kohler и соавт. (1975 год) Nature 256:495 или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, применяя методы, описанные в Clackson и соавт. (1991 год) Nature, 352:624-628 и Marks и соавт. (1991 год) J. Mol. Biol., 222:581-597, например, или могут быть созданы другими способами. Антитела, описанные в данном документе, представляют собой моно-

клональные антитела.

Специфическое связывание моноклонального антитела с его целевым антигеном означает аффинность по меньшей мере 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, или 10^{10} M^{-1}. Специфическое связывание существенно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, возникающего, по меньшей мере, с одной несвязанной целью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным положением (например, по типу "ключа и замка"), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом сил Вандер-Ваальса.

Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает в себя вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Эта вариабельная область первоначально экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельная область без сигнального пептида иногда упоминается как зрелая вариабельная область. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию.

Легкие цепи подразделяются на каппа или лямбда. Тяжелые цепи подразделяются на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельная и константная области соединяются областью "J", содержащей около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область "D", содержащую около 10 или более аминокислот. (См. в общем, Fundamental Immunology (Paul, W., ред., 2-е изд. Raven Press, N.Y., 1989 год, Гл. 7, которая включена в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей).

Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания являются одинаковыми. Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, выравниваются каркасными областями, что позволяет связывать их с определенным эпитопом. От N-конца до С-конца, как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Кабата, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991), или Чотиа & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987 год); Chothia и соавт., Nature 342:878-883 (1989 год), или комбинации Кабата и Чотия, или IMGT, AtM или Контакт или другое общепринятое определение CDR. Кабат также обеспечивает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация по Кабат), в котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковый номер. Если иное не исходит из контекста, нумерация по Кабат используется для обозначения положения аминокислот в вариабельных областях. Если из контекста не исходит иначе, нумерация EU используется для обозначения позиций в константных областях.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты антител конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены по специфическому связыванию с целью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', $F(ab')_2$, F(ab)c, диатела, Дат, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного, или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также подразумевает диатело (гомодимерный Fv-фрагмент) или минитело (V_L-V_H-C_H3), биспецифическое антитело или тому подобное. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai и Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990 год); Kostelny и соавт., J. Immunol., 148:1547-53 (1992 год)).

Термин "антитело" подразумевает само антитело (не конъюгированное антитело) или антитело, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые вариабельные области легких и тяжелых цепей антитела, отличного от человека (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепи человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и состоят примерно на две трети из человеческой последовательности.

Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые, а обычно, все CDR и некоторые, не относящиеся к человеку, остатки каркаса вариабельных областей антитела, отличного от человеческого, но заменяет другие остатки каркаса вариабельной области, которые могут способствовать эпитопам В- или Т-клеткам, например, подвергшиеся воздействию остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991 год) на остатки из соответствующих положений последовательности человеческого антитела. Результатом является антитело, в котором CDR полностью или в зна-

чительной степени походят из антитела, отличного от человеческого, а каркасы вариабельной области антитела, отличного от человеческого, создаются более подобными на человеческие путем замещений.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, и более обычно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, T. 66, Glenn E. Morris, Ред. (1996 год).

Антитела, которые распознают одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы в простом иммунологическом анализе, показывающем способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с целевым антигеном. Эпитоп антитела также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков. В альтернативном варианте, два антитела имеют один и тот же эпитоп, в случае если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, в случае если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans и соавт., Cancer Res. 50:1495, 1990 год). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, в случае если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере, 2x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или 99%, как измерено в конкурентно-связывающем анализе. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, а также антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, расположенным достаточно проксимально к эпитопу, связанному эталонным антителом для возникновения стерического затруднения. Антитела, которые конкурируют с антителом ч2Н12 для связывания с белком BCMA человека, включены в данное описание.

Термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Для классификации аминокислотных замещений как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи):cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи) : asp, glu; группа IV (основные боковые цепи) : asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи) : trp, tyr, phe. Консервативные замещения включают замещения между аминокислотами того же класса. Неконсервативные замещения представляют собой обмен элемента одного из этих классов для элемента другого.

Идентичность последовательности в процентах определяется последовательностями антител, максимально выровненных по соглашению нумерации по Кабат. После выравнивания, если область антитела субъекта (например, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с той же областью эталонного антитела, то идентичность последовательности в процентах между областями субъекта и эталонного антитела представляет собой номер положений, занятых той же аминокислотой как в области субъекта так и в области эталонного антитела, деленный на общее количество выровненных положений двух областей, при этом пробелы не учитываются, умноженный на 100 для преобразования в проценты.

Композиции или способы, "содержащие" один или более изложенных элементов, могут включать в себя другие не указанные конкретно элементы. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в сочетании с другими компонентами.

Обозначение диапазона значений включает все целые числа внутри или определяющие диапазон.

Эффекторная функция антитела относится к функции, обеспечиваемой доменом(ами) Fc Ig. Такими функциями могут быть, например, антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз или комплемент-зависимая цитотоксичность. Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания эффекторного домена(нов) Fc с Fc-рецептором иммунной клетки с фагоцитарной или литической активностью, или путем связывания эффекторного домена(нов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит к ингибированию и/или истощению целевой клетки BCMA. Области Fc антител могут вовлекать клетки экспрессирующие Fc-рецептор (FcR) и сопоставлять их с сенсибилизированной антителами целевой клеткой. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64) могут действовать как эффекторные клетки

для разрушения клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Вовлечение FcγR IgG активирует антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). ADCC опосредуется эффекторными клетками $CD16^+$ через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз, тогда как фагоцитоз опосредуется эффекторными клетками $CD32^+$ и $CD64^+$ (см., Fundamental Immunology, 4^{-e} изд., Paul ред., Lippincott-Raven, N.Y., 1997 год, Главы 3, 17 и 30; Uchida и соавт., 2004 год, J. Exp. Med. 199:1659-69; Akewanlop и соавт.,. 2001 год, Cancer Res. 61:4061-65; Watanabe и соавт., 1999 год, Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207). В дополнение к ADCC и ADCP области Fc антител, связанных с клеткой, также могут активировать классический путь комплемента, чтобы вызвать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). C1q системы комплемента связываются с областями Fc антител, когда они в комплексе с антигенами. Связывание C1q с клетками, связанными антителами, может инициировать каскад событий, связанных с протеолитической активацией C4 и C2, с образованием конвертазы C3. Расщепление C3-C3b с помощью конвертазы C3 позволяет активировать концевые компоненты комплемента, включая C5b, C6, C7, C8 и C9. В совокупности эти белки образуют поры мембраноатакующего комплекса на клетках, покрытых антителом. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая целевую клетку (см., Immunobiology, 6^{-e} изд., Janeway и соавт., Garland Science, N. Y., 2005 год, глава 2).

Термин "антитело-зависимая клеточная цитотоксичность" или ADCC описывает механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителом целевых клеток с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки присоединяются к эффекторному домену(ам) Fc Ig, связанному с целевыми клетками, через их сайты, связывающие антиген. Гибель покрытой антителом целевой клетки происходит в результате активности эффекторных клеток.

Термин "антитело-зависимый клеточный фагоцитоз" или ADCP относится к процессу, посредством которого клетки, покрытые антителом, поглощается, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с эффекторным доменом Fc Ig.

Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность" или CDC относится к механизму индуцирования гибели клеток, в котором эффекторный домен(ы) Fc связанного с целью антитела активирует серию ферментативных реакций, кульминацией которых является образование отверстий в мембране целевой клетки. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как целевые клетки, покрытые антителами, связывают и активируют компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели целевых клеток. Активация комплемента может также приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности целевой клетки, которые облегчают ADCC путем связывания комплементарных рецепторов (например, CR3) на лейкоцитах.

"Цитотоксический эффект" относится к истощению, элиминации и/или к гибели целевой клетки. "Цитотоксический агент" относится к агенту, который оказывает цитотоксическое действие на клетку.

Цитотоксические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в сочетании с антителом.

"Цитостатический эффект" относится к ингибированию клеточной пролиферации. "Цитостатический агент" относится к агенту, который оказывает цитостатический эффект на клетку, тем самым ингибируя рост и/или расширение определенной клеточной субпопуляции. Цитостатические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в сочетании с антителом.

Термин "фармацевтически приемлемый" обозначает одобренный или одобряемый регуляторным ведомством Федерального правительства или правительства штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин "фармацевтически совместимый ингредиент" относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которым антитело к BCMA вводится субъекту.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям антитела против BCMA-1 или его конъюгата или вещества, вводимого с антителом к BCMA-1. Примеры солей включают соли сульфата, цитрата, ацетата, оксалата, хлорида, бромида, йодида, нитрата, бисульфата, фосфата, кислого фосфата, изоникотината, лактата, салицилата, цитрата кислоты, тартрата, олеата, танната, пантотената, битартрата, аскорбата, сукцината, малеата, гентизината, фумарата, глюконата, глюкуроната, сахарата, формата, бензоата, глутамата, метансульфоната, этансульфоната, бензолсульфоната, р-толуолсульфоната и памоата (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоата)). Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как ацетатный ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. Примеры, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может

иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Если иное не исходит из контекста, термин "около" охватывает несущественные вариации, не оказывающие существенного влияния на функциональные свойства (например, в пределах погрешности или экспериментальных измерений).

Подробное описание

I. Общие сведения.

Изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с BCMA. Антитела полезны для лечения и диагностики различных видов злокачественных новообразований и иммунологических нарушений, а также для выявления BCMA.

II. Целевые молекулы.

Если не указано иное, то BCMA означает BCMA человека. Характерные последовательности нуклеиновой кислоты человека и аминокислот представлены в SEQ ID NO: 1 и 2. Если не указано иное, то контекстная ссылка на BMCA, подразумевает по меньшей мере внеклеточный домен белка (приблизительно остатки 1-54 SEQ ID NO: 2), а иногда и полный белок. Аналогичным образом, если не указано иное, из контекстной ссылки на BAFF и APRIL и их рецепторы, отличные от BCMA, относятся к человеческим последовательностям дикого типа, например, как указано в базе данных Swiss Prot.

III. Антитела по изобретению.

A. Специфичность связывания и функциональные свойства Антитело SG16.17 представляет собой моноклональное антитело крысы, которое специфически связывается с BCMA человека, как описано в примерах. Депонирование ATCC было осуществлено 15 августа 2005 года в соответствии с Будапештским договором. ATCC расположен на 10801 University Boulevard, Манассас, штат Виргиния. 20110-2209, США. Депонированию ATCC был присвоен номер доступа PTA-6937. Антитело SG16.17 ингибирует связывание BCMA с обоими лигандами, APRIL и BAFF. Антитело SG16.17, когда оно связано с IgG1 человека, вызывает ADCC, связывается и вызывает активация сигнального пути через рецепторы Fcγ. Антитело SG16.17 также может быть включено в конъюгат лекарственное средство-антитело для доставки связанного лекарственного средства внутрь клеток, экспрессирующих BCMA. Антитело SG16.45 представляет собой другое моноклональное антитело крысы, которое специфически связывается с BCMA человека, ингибирует его связывание с его лигандами и может доставлять связанное лекарственное средство внутрь клеток, которые экспрессируют BCMA.

Изобретение относится к гуманизированным, химерным и венированным формам антитела SG16.17 (обозначены как hSG16.17, CSG16.17 или VSG16.17) и SG16.45 (обозначены аналогичным образом). Такие антитела обычно сохраняют некоторые или все свойства для SG16.17 или SG16.45, отмеченные выше. Для любого данного свойства гуманизированные, химерные или венированные антитела могут проявлять свойство в той же степени в пределах экспериментальной ошибки или больше, или меньше, чем SG16.17 крысы или SG16.45. Аффинность гуманизированной, химерной или венированной формы антитела SG16.17 крысы (т.е. Ка) может быть больше, чем у антитела SG16.17 крысы, или в пределах пяти или в двух раз (т.е. больше, чем или меньше, чем), чем у антитела SG16.17 крысы для BCMA человека. Предпочтительные гуманизированные, химерные или венированные антитела SG16.17 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с антителами SG16.17 крысы за связывание с BCMA человека. Аффинность гуманизированной, химерной или венированной формы антитела SG16.45 крысы (т.е. Ка) может быть больше, чем у антитела SG16.45 крысы, или в пределах пяти или в двух раз (т.е. больше, чем или меньше, чем), чем у антитела SG16.45 крысы для BCMA человека. Предпочтительные гуманизированные, химерные или венированные антитела SG16.45 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с антителами SG16.45 крысы за связывание с BCMA человека.

Предпочтительные гуманизированные, химерные и венированные антитела ингибируют злокачественные новообразования (например, рост клеток, метастазы и/или летальность организма) или опосредуемые B-клетками иммунные нарушения, как показано in vitro, в модели на животных или в клинических испытаниях.

B. Антитела.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого "донорного" антитела прививают в последовательности "акцепторного" антитела человека (см., например, Queen, США 5530101 и 5585089, Winter, США 5225539, Carter, США 6407213 Adair, США 5859205 и Foote, США 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антител человека, смесь таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антител человека или последовательность области зародышевой линии. Для гуманизации SG16.17 предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является экзон V_H 1-2 зародышевой линии V_H и для экзона J (J_H), экзон J_H-3. Для легкой цепи предпочтительной акцепторной последовательностью является экзон V_L1-12 и J экзон J_K5. Для гуманизации SG16.45 предпочтительной последовательностью акцептора тяжелой цепи является HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO: 24), и предпочтительной последовательностью акцептора легкой цепи является KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO: 34).

Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей

мере четыре CDR полностью или по существу полученное из нечеловеческого антитела донора, и каркасных последовательностей вариабельной области и константных областей, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере два и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела и последовательность каркаса вариабельной области тяжелой цепи, и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, по существу из последовательностей каркаса вариабельной области тяжелой цепи человека и константной области. Аналогично, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере два и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела и последовательность каркаса вариабельной области легкой цепи, и константную область легкой цепи, если она присутствует, по существу из последовательностей каркаса вариабельной области легкой цепи человека и константной области. Кроме нанотел и дАт, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном или человеческом антителе по существу является или по существу идентичный соответствующему CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабат) идентичны между соответствующими CDR. Последовательности каркаса вариабельной области цепи антитела или константной области цепи антитела происходят по существу из последовательности каркаса вариабельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Кабат, идентичны.

Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено по Кабат, но, в альтернативном варианте, как определено IMGT, Чотия, соединенным Кабат-Чотия, АтМ или Контактом, или другим общепринятым определением) из антитела мыши, они также могут быть сделаны с меньшим количеством CDR (например, по меньшей мере 4 или 5) из антитела мыши (например, Pascalis и соавт., J. Immunol. 169:3076, 2002 год; Vajdos и соавт., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002 год; Iwahashi и соавт., Mol. Immunol. 36:107 9-1091, 1999 год; Tamura и соавт., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000 год).

Определенные аминокислоты из остатков каркаса вариабельной области человека могут быть выбраны для замещения в зависимости от их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний происходит с помощью моделирования, изучения характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирического наблюдения эффектов замещения или мутагенеза определенных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается от остатка каркаса вариабельной области мыши и выбранным остатком каркаса вариабельной области человека, аминокислота каркаса человека может быть замещена эквивалентной аминокислотой каркаса из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

(1) напрямую нековалентно связывает антиген,

(2) находится рядом с областью CDR,

(3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 Å области CDR); или

(4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

Изобретение обеспечивает гуманизированные формы антитела SG16.17 крысы, включая шесть характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи (hSG16.17 VH1-6) (SEQ ID NO: 11-16) и четыре характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей легкой цепи (hSG16.17 VK2-5) (SEQ ID NO: 19-22). Тяжелая и легкая цепи могут быть объединены в любых пермутациях, причем предпочтительными являются пермутации, включая любые из hSG16.17 VH1, VH3 или VH5. Пермутация, имеющая наилучшую комбинацию аффинности связывания, процентной идентичности последовательности с зародышевой линией человека, экспрессией и процентом мономерного содержимого, представляла собой hSG16.17 VH3 VK2. Это антитело проявляет схожую аффинность в пределах экспериментальной ошибки, как и SG16.17 крысы, более 85% идентичности последовательности с зародышевой линией человека в вариабельных областях как тяжелой, так и легкой цепи (таким образом, квалифицируя обозначение "гуманизированный" в соответствии с новой нормой INN), высокую экспрессию в клетках CHO и высокое относительное содержание мономеров. По сравнению с большинством других гуманизированных антител hSG16.17 VH3 VK2 необычен тем, что имеет большое количество мутаций вариабельной области каркаса, в которых человеческие акцепторные остатки изменяются на соответствующий остаток крысы (13), но также имеют большое количество "прямых" мутаций CDR, в которых остаток крысы в CDR по Кабат заменен на соответствующий остаток в человеческой акцепторной последовательности, так что в целом антитело имеет достаточную идентичность последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, которые классифицируются как гуманизированные согласно нормам INN. Большинство предыдущих гуманизированных антител имели полный CDR по Кабат из донорного антитела.

Изобретение относится к антителам, в которых вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и вариабельная область легкой цепи по меньшей

мере на 90% идентична hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Некоторые антитела по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности HV3 и по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VK2. Некоторые такие антитела содержат три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19). Некоторые такие антитела содержат три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO: 13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO: 19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L, а положение L53 может быть занято S или R. Предпочтительно положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Эти перечисленные остатки представляют собой аминокислоты из акцепторной последовательности человека, занимающие положения в CDR по Кабат. Некоторые антитела имеют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 крысиных остатков в человеческих CDR по Кабат, замененные соответствующими остатками из акцепторной последовательности человека. В некоторых антителах положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Некоторые антитела включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 обратных мутаций, представляющих замещение остатков последовательности акцепторной последовательности вариабельной области человека соответствующими крысиными остатками.

В некоторых антителах занимают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 положений H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере 1, 2 или 3 положений L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно. В некоторых антителах, каждое из положений H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, и каждое из L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно.

Поскольку гуманизированные антитела демонстрируют любое отклонение от примерного гуманизированного антитела hSG16.17 VH3 VK2, одна из возможностей такого дополнительного отклонения состоит в дополнительных обратных мутациях в каркасах вариабельной области. Также могут быть сделаны любые или все положения, обратно мутированные в других характерных гуманизированных зрелых вариабельных областях тяжелой или легкой цепи (т.е. 1, 2, 3, 4, 5 или все 6) H8, занятый R, H67, занятый A, H78, занятый A, L40, занятый S, L78, занятый M и L85, занятый D, или все 5 H38, занятые N, H40, занятые R, H73, занятые K, H82A, занятые S и H83, занятые T в тяжелой цепи и 1 или оба L3, занятые K, и L20, занятые I в легкой цепи. Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они в целом не улучшают аффинность и введение большего количества мышиных остатков может дать повышенный риск иммуногенности.

Другое возможное изменение заключается в замещении большего или меньшего количества остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, применяемых при конструировании характерных гуманизированных антител. В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, могут быть идентифицированы на основании областей CDR по Кабат, лежащих вне CDR, в соответствии с другими определениями, такими как гипервариабельные петли Чотии (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987 год), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически или, как описано в Gonzales и соавт., Mol. Immunol. 41:863 (2004 год). В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствует один или более донорных остатков CDR или в которых отсутствует весь донор CDR, аминокислота, занимающая положение, может быть аминокислотой, занимающей соответствующее положение (в соответствии с нумерацией Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR включает в себя баланс конкурирующих факторов. Такие замещения потенциально выгодны для уменьшения количества мышиных аминокислот в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замещения также могут вызывать изменения аффинности, а значительного снижения аффинности предпочтительно избегать. Положения для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически.

Хотя это и не предпочтительно, могут быть получены другие аминокислотные замещения, например, в каркасных остатках, не контактирующих с CDR, или даже некоторые потенциальные CDR-контактные остатки аминокислот в пределах CDR. Часто замены, сделанные в вариантах гуманизированных последовательностей, являются консервативными по отношению к замененной аминогруппе hSG16.17 VH3 VK2. Предпочтительно, замены по отношению к hSG16.17 VH3 VK2 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного мАт, то есть его способность связывать BCMA человека и ингибировать рост злокачествнных клеток.

Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой вариабельной области тяжелой и легкой цепи hSG16.17 VH3 VK2 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой вариабельной области как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи, или в обеих цепях) замен, делеций или вставок.

Другие предпочтительные сочетания гуманизированных тяжелых и легких цепей включают любые из hSG16.17 VH1 VK2, VH1 VK3, VH1 VK4, VH1 VK4, VH3 VK2, VH3 VK3, VH3 VK4 и VH3 VK5, и VH5 VK2, VH5 VK3, VH5 VK4, VH5 VK5, а также гуманизированные антитела, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей показывают по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с вариабельными областями тяжелой и легкой цепей любого из этих антител.

Изобретение относится к гуманизированным формам антитела SG16.45 крысы, включая шесть характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи (hSG16.45 VH1-6) (SEQ ID NO: 27-32) и четыре характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей легкой цепи (hSG16.45 VK1, 2, 3 и 5) (SEQ ID NO: 35-38). Тяжелая и легкая цепи могут быть объединены в любых пермутациях, причем предпочтительными являются пермутации hSG16.45 VH5 VK2, VH1 VK1 и VH1 VK5. hSG16.45 HV5 VK2 показывает более 85% идентичности последовательности с зародышевой линией человека в вариабельных областях как тяжелой, так и легкой цепи (таким образом, квалифицируя обозначение "гуманизированный" в соответствии с новой нормой INN), высокую экспрессию в клетках CHO и высокое относительное содержание мономеров и адекватное связывание, хотя и немного меньшее, чем у крысиного или химерного SG16.45. hSG16.45 VH5 VK2 имеет 3 обратные мутации вариабельной области (все в тяжелой цепи) и 3 прямых мутации CDR по Кабат, в которых крысиный остаток в CDR по Кабат заменен на соответствующий остаток в человеческой акцепторной последовательности, так что в целом антитело имеет достаточную идентичность последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, чтобы классифицироваться как гуманизированные согласно нормам INN.

Изобретение относится к антителам, в которых вариабельная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и вариабельная область легкой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.45 VK2. Некоторые антитела по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности hSG16.45 VH5 и по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VK2. Некоторые такие антитела включают три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36). Некоторые такие антитела включают три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36) при условии, что положение H50 может быть занято A или S, а положение L24 может быть занято R или L, и положение L26 может быть занято S или T. Предпочтительно положения H50 заняты A, а положения L24 и L26 заняты R и S. Эти перечисленные остатки представляют собой аминокислоты из человеческой акцепторной последовательности, занимающей позиции в пределах CDR по Кабат. Некоторые антитела имеют по меньшей мере 1, 2 или 3 крысиных остатков в человеческих CDR по Кабат, замененные соответствующими остатками из акцепторной последовательности человека. В некоторых антителах положения H50, L24 и L26 заняты A, R и S, соответственно. Некоторые антитела включают по меньшей мере 1, 2 или 3 обратных мутаций, представляющих замещение остатков последовательности акцепторной последовательности вариабельной области человека соответствующими крысиными остатками.

В некоторых антителах по меньшей мере 1, 2 или 3 положения H30, H93 и H94 заняты N, T и S, соответственно. В некоторых антителах каждое из положений H30, H93 и H94 занято N, T и S, соответственно.

Поскольку гуманизированные антитела демонстрируют любое отклонение от примерного гуманизированного антитела hSG16.45 VH5 VK2, одна из возможностей такого дополнительного отклонения состоит в дополнительных обратных мутациях в каркасах вариабельной области. Также могут быть сделаны любые или все положения, обратно мутированные в других характерных гуманизированных зрелых вариабельных областях тяжелой или легкой цепи (т.е. 1, 2, 3 или 4) H37, H48, H76, H107, занятых I, I, N, и V, соответственно и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из L14, L19, L21, L38, L58, L71 и L78, занятых A, V, I, H, V, Y и M, соответственно. Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они в целом не улучшают аффинность и введение большего количества мышиных остатков может дать повышенный риск иммуногенности.

Другое возможное изменение заключается в замещении большего или меньшего количества остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, применяемых при конструировании характерных гуманизированных антител. В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, могут быть идентифицированы на основании областей CDR по Кабат, лежащих вне CDR, в соответствии с другими определениями, такими как гипервариабельные петли Чотии (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987 год), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически или, как описано в

Gonzales и соавт., Mol. Immunol. 41:863 (2004 год). В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствует один или более донорных остатков CDR или в которых отсутствует весь донор CDR, аминокислота, занимающая положение, может быть аминокислотой, занимающей соответствующее положение (в соответствии с нумерацией Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR включает в себя баланс конкурирующих факторов. Такие замещения потенциально выгодны для уменьшения количества мышиных аминокислот в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замещения также могут вызывать изменения аффинности, а значительного снижения аффинности предпочтительно избегать. Положения для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически.

Хотя это и не предпочтительно, могут быть получены другие аминокислотные замещения, например, в каркасных остатках, не контактирующих с CDR, или даже некоторые потенциальные CDR-контактные остатки аминокислот в пределах CDR. Часто замены, сделанные в вариантах гуманизированных последовательностей, являются консервативными по отношению к замененным hSG16.45 VH3 VK2. Предпочтительно, замены по отношению к hSG16.45 VH5 VK2 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного мАт, то есть его способность связывать BCMA человека и ингибировать рост злокачественных клеток.

Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой вариабельной области тяжелой и легкой цепи SG16.45 VH5 VK2 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой вариабельной области как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи, или в обеих цепях) замен, делеций или вставок.

Другие предпочтительные сочетания гуманизированных тяжелых и легких цепей включают любые из hSG16.45 VH1 VK1 и VH1 VK5, а также гуманизированные антитела, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей показывают по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с вариабельными областями тяжелой и легкой цепей любого из этих антител.

C. Выбор константной области.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител могут быть связаны, по меньшей мере, с частью константной области человека. Выбор константной области зависит, в частности, от того, требуется ли антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека имеют сильную комплементзависимую цитотоксичность, изотип IgG2 человека имеет низкую комплементзависимую цитотоксичность, а человеческий IgG4 не обладает комплементзависимой цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные эффекторные функции, опосредованные клетками, чем IgG2 и IgG4 человека. Константными областями легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две светлые и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепи связаны спейсером.

Константные области человека показывают аллотипическую вариацию и изоалотипическую вариацию между разными индивидуумами, то есть константные области могут различаться у разных индивидуумов в одном или более полиморфных положениях. Изоалотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоалотип, связываются с неполиморфной областью одного или более других изотипов. Характерные человеческие последовательности константной области каппа и IgG1 дикого типа (последние с C-терминальным лизином или без него) представлены в SEQ ID NO: 3-5.

Одна или несколько аминокислот на амино или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или дериватизироваться в относительном содержании или во всех молекулах. Замещения могут быть сделаны в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter и соавт., патент США № 5624821, Tso и соавт., патент США № 5834597; и Lazar и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci. США 103:4005, 2006 год), или продления периода полувыведения у людей (см., например, Hinton и соавт., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004 год).

Типовое замещение включает аминокислотное замещение нативной аминокислоты на остаток цистеина, введенный в аминокислотных положениях 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C в изотипе IgG1 человека (нумерация соответствует индексу EU (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991); см., США 20100158909, который включен в данный документ в качестве ссылки). Последовательности константных областей тяжелой цепи с S239C с C-концевым лизином и без него приведены в SEQ ID NO: 6 и 7. Присутствие дополнительного остатка цистеина позволяет образовывать межцепочечные дисульфидные связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызвать стерическое несоответствие, тем самым уменьшая аффинность взаимодействия связывания области Fc-FcγR. Остаток(тки) цистеина, введенный в или в непосредственной близости к области Fc константной области IgG, может также служить в качестве сайтов конъюгации с лекарственными средствами (т.е. связывание

цитотоксических лекарственных средств с применением тиол специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Наличие лекарственного средства вызывает стерическое несоответствие, тем самым дополнительно уменьшая аффинность взаимодействия связывания области Fc-FcγR. Другие замещения в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают аффинность к рецепторам Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., например, США 6624821, США 5624821). Предпочтительной комбинацией мутаций являются S239D, A330L и I332E, что увеличивает аффинность домена Fc для FcγRIIIA и, следовательно, увеличивает ADCC.

Период полувыведения антитела in vivo также может влиять на его эффекторные функции. Период полувыведения антитела можно увеличить или уменьшить для изменения его терапевтической активности. FcRn представляет собой рецептор, который структурно подобен антигену MHC класса I, который нековалентно ассоциируется с β2-микро глобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз через ткани (Ghetie and Ward, 2000 год, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002 год, Immunol. Res. 25:97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет вернуть IgG обратно в кровообращение (Ghetie and Ward, 2000 год, Алл. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002 год, Immunol. Res. 25:97-113). Была картирована область IgG1 человека, участвующая в связывании FcRn (Shields и соавт., 2001 год, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Замещения аланина в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG1 усиливают связывание FcRn (Shields и соавт., 2001 год, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замещения, имеют более длительный период полувыведения в сыворотке. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, проявлять свои терапевтические эффективности в течение более длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие характерные замещения для увеличения связывания с FcRn включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерация EU используется для всех положений в константной области.

Олигосахариды, ковалентно присоединенные к консервативному Asn297, участвуют в способности области Fc IgG связывать FcγR (Lund и соавт., 1996 год, J. Immunol. 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997 год, Trends Biotechnol. 15:26-31). Конструирование этой гликоформы на IgG может значительно улучшить, ADCC опосредованную IgG. Добавление биссектирующих модификаций N-ацетилглюкозамина (Umana и соавт., 1999 год, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies и соавт., 2001 год, Biotech. Bioeng. 74:288-94) к этой гликоформе или удаление фукозы (Shields и соавт., 2002 год, J. Biol. Chem. 277:26733-40; Shinkawa и соавт., 2003 год, J. Biol. Chem. 278:6591-604; Niwa и соавт., 2004 год, Cancer Res. 64:2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами конструирования IgG Fc, которое улучшает связывание между IgG Fc и FcγR, тем самым усиливая активность ADCC, опосредованную Ig.

Системное замещение гидрофильных аминокислот в области Fc IgG1 человека образовывало варианты IgG с измененными аффинностями связывания FcγR (Shields и соавт., 2001 год, J. Biol. Chem. 276:6591-604). По сравнению с исходным IgG1, подмножество этих вариантов, включающих замещения в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333/Lys334 на Ala, демонстрирует увеличение как аффинности связывания по отношению к FcγR так и активности ADCC (Shields и соавт., 2001 год, J. Biol. Chem. 276:6591-604; Okazaki и соавт., 2004 год, J. Mol. Biol. 336:1239-49).

Эффективность фиксации комплемента антител (как связывание C1q, так и активность CDC) может быть улучшена путем замещений в Lys326 и Glu333 (Idusogie и соавт., 2001 год, J. Immunol. 166:2571-2575). Те же самые замещения на остове IgG2 человека могут изменять изотип антитела, которое плохо связывается с C1q и демонстрирует существенный дефицит активности при активации комплемента на тот, который может связывать C1q и опосредовать CDC (Idusogie и соавт., 2001 год, J. Immunol. 166:2571-75). Несколько других способов также были применены для улучшения эффективности фиксации комплемента антител. Например, прививание 18-аминокислотной карбоксильной концевой части IgM карбоксильным концам IgG значительно усиливает их активность CDC. Это наблюдается даже с IgG4, который обычно не демонстрирует активности CDC (Smith и соавт., 1995 год, J. Immunol. 154:2226-36). Также, замещение Ser444, расположенного вблизи карбоксильного конца тяжелой цепи IgG1 на Cys индуцировало димеризацию "хвост к хвосту" IgG1 с 200-кратным увеличением активности CDC по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes и соавт., 1992 год, J. Immunol. 148:2918-22). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью к C1q также обеспечивает активность CDC (Kontermann и соавт., 1997 год, Nat. Biotech. 15:629-31).

Активность комплемента может быть уменьшена путем мутирования по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток, имеющий другую боковую цепь, такой как Ala. Другие алкилзамещенные неионогенные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки как Phe, Tyr, Trp и Pro на месте любого из трех остатков также уменьшают или устраняют связывание C1q. Ser, Thr, Cys и Met могут применяться в остатках 320 и 322, но не 318, с целью уменьшения или устранения активности связывания C1q. Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может изменять, но не устранять активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к удалению литической активности, но лишь незначительно уменьшает (примерно

в три раза слабее) аффинность к C1q. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и сводит к нулю присутствие углевода, которое требуется для активации комплемента. Любое другое замещение в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также уменьшают связывание C1q: D270A, K322A, P329A и P311S (см., WO 06/036291).

Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую пермутацию остатков, занимающих полиморфные положения в естественных аллотипах. Кроме того, может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций по сравнению с природной константной области человека, такой как указанные выше, для уменьшения связывания рецептора Fcγ или увеличения связывания с FcRN.

D. Экспрессия рекомбинантных антител.

Гуманизированные, химерные или венированные антитела обычно продуцируются в результате рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают в себя последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая естественно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно, последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать клетки эукариотических хозяев. Как только вектор встраивается в соответствующего хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, а также для сбора и очистки перекрестнореагирующих антител.

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См., Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, Нью-Йорк, 1987 год). Ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, был разработан в данной области техники и включает в себя клеточные линии CHO (например, DG44), различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки представляют собой нечеловеческие клетки. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen и соавт., Immunol. Rev. 89:49, 1986 год)) и необходимые сайты процессинга информации, такие как сайты связывания рибосом, сплайс-сайты РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и тому подобного. См., Co и соавт., J. Immunol. 148:1149 (1992 год).

После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами данной области техники, включая очистку с помощью ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и тому подобное (см., в общем, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, Нью-Йорк, 1982 год)).

E. Варианты гликозилирования.

Антитела могут быть гликозилированы в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, (1997 год) Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, (1997 год) TibTECH 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd и соавт., (1996 год) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990 год) Biochem. 29:4175-4180) и внутримолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, которое может влиять на конформацию и представляет собой трехмерную поверхность гликопротеина (Hefferis and Lund, выше; Wyss and Wagner, (1996 год) Current Opin. Biotech. 7:409-416). Олигосахариды могут также применяться для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основе конкретных распознающих структур. Например, было сообщено, что в агалактозилированном IgG олигосахаридный фрагмент "переворачивается" из пространства между CH2 и концевые остатки N-ацетилглюкозамина становятся доступным для связывания манноза-связывающего белка (Malhotra и соавт., (1995 год) Nature Med. 1:237-243). Удаление гликопептидазой олигосахаридов из CAMPATH-1H (рекомбинантное гуманизированное мышиное моноклональное антитело IgG1, которое распознает антиген CDw52 лимфоцитов человека), продуцируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO), привело к полному снижению лизиса, опосредованного комплементом (CMCL) (Boyd и соавт., (1996 год) Mol. Immunol. 32:1311-1318), в то время как выборочное удаление остатков сиаловой кислоты с применением нейраминидазы не приводило к потере DMCL. Сообщалось также, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией β(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), катализирующие гликозилтрансферазой образование биссектирующего N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), как сообщается, улучшают активность ADCC (Umana и соавт. (1999 год) Mature Biotech. 17:176-180).

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую

аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацеилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также могут быть применены 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Варианты гликозилирования антител представляют собой варианты, в которых изменен профиль гликозилирования антитела. Под изменением подразумевается удаление одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, добавление к антителу одного или более углеводных фрагментов, изменение состава гликозилирования (профиля гликозилирования), степени гликозилирования и тому подобное.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу может быть осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение может также быть сделано добавлением, или замещением, одного или более остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела (для сайтов с О-связанным гликозилированием). Аналогичным образом удаление сайтов гликозилирования может быть осуществлено путем изменения аминокислот в естественных сайтах гликозилирования антитела.

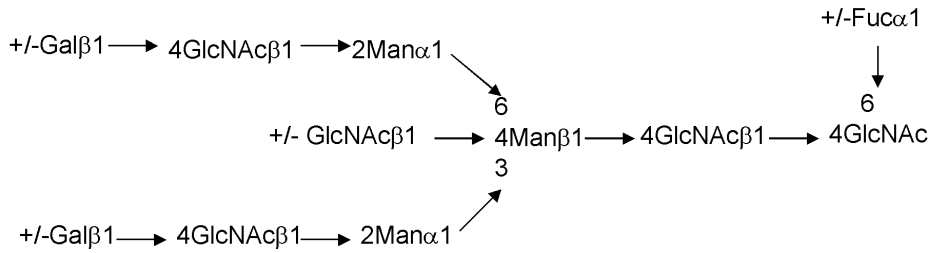
Аминокислотную последовательность обычно изменяют путем изменения лежащей в ее основе последовательности нуклеиновой кислоты. Эти способы включают выделение из природного источника (в случае вариантов аминокислотных последовательностей естественного происхождения) или получение олигонуклеотид-опосредованным (или сайт-направленным) мутагенезом, ПЦР-мутагенезом и кассетным мутагенезом ранее приготовленного варианта или не-вариантной версии антитела.

Гликозилирование (включая профиль гликозилирования) антител также может быть изменено без изменения аминокислотной последовательности или лежащей в ее основе нуклеотидной последовательности. Гликозилирование во многом зависит от клетки-хозяина, применяемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, применяемый для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например, антител, в качестве потенциальной терапии редко является нативной клеткой, можно ожидать значительных изменений в профиле гликозилирования антител. См., например, Hse и соавт., (1997 год) J. Biol. Chem. 272:9062-9070. В дополнение к выбору клеток-хозяев факторы, которые влияют на гликозилирование при рекомбинантном продуцировании антител, включают в себя режим роста, состав культуральной среды, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и тому подобное. Предложены различные способы изменения профиля гликозилирования, достигнутого в конкретном организме-хозяине, включая введение или сверхэкспрессирование определенных ферментов, участвующих в производстве олигосахаридов (патенты США № 5047335, 5510261, 5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования могут быть ферментативно удалены из гликопротеина, например, с использованием эндогликозидазы H (Эндо H). Кроме того, рекомбинантная клетка-хозяин может быть генетически сконструированной, например. дефектной при производстве некоторых типов полисахаридов. Эти и подобные методы хорошо известны в данной области техники.

Структуру гликозилирования антител можно легко проанализировать с помощью обычных методов анализа углеводов, включая лектиновую хроматографию, ЯМР, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, гель-проникающая хроматография (GPC), композиционный анализ моносахаридов, последовательное ферментативное расщепление и высокоэффективная анионообменная хроматография с пульсирующим амперометрическим детектором (HPAEC-PAD), в которой используется анионообменная хроматография высокого pH для разделения олигосахаридов на основе заряда. Способы высвобождения олигосахаридов в аналитических целях также известны и включают, без ограничения, ферментативную обработку (обычно выполняемую с применением пептид-N-гликозидазы F/эндоβ-галактозидазы), элиминацию с применением жесткой щелочной среды для высвобождения главным образом О-связанных структур и химических способов с применением безводного гидразина для высвобождения как N-, так и О-связанных олигосахаридов.

Предпочтительной формой модификации гликозилирования антител является восстановительное первичное фукозилирование. "Коровое фукозилирование" относится к добавлению фукозы ("фукозилирования") к N-ацетилглюкозамин ("GlcNAc") на восстановительном конце N-связанного гликана.

"Комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара" обычно связывается с аспарагином 297 (в соответствии с нумерацией по Кабат). В настоящем документе, комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара имеет двухантенарную составную цепь сахара, в основном имеющую следующую структуру:



Где + указывает, что молекула сахара может присутствовать или отсутствовать, а числа указывают положение связей между молекулами сахара. В вышеуказанной структуре конец сахарной цепи, который связывается с аспарагином, называется восстанавливающим концом (справа), а противоположная сторона называется невосстанавливающим концом. Фукоза обычно связывается с N-ацетилглюкозамином ("GlcNAc") восстанавливающего конца, как правило, с помощью связи α1,6 (6-положение GlcNAc связано с 1-положением фукозы). "Gal" относится к галактозе, а "Man" относится к маннозе.

"Комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара" включает 1) комплексный тип, в котором сторона невосстанавливающего конца первичной структуры имеет одну или более ветвей галактозы-N-ацетилглюкозамина (также называемой "gal-GlcNAc"), а сторона невосстанавливающего конца Gal-GlcNAc необязательно имеет сиаловую кислоту, биссектирующую N-ацетилглюкозамин или тому подобное; или 2) гибридный тип, в котором сторона невосстанавливающего конца первичной структуры имеет обе ветви цепи, связанной с N-гликозид-сахаром с высоким содержанием маннозы и комплексную цепь, связанную с N-гликозид-сахаром.

В некоторых вариантах осуществления изобретения "комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара" включает комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона первичной структуры имеет ноль, одну или более ветвей галактозы-N-ацетилглюкозамина (также называемой "gal-GlcNAc"), а невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет такую структуру, как сиаловая кислота, биссектирующая N-ацетилглюкозамин или тому подобное.

В соответствии с данными способами, как правило, только незначительное количество фукозы вводится в комплекс N-гликозид-связанная цепь(и) сахара или гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 или SG16.45. Например, в различных вариантах реализации изобретения менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% молекул антитела имеют коровое фукозилирование фукозой. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 2% молекул антитела имеет коровое фукозилирование фукозой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита или продукта аналога фукозы) вводят в комплекс N-гликозид-связанная цепь(и) сахара. Например, в различных вариантах реализации изобретения менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 или SG16.45 имеют коровое фукозилирование аналогам фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 2% гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 имеют коровое фукозилирование с помощью аналога фукозы или метаболита или продукта аналога фукозы.

Способы получения нефукозилированных антител путем инкубации продуцирующих антитела клеток с аналогом фукозы описаны, например, в WO 2009/135181. Кратко, клетки, которые были сконструированы для экспрессии гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17, инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Внутриклеточный метаболит может быть, например, GDP-модифицированным аналогом или полностью, или частично деэтерифицированным аналогом. Продуктом может быть, например, полностью или частично деэтерифицированный аналог. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в реутилизационном пути фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или GDP-фукозо-пирофосфорилазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например, белок FUT8). В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента в de novo синтетическом пути для фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность GDP-маннозо-4,6-дегидратазы или/или GDP-фукозо-синтетазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать транспортер фукозы (например, транспортер GDP-фукозы).

В одном варианте реализации изобретения аналог фукозы представляет собой 2-фторофукозу. Способы применения аналогов фукозы в среде для выращивания и других аналогах фукозы описаны, напри-

мер, в WO/2009/135181, который включен в данном документе в качестве ссылки.

Другие способы конструирования клеточных линий для уменьшения корового фукозилирования включали нокаут генов, нокин генов и РНК-интерференцию (РНКи). В нокаутах гена инактивируется ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансфераза). FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. FUT8, как сообщается, является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы в N-связанный двухантенарный углевод в Asn297. Нокины генов добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или гольджи альфа маннозидазу II. Увеличение уровней таких ферментов в клетках отклоняет моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к уменьшению корового фукозилирования) и имеет увеличенное количество биссектирующих N-ацетилглюкозаминов. РНКи обычно также нацеливается на экспрессию гена FUT8, приводя к снижению уровня транскрипции мРНК или полностью инактивируя экспрессию гена. Любой из этих способов может быть применен для производства клеточной линии, которая могла бы продуцировать нефукозилированное антитело, например, гуманизированное, химерное или венированное антитело SG16.17.

Существует множество способов определения количества фукозилирования на антителе. Способы включают, например, ЖК-МС через хроматографию PLRP-S и квадрупольную время-пролетную масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией (TOF MS).

IV. Нуклеиновые кислоты.

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любую из гуманизированных тяжелых и легких цепей, описанных выше. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелыми тяжелыми и легкими цепями. Кодирующие последовательности на нуклеиновых кислотах могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, с помощью твердофазного синтеза или ПЦР перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, внутри экспрессионного вектора или могут быть раздельными, например, каждая клонирована в свой собственный экспрессионный вектор.

V. Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Антитела против MCMA могут быть конъюгированы с цитотоксическими фрагментами с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Особенно подходящими фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические вещества (например, химиотерапевтические вещества), ферменты, конвертирующие пролекарство, радиоактивные изотопы или соединения, или токсины (эти фрагменты в совокупности называются терапевтическими агентами или лекарственными средствами). Например, антитело к BCMA может быть конъюгировано с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент или токсином (например, цитостатический или цитоцидный агент, такой как, например, абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин). Примеры полезных классов цитотоксических агентов включают, например, белки, связывающиеся по малой бороздке ДНК, алкилирующие ДНК агенты и ингибиторы тубулина. Характерные цитотоксические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзины и майтансиноиды (например, DM1 и DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4]бензодиазепины (ПБД), индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины) и алкалоиды барвинка. Хорошо известны методы конъюгирования терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами. (См., например, Alley и соавт., Current Opinion in Chemical Biology 2010 год 14:1-9; Senter, Cancer J., 2008 год, 14(3):154-169).

Терапевтическое агент (например, цитотоксический агент) может быть конъюгирован с антителом таким образом, чтобы уменьшить его активность, если оно не отделено от антитела (например, путем гидролиза, деградацией антител или расщепляющим средством). Такой терапевтический агент может быть присоединен к антителу через линкер. Терапевтический агент, конъюгированный с линкером, также упоминается в данном документе как линкер для лекарственных средств. Природа линкера может сильно различаться. Компоненты, составляющие линкер, выбираются исходя из их характеристик, которые могут быть продиктованы, в частности, условиями на сайте, куда доставляется конъюгат.

Терапевтический агент может быть присоединен к антителу с расщепляемым линкером, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде злокачественных клеток, экспрессирующих антитела против BCMA, но не по существу чувствительным к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела когда он интернализуется злокачественной клеткой, экспрессирующей антитела против BCMA (например, в эндосомальной или, например, в силу pH-чувствительности или чувствительности к протеазе, в лизосомальной среде или в среде кавеолоры). Терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с нерасщепляемым линкером.

Как указано, линкер может содержать расщепляемую единицу. В некоторых таких вариантах реали-

зации изобретения структура и/или последовательность расщепляемой единицы выбрана так, что он расщепляется действием ферментов, присутствующих на целевом сайте (например, целевой клетке). В других вариантах реализации изобретения можно также применять расщепляемые единицы, которые могут быть расщепляемыми посредством изменения pH (например, лабильного или щелочно-лабильного), температуры или при облучении (например, фото-лабильного).

В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемая единица может содержать одну аминокислоту или непрерывную последовательность аминокислот. Аминокислотная последовательность может быть целевым субстратом для фермента.

В некоторых аспектах расщепляемая единица представляет собой пептидильную единицу и имеет длину по меньшей мере в две аминокислоты. Расщепляемые вещества могут включать катепсины B и D, и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999 год, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Наиболее типичными являются расщепляемые единицы, расщепляемые ферментами, которые присутствуют в клетках, экспрессирующих антитела против BCMA, то есть расщепляемым ферментом линкер. Соответственно, линкер может быть расщеплен внутриклеточной пептидазой или протеазным ферментом, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Например, можно применять линкер, который расщепляется тиоло-зависимой протеазой катепсин-B, которая экспрессируется на высоком уровне в злокачественной ткани. (например, линкером, содержащим пептид Phe-Leu или Val-Cit, или пептид Val-Ala).

В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер будет содержать расщепляемую единицу (например, пептидильную единицу), и расщепляемая единица будет непосредственно конъюгирована с терапевтическим агентом. В других вариантах реализации изобретения расщепляемая единица будет конъюгирована с терапевтическим агентом через дополнительную функциональную единицу, например, саморасщепляющуюся или самонерасщепляющуюся спейсерную единицу. Самонерасщепляющаяся спейсерная единица представляет собой единицу, в которой часть или вся спейсерная единица остается связанной с единицей лекарственного средства после расщепления расщепляемой единицы (например, аминокислоты) от конъюгата лекарственного средства антитела. Для высвобождения лекарственного средства в целевой клетке протекает независимая реакция гидролиза для расщепления спейсерной единицы от лекарственного средства.

При наличии саморасщепляющейся спейсерной единицы лекарственное средство высвобождается без необходимости для лекарственного средства в отдельной стадии гидролиза. В одном варианте реализации изобретения, в котором линкер содержит расщепляемую единицу и саморасщепляющуюся группу, расщепляемая единица расщепляется действием фермента и после расщепления расщепляемой единицы, саморасщепляющаяся группа (группы) высвобождает терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемая единица линкера будет прямо или опосредованно конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце будет прямо или опосредованно конъюгирована с антителом. В некоторых таких вариантах реализации изобретения расщепляемая единица будет прямо или опосредованно (например, через саморасщепляющуюся или самонерасщепляющуюся спейсерную единицу) конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце буден конъюгирована с антителом через единицу для удлинения. Единица для удлинения связывает антитело с остальной частью лекарственного средства и/или линкера лекарственного средства. В одном варианте реализации изобретения связь между антителом и остальной частью лекарственного средства или линкера лекарственного средства осуществляется через малеимидную группу, например, с помощью малеимидокапроильного линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело будет связано с лекарственным средством через дисульфид, например, дисульфидсвязанные конъюгаты майтанзиноида SPDB-DM4 и SPP-DM1.

Связь между антителом и линкером может осуществляться с помощью нескольких различных путей, например, через тиоэфирную связь, через дисульфидную связь, через амидную связь или через сложноэфирную связь. В одном варианте реализации изобретения связь между антителом к BCMA и линкером образуется между тиольнои группой цистеинового остатка антитела и малеимидной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения межцепочечные связи антитела превращаются в свободные тиольные группы до реакции с функциональной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток цистеина вводится в тяжелую или легкую цепь антитела и реагирует с линкером. Положения для введения цистеина путем замещения в тяжелых или легких цепях антитела включают положения, описанные в опубликованной заявке на патент США № 2007-0092940 и международной патентной публикации WO 2008070593, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу I:

$$L-(LU-D)_p \qquad (I)$$

где L представляет собой антитело к BCMA, LU представляет собой линкерную единицу, а D представляет собой единицу лекарственного средства (т.е. терапевтический агент). Обозначение p варьируется от 1 до 20. Такие конъюгаты содержат антитело к BCMA, ковалентно связанное, по меньшей мере, с одним лекарственным средством через линкер. Линкерная единица соединена на одном конце с антите-

лом, а на другом конце с лекарственным средством.

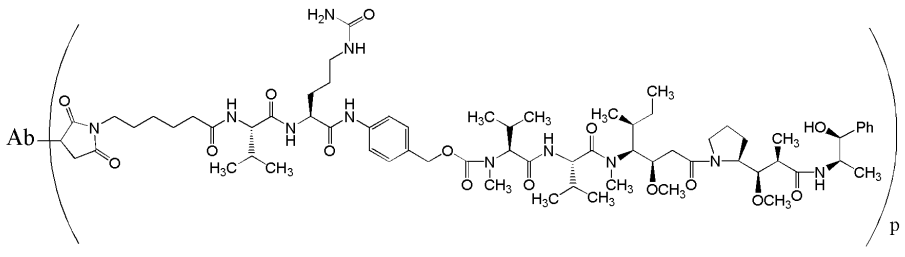
Содержание лекарственного средства представлено p, количеством молекул лекарственного средства на антитело. Содержание лекарственного средства может составлять от 1 до 20 единиц лекарственного средства (D) на антитело. В некоторых аспектах обозначение p будет находиться в диапазоне от 1 до 20 (т.е. как целые, так и нецелые значения от 1 до 20). В некоторых аспектах обозначение p будет целым числом от 1 до 20 и будет представлять количество лекарственных средств-линкеров на одном антителе. В других аспектах p представляет собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, например, среднее число лекарственных средств-линкеров на антитело в реакционной смеси или композиции (например, фармацевтическая композиция) и может быть целым или нецелым значением. Соответственно, в некоторых аспектах, для композиций (например, фармацевтических композиций) p представляет собой среднее содержание лекарственного средства конъюгатов антитело-лекарственное средство в композиции, а p варьируется от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет от около 1 до около 8 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения p равно 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения p равно 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет от около 2 до около 8 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет от около 2 до около 6, от 2 до около 5 или от 2 до около 4 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет около 2, около 4, около 6 или около 8 лекарственных средств на антитело.

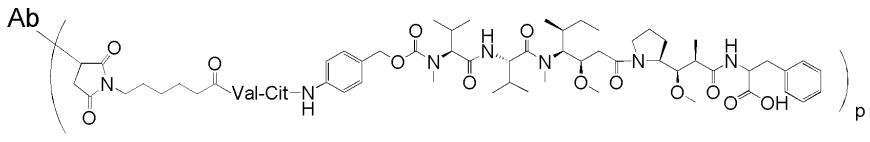
Среднее количество молекул лекарственных средств на антитело в препарате из реакции конъюгирования можно охарактеризовать обычными средствами, например, масс- спектроскопией, ИФА, хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC) и ВЭЖХ. Количественное распределение конъюгатов относительно p также может быть определено.

Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина, т.е. конъюгаты, в которых компонентом лекарственного средства является лекарственное средство ауристатин. Показано, что ауристатины, связывающие тубулин, влияют на динамику микротрубочек и ядерное и клеточное деление, и обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством ауристатина и антителом к BCMA. Ауристатины могут быть связаны с антителом к BCMA в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Линкером может быть, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый путем деградации антитела). Ауристатин может быть ауристатином E или его производным. Ауристатин может представлять собой, например, сложный эфир, образованный между ауристатином E и кетокислотой. Например, ауристатин E можно подвергнуть взаимодействию с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой для получения AEB и AEVB, соответственно. Другие типичные ауристатины включают MMAF (монометил ауристатин F) и MMAE (монометил ауристатин E). Синтез и структура типовых ауристатинов описаны в публикациях США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

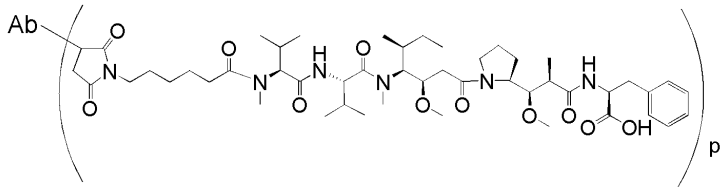
Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина включают конъюгаты антитела-лекарственные средства vcMMAE, vcMMAF и mcMMAF, как показано ниже, при этом Ат представляет собой антитело, как описано в данном документе, а val-cit представляет собой дипептид валин-цитруллин:



Ат-vcMMAE



Ат-vcMMAF

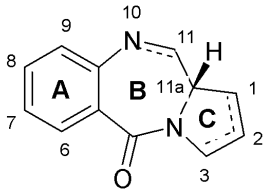


Ат-mcMMAF

или его фармацевтически приемлемую соль. Содержание лекарственного средства представлено p, количеством молекул лекарственное средство-линкер на антитело. В зависимости от контекста p может представлять собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, также относящееся к среднему содержанию лекарственного средства. Величина p находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения, когда p представляет собой среднее содержание лекарственного средства, p составляет от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых аспектах антитело конъюгирует с линкером через атом серы остатка цистеина. В некоторых аспектах остаток цистеина представляет собой такой, который сконструирован в антителе. В других аспектах остаток цистеина представляет собой межцепочечный дисульфидный остаток цистеина.

Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD; т.е. конъюгаты антитело-лекарственное средство, в которых лекарственным средством является лекарственное средство PBD.

PBD имеют общую структуру:



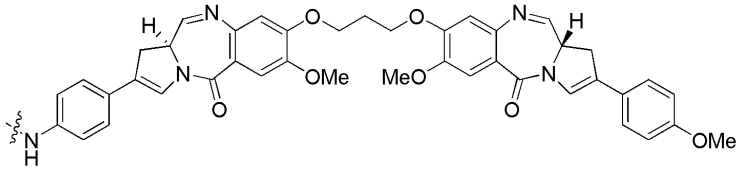
Они различаются по количеству, типу и положению заместителей как в их ароматических кольцах A, так и в пирроло кольцах C и в степени насыщения кольца C. В кольце B присутствует либо имин (N=C), карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)) в положении N10-C11, который представляет собой электрофильный центр, ответственный за алкилирование ДНК. Все известные природные вещества имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что дает им правосторонний поворот, если смотреть с кольца C на кольцо A. Это дает им подходящую трехмерную форму для изоспиральности малой бороздки B-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания. Способность PBD образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им взаимодействовать с процессингом ДНК, из этого следует их применение в качестве противоопухолевых средств.

Биологическую активность этих молекул можно усиливать путем соединения двух единиц PBD вместе через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы посредством гибкого алкиленового линкера. Считается, что димеры PBD образуют повреждения основываясь на определенных последовательностях ДНК, такие повреждения как палиндромическая межцепочечная поперечная сшивка 5'-Pu-GATC-Py-3', которая, как считается, в основном отвечает за их биологическую активность.

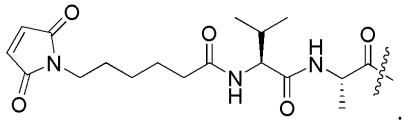
В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD содержат димер PBD, связанный с антителом к BCMA. Мономеры, которые образуют димер PBD, могут быть одинаковыми или разными, т.е. симметричными или несимметричными. Димер PBD может быть связан с антителом к BCMA в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения димер PBD будет иметь заместитель в положении C2, который обеспечивает точку привязки для связывания соединения с антителом к BCMA. В альтернативных вариантах реализации изобретения положение N10 димера PBD обеспечит точку привязки для связывания соединения с антителом к BCMA.

Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе PBD содержит линкер между лекарственным средством PBD и антителом к BCMA. Линкер может содержать расщепляемую единицу (например, аминокислоту или смежную последовательность аминокислот, которая является целевым субстратом для фермента) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый путем деградации антитела). Линкер может дополнительно содержать малеимидную группу для связывания с антителом, например, малеимидокапроил. Линкер может, в некоторых вариантах осуществления изобретения, дополнительно содержать саморасщепляющуюся группу, такую как, например, единица p-аминобензилового спирта (PAB).

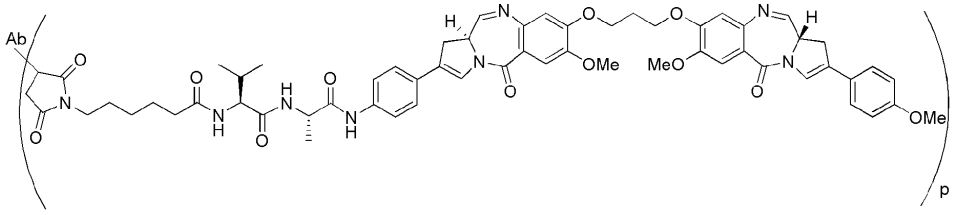
Характерный PBD для применения в качестве конъюгата описан в международной заявке № WO 2011/130613 и выглядит следующим образом, при этом волнистая линия указывает сайт прикрепления к линкеру:



или его фармацевтически приемлемую соль. Характерный линкер выглядит следующим образом, при этом волнистая линия указывает сайт присоединения к лекарственному средству, а антитело связано через малеимидную группу.



Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD включают конъюгаты антитело-лекарственное средство, как показано ниже, при этом Ат представляет собой антитело, как описано в данном документе:



или его фармацевтически приемлемую соль. Содержание лекарственного средства представлено p, количеством молекул лекарственное средство-линкер на антитело. В зависимости от контекста p может представлять собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, также относящееся к среднему содержанию лекарственного средства. Величина p находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения, когда p представляет собой среднее содержание лекарственного средства, p составляет от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых аспектах антитело конъюгирует с линкером лекарственного средства через атом серы остатка цистеина, который сконструирован в антителе. В некоторых аспектах остаток цистеина сконструирован в антителе в положении 239 (IgG1), согласно индексу EU (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991).

VI. Животные модели иммунологических нарушений или злокачественных новообразований, экспрессирующих BCMA.

Антитела или производные к BCMA можно тестировать или валидизировать на животных моделях иммунологических нарушений или злокачественных новообразований, экспрессирующих BCMA. Примеры для животных моделей системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваний, включая диабет, волчанку, системный склероз, синдром Шегрена, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (рассеянный склероз), тиреоидит, миастению гравис, артрит, увеит, воспалительную болезнь кишечника были описаны Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity:Spontaneous and Induced," в The Autoimmune Diseases (Rose and Mackay ред., Academic Press, 1998 год) и в "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease," в Current Protocols in Immunology (Coligan и соавт., ред., Wiley and Sons, 1997 год).

Аллергические состояния, например, астма и дерматит, также могут быть смоделированы у грызунов. Гиперчувствительность дыхательных путей может быть индуцирована у мышей овальбумином (Tomkinson и соавт., 2001 год, J. Immunol. 166:5792-800) или антигеном яйца Sistosoma mansoni (Tesciuba и соавт., 2001 год, J. Immunol. 167:1996-2003). Штамм Nc/Nga мышей проявляет заметное увеличение сывороточного IgE и спонтанно развивает поражения, подобные атопическому дерматиту (Vestergaard и соавт., 2000 год, Mol. Med. Today 6:209-10; Watanabe и соавт., 1997 год, Int. Immunol. 9:461-66; Saskawa и соавт., 2001 год, Int. Arch. Allergy Immunol. 126:239-47).

Инъекция иммунокомпетентных донорных лимфоцитов в летально облученного гистонесовместимого хозяина является классическим подходом индуцирования РТПХ (реакции "трансплантат против хозяина") у мышей. В альтернативном варианте, исходная модель мыши B6D2F1 обеспечивает систему, индуцирующую как острую, так и хроническую РТПХ. В этой модели мыши B6D2F1 являются потомством F1 от скрещивания между исходными линиями мышей C57BL/6 и DBA/2. Перенос лимфоидных клеток DBA/2 на необлученные мыши B6D2F1 вызывает хроническую РТПХ, принимая во внимание перенос C57BL/6, C57BL/10 или B10. Лимфоидные клетки D2 вызывают острую РТПХ (Slayback и соавт., 2000, Transm. 26:931-938; Kataoka и соавт., 2001 год, Immunology 103:310-318).

Кроме того, как человеческие гемопоэтические стволовые клетки, так и зрелые лимфоидные клетки периферической крови могут быть привиты мышам SCID, и эти человеческие лимфогемопоэтические

клетки сохраняют активность у мышей SCID (McCune и соавт, 1988 год, Science 241:1632-1639; Kamel-Reid and Dick, 1988 год, Science 242:1706-1709; Mosier и соавт., 1988 год, Nature 335:256-259). Это обеспечило систему модели на небольших животных для прямого тестирования потенциальных терапевтических агентов на лимфоидных клетках человека. (См., например, Tournoy и соавт., 2001 год, J. Immunol. 166:6982-6991).

Кроме того, модели на небольших животных для изучения in vivo эффективности антител или производных к BCMA могут быть созданы путем имплантации линий опухолевых клеток человека, экспрессирующих BCMA, в подходящие иммунодефицитные линии грызунов, например, бестимусные мыши или мыши SCID. Примеры клеточных линий лимфомы человека, экспрессирующих BCMA, включают, например, Daudi (Ghetie и соавт., 1994 год, Blood 83:1329-36; Ghetie и соавт., 1990 год, Int. J. Cancer 15:481-85; de Mont и соавт., 2001 год, Cancer Res. 61:7654-59), Ramos (Ma и соавт., 2002 год, Leukemia 16:60-6; Press и соавт., 2001 год, Blood 98:2535-43), HS-Sultan (Cattan and Maung, 1996 год, Cancer Chemother. Pharmacol. 38:548-52; Cattan and Douglas, 1994 год, Leuk. Res. 18:513-22), Raji (Ochakovskaya и соавт., 2001 год, Clin. Cancer Res. 7:1505-10; Breisto и соавт., 1999 год, Cancer Res. 59:2944-49) и CA46 (Kreitman и соавт., 1999 год, Int. J. Cancer 81:148-55). Неограничивающим примером линии лимфомы Ходжкина, экспрессирующей BCMA, является L540cy (Barth и соавт., 2000 год, Blood 95:3909-14, Wahl и соавт., 2002 год, Cancer Res., 62:3736-42). Неограничивающие примеры клеточных линий карциномы почек человека, экспрессирующих BCMA, включают 786-O (Ananth и соавт., 1999 год, Cancer Res. 59:2210-16; Datta и соавт., 2001 год, Cancer Res. 61:1768-75), ACHN (Hara и соавт., 2001 год, J. Urol. 166:2491-94; Miyake и соавт., 2002 год, J. Urol. 167:2203-08), Caki-1 (Prewett и соавт., 1998 год, Clin. Cancer Res. 4:2957-66; Shi and Siemann, 2002 год, Br. J. Cancer 87:119-26) и Caki-2 (Zellweger и соавт., 2001 год, Neoplasia 3:360-67). Неограничивающие примеры клеточных линий носоглоточной карциномы, экспрессирующих BCMA, включают C15 и C17 (Busson и соавт., 1988 год, Int. J. Cancer 42:599-606; Bernheim и соавт., 1993 год, Cancer Genet. Cytogenet. 66:11-5). Неограничивающие примеры клеточных линий глиомы человека, экспрессирующих BCMA, включают U373 (Palma и соавт., 2000 год, Br. J. Cancer 82:480-7) и U87MG (Johns и соавт., 2002 год, Int. J. Cancer 98:398-408). Эти линии опухолевых клеток могут быть внесены в иммунодефицитные грызуны хозяева в виде солидной опухоли подкожными инъекциями, либо в виде диссеминированных опухолей путем внутривенных инъекций. После внесения внутрь хозяина эти опухолевые модели могут применяться для оценки терапевтической эффективности антитела или производных к BCMA, как описано в данном документе, для модулирования роста опухоли in vivo.

VII. Применения в терапевтических целях.

Антитела против BCMA по изобретению могут использоваться для лечения злокачественных новообразования. Некоторые из таких видов злокачественных новообразований показывают обнаруживаемые уровни BCMA, измеренные как на уровне белка (например, путем иммуноанализа с применением одного из характерных антител), так и мРНК. Некоторые из таких злокачественных новообразований показывают повышенные уровни BCMA относительно незлокачественной ткани того же типа, предпочтительно у одного и того же пациента. Характерный уровень BCMA для злокачественных клеток, подходящих для лечения, составляет 5000-150000 молекул BCMA на клетку, хотя можно также проводить лечение более высокими или более низкими уровнями. Необязательно, уровень BCMA при злокачественном новообразовании измеряется перед проведением лечения.

Злокачественное новообразование, лечение которого антителами по изобретению является эффективным, включает солидные опухоли и гематологические виды опухолей, такие как лейкозы и лимфомы. Эти антитела особенно хорошо подходят для B-клеточных опухолей. Примеры злокачественных новообразований, для которых лечение антителами является эффективным: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) у взрослых и детей, хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острая лимфоцитарная лейкемия (ОЛЛ), хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ) и вторичный лейкоз; Неходжкинская лимфома (НХЛ) и болезнь Ходжкина; миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС) множественной миеломы, макроглобулинемия Вальденстрема или лимфома Беркитта, злокачественные новообразования плазматических клеток, BCMA+лимфома высокой степени злокачественности, болезнь Калера и миеломатоз; плазмоклеточный лейкоз; плазмоцитома; B-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лейкоз ворсистых клеток; фолликулярная лимфома (включая типы фолликулярной неходжкинской лимфомы); лимфома Беркитта (эндемическая лимфома Беркитта; спорадическая лимфома Беркитта): лимфома маргинальной зоны (лимфоидная ткань слизистых оболочек: MALT 1 MALToma; моноцитоидная B-клеточная лимфома; селезеночная лимфома с ворсинчатыми лейкоцитами); мантийноклеточная лимфома; крупноклеточная лимфома (диффузная крупноклеточная; диффузная смешанно-клеточная; иммунобластная лимфома; первичная медиастинальная B-клеточная лимфома; лимфангиома пульмональных B-клеток): мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ); B-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; миелоидная лейкемия (гранулоцитарная; миелогенная; острый миелоидный лейкоз; хронический миелоидный лейкоз; подострый миелоидный лейкоз; остеобластокластома; хлорома; гранулоцитарная саркома; острый промиелоцитарный лейкоз; острый миеломоноцитарный лейкоз); макроглобулинемия Вальденстрема или другой B-клеточный лейкоз или лимфома.

Антитела по изобретению также эффективны при иммунологических нарушений, опосредованных иммунными клетками, экспрессирующими BCMA, в частности, нарушениями, опосредованными B-клетками. Примеры таких заболеваний включают ревматоидный артрит, системную волчанку E (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина", иммуноопосредованную тромбоцитопению, гемолитическую анемию, буллезный пемфигоид, миастению гравис, болезнь Грейвса, болезнь Аддисона, эксфолиативную пузырчатку, псориаз, псориатический артрит и анкилозирующий спондилит.

Антитела против BCMA отдельно или в виде их конъюгатов лекарственных средств вводят в эффективном режиме, что означает дозировку, путь введения и частоту введения, которая задерживает начало, уменьшает тяжесть, ингибирует дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один показатель или симптомом злокачественных новообразований. Если пациент уже страдает злокачественным новообразованием, то режим может указываться как терапевтически эффективный режим. Если у пациента повышен риск злокачественного новообразования по сравнению с общей популяцией, но он еще не испытывает симптомов, режим может упоминаться в качестве профилактически эффективного режима. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента по сравнению с ретроспективным контролем или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом исследовании в популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией пациентов, не получавших лечение.

Характерные дозы для моноклонального антитела составляют от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, обычно от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг, или от 1 мг/кг до 10 мг/кг, или от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2 мг/кг до 20 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 12 мг/кг, или от 2 мг/кг до 10 мг/кг, или от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 12 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Характерные дозы для активных конъюгатов моноклональное антитело лекарственное средство, например, ауристатинов, составляют от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг или от 2 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг массы тела субъекта, или 0,1-20 или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-1500 или 200-1500 мг в виде фиксированной дозы. Характерные дозы для высокоактивных конъюгатов моноклональное антитело лекарственное средство, например, PBD, составляют от 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг или от 1,0 мкг/кг до 500,0 мкг/кг массы тела субъекта. В некоторых способах пациенту вводят антитело или ADC каждые две, три или четыре недели. Среди других факторов, дозировка зависит от частоты введения, состояния пациента и реакции на предшествующий курс лечения, если таковой имелся, является ли лечение профилактическим или терапевтическим и является ли заболевание острым или хроническим.

Введение может быть парентеральным, внутривенным, оральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, интратекальным, внутрибрюшинным, местным, интраназальным или внутримышечным. Введение также может быть осуществлено непосредственно в опухоль. Предпочтительным является введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение может осуществляться, например, путем инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин или однократной болюсной инъекции.

Частота введения зависит от периода полувыведения антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство в системный кровоток, состояния пациента и пути введения среди других факторов. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирования злокачественного новообразования, для которого лечение эффективно. Характерная частота внутривенного введения составляет два раза в неделю и ежеквартально в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможна более или менее частая дозировка. Другие характерные частоты для внутривенного введения находятся между одним разом в неделю или одним разом в месяц в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможна более или менее частая дозировка. Для подкожного введения характерная частота дозирования является от ежедневной до ежемесячной, хотя также возможна более или менее частая дозировка.

Количество вводимых доз зависит от природы злокачественного новообразования или аутоиммунного заболевания (например, будь то острые или хронические симптомы) и реакции нарушения на лечение. Для острых нарушений или острых приступов хронического нарушения обычно бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одна болюсная доза, необязательно в виде разделенной формы, является достаточной для острого нарушения или острого приступа хронического нарушения. Лечение может повторяться для рецидива острого нарушения или острого приступа. При хронических нарушениях антитело можно вводить через регулярные промежутки времени, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по крайней мере 1, 5 или 10 лет или в течение жизни пациента.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими и производятся в условиях GMP. Фармацевтические композиции

могут быть представлены в единичной лекарственной форме (т.е. в дозировке для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций, антитела могут быть получены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (с целью уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В альтернативном варианте, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разбавления с подходящим носителем, например, стерильной апирогенной водой, перед применением. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 01-10 мг/мл, например, 1,0 мг/мл.

Лечение антителами по изобретению можно сочетать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, другими способами лечения, эффективными против расстройства, которое лечится. Полезные классы других средств, которые могут быть введены с антителами к BCMA, включают, например, антитела против другим рецепторам, экспрессируемым на злокачественных клетках, антитубулиновые средства (например, ауристатины), белки, связывающиеся по малой бороздке ДНК (например, PBD), ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цис-платин, моно(платина), бис(платина) и триядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, ингибиторы обмена веществ, сенсибилизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, соединения предварительного формирования, пуриновые ингибиторы обмена веществ, пуромицины, радиосенсибилизаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и тому подобное. Те же дополнительные лечения, которые были упомянуты только для лечения злокачественных новообразований, также могут быть применены для иммуно-обусловленных нарушений. Дополнительные средства для иммуно-обусловленных нарушений включают иммунные супрессоры, такие как ингибиторы дегрануляции тучных клеток, антигистамины, кортикостероиды, НПВС (нестероидные противовоспалительные средства), азатиоприн, циклофосфамид, лейкеран и циклоспорин и биологические противовоспалительные средства, такие как Tysabri® или Humira®.

Лечение антителами к BCMA, необязательно в сочетании с любым из других средств или режимов, описанных выше отдельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может увеличить медианную выживаемость без прогрессирования заболевания или общее время выживания пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями, особенно в случае рецидивирующих или рефрактерных, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% или дольше по сравнению с аналогичным лечением (например, химиотерапией), но без антитела против BCMA. Кроме того, или в альтернативном варианте, лечение (например, стандартная химиотерапия), включающее антитело к BCMA, отдельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может увеличить процент пациентов с полным объективным ответом, процент пациентов с частичным объективным ответом или процент пациентов с объективным ответом (полный+частичный) пациентов с опухолями, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% по сравнению с аналогичным лечением (например, химиотерапией), но без антитела против BCMA.

Как правило, в клиническом исследовании (например, в фазе II, в фазе II/III или в фазе III) вышеупомянутое увеличивает медианную выживаемость без прогрессирования заболевания и/или уровень ответа пациентов, получавших стандартную терапию, плюс антитело к BCMA, по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих стандартную терапию отдельно (или плюс плацебо) и является статистически значимым, например, на уровне p=0,05 или 0,01 или даже 0,001. Процент пациентов с полным или частичным объективным ответом определяется объективными критериями, обычно применяемыми в клинических испытаниях для лечения злокачественного новообразования, например, перечисленными или принятыми Национальным институтом рака и/или Управлением по контролю продуктов питания и лекарственных средств.

VIII. Другие применения.

Антитела против BCMA, описанные в данном документе, могут применяться для выявления BCMA в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Экспрессия BCMA при злокачественном новообразовании указывает на то, что лечение злокачественного новообразования антителами по данному изобретению является эффективным. Антитела также могут быть проданы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований в области выявлении клеток, несущих BCMA, и их реакции на различные раздражители. В таких применениях моноклональные антитела могут быть помечены флуоресцентными молекулами, спин-мечеными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут быть представлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения анализа для BCMA. Антитела также могут быть применены для очистки белка BCMA, например, с помощью аффинной хроматографии.

Любая особенность, этап, элемент, вариант реализации изобретения или аспект изобретения могут

применяться в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Создание антител.

Получение рекомбинантного внеклеточного домена BCMA (ECD BCMA).

Внеклеточный домен (ECD) человека (аминокислоты 1-51) и мыши BCMA (аминокислоты 1-46) клонировали и экспрессировали в виде слитого белка GST (pGEX4Tl, Amersham Biosciences). Очищенный ECD BCMA был получен путем захвата слитого белка BCMA глутатион-сефарозой и высвобождения ECD BCMA путем расщепления протеазой с тромбином. Затем тромбин удаляли бензамидиновой сефарозой.

Идентификация экспрессии BCMA на линиях злокачественных B-клеток.

Количественную проточную цитометрию проводили на клеточных линиях множественной миеломы с применением Vicky-1, коммерческого антитела против BCMA (Alexis Biotechnology). Результаты показали, что BCMA распространена среди тестируемых линий миеломы. NCI H929 показала положительное окрашивание поверхности клеток для BCMA, но не имела экспрессии как BR3, так и TACI. Поскольку NCI H929 экспрессировала BCMA, но не BR3 или TACI, она применялась для скрининга гибридных форм BCMA на основе клеток.

Разработка трансфицированной BCMA клеточной линии.

Стабильные клеточные линии были созданы путем трансфекции клеток HEK293 либо полноразмерным клоном BCMA, либо пустым вектором. Проточная цитометрия подтвердила положительную экспрессию BCMA на поверхности BCMA-трансфицированного (293: BCMA), но не контрольной плазмиды пустого вектора (293: вектор). Эти клеточные линии впоследствии применяли в качестве инструмента для подтверждения специфичности клонированных BCMA антител.

Пример 2. Иммунизация и скрининг лунок неклонированной гибридомы.

Иммунизация и скрининг антисыворотки.

В нашей стратегии иммунизации применялись аминокислоты 1-50 из ECD BCMA, так что эпитопы, внутренние и внешние по отношению к лиганд-связывающему домену, могли служить целью для антител (фиг. 1A и 1B). KLH-конъюгированный ECD BCMA был получен из коммерческого источника (Alexis Biochemicals). Крыс иммунизировали KLH-конъюгированным BCMA с применением адъюванта Titermax до тех пор, пока иммунный ответ не выявлялся с помощью ИФА. Сыворотку иммунизированных крыс также проверяли на способность блокировать связывание APRIL в анализе на основе планшетов. Крыса 2-3 была выбрана для слияния, потому что антисыворотка имела значительный титр антител BCMA человека и проявляла сильную блокирующую активность.

Клетки селезенки крысы 2-3 собирали, сливали с X-63. Клетки Ag8.653.3.12.11 миеломы мыши выбирали, как описано (Goding, 1989 год). Супернатанты культуры из полученных гибридом скринировали с помощью ИФА с применением очищенного чBCMA-GST (см. блок-схему на фиг. 2). Восемьдесят положительных лунок были идентифицированы и отобраны для расширения. Шестьдесят из восьми положительных лунок продолжали демонстрировать ОП > 0,5 с помощью ИФА после расширения. Эти шестьдесят лунок неклонированной гибридомы затем подвергали скринингу во вторичных анализах на связывание на основе клеток, активность блокады лигандов и перекрестную специфичность с BCMA мыши. Это привело к идентификации двенадцати ведущих лунок гибридомы BCMA. Данные связывания клеток и активность блокады лигандов из этих двенадцати ведущих лунок суммированы на фиг. 3. Лунка гибридомы 17 показала активность связывания клеток и блокады лигандов, которые заменяют коммерческий моноклональный Vicky-1 (Alexis Biochemicals). Восемь лунок (обозначенных красной звездочкой на фиг. 3) были перенесены для клонирования на основе их способности связывать BCMA-позитивные клетки или блокировать связывания лиганда.

Пример 3. Характеристика клональных гибридом. Связывание клеток и активность блокады лигандов. Лунки гибридомы 11, 17, 20, 29, 40, 45 и 70 были взяты через 2 раунда клонирования, ограниченного разбавлением. С этого момента антитела будут обозначаться формальным идентификатором клона, приведенным в табл. 1. Специфическое связывание антител с клетками 293: BCMA, но не с контрольными клетками 293: вектор, подтверждает, что антитела связываются с BCMA.

Таблица 1

Формальные идентификаторы клонов

Обозначение неклонированного	Идентификатор клонированного
11	SG16.11
17	SG16.17
20	SG16.20
29	SG16.29
40	SG16.40
45	SG16.45
70	SG16.70

Активность блокады лигандов новых антител BCMA сравнивали, используя супернатант из неклонированной основной лунки, супернатант из клонированной лунки и очищенное антитело из клонированной лунки (фиг. 4). В качестве положительного контроля использовали коммерческое антитело. SG-16.17 дало значительное блокирование связывания APRIL с применением супернатанта культуры из лунки с клонированной гибридомы. Титрование SG16.17-блокады связывания APRIL проводили в отдельном эксперименте с применением очищенного SG16.17 и коммерческого антитела (фиг. 5). Очищенное SG16.17 показало улучшенную блокирующую активность в аналогичных концентрациях по сравнению с коммерческим антителом. SG-16.45 показало дозозависимое ингибирование связывания April, хотя и не столь сильно, как SG-16.17. Активность блокады лигандов для остальных антител BCMA (SG-16.11, SG16.20, SG16.29, SG16.40 и SG16.70) была меньшей. Определенные блокирующие антитела BCMA показали >75% ингибирования связывания APRIL, как это наблюдалось с SG-16.17. Более "умеренные" блокирующие антитела, включая SG-16.11, SG-16.20, SG-16.29, SG-16.40 и SG-16.70, показали около 30% ингибирования APRIL (фиг. 4).

Способность BAFF связывать иммобилизованный BCMA также анализировали в присутствии и отсутствии очищенных антител BCMA. Предварительная обработка антителами BCMA SG16.17, SG16.40, SG16.20 и SG17.7 0 приводила к титруемому ингибированию связывания BAFF с BCMA (фиг. 6). Относительное ингибирование определяли связыванием BAFF с иммобилизованным BCMA в отсутствие обработки антителом (фиг. 6, отмечено звездочкой). Взятые вместе данные на фиг. 5 и 6 изображают, что антитела BCMA могут блокировать связывание лиганда APRIL и BAFF с BCMA и тем самым взаимодействовать с сигналами выживаемости B-клеток.

Пример 4. Испытание антител SG16.17 и SG16.45 на ADCC и цитотоксичность в качестве ADC.

Антитело SG16.17 превращали в химерный (крыса-человек) IgG путем слияния крысиных доменов V_H и V_L с константными доменами тяжелой и легкой цепи IgG1 дикого типа человека, соответственно. Химеризованное антитело, обозначенное CSG16.17 дикого типа, показало подобные антигенсвязывающие свойства по сравнению с исходным антителом SG16.17. Затем авторы установили мутации Fc, S239D:A330L:I332E, которые как известно усиливают ADCC, для производства мутанта CSG16.17. Подобно CSG16.17 дикого типа, производство тройного мутанта Fc не изменяло антигенсвязывающие свойства мутанта CSG16.17. Оценка CSG16.17 дикого типа и мутанта CSG16.17 в анализе ADCC с очищенными естественными клетками-киллерами приводила к дозо-зависимому лизису клеток JJN3 и U266, тогда как не наблюдалось существенного лизиса с несвязывающим контролем IgG человека. Антитело дикого типа CSG16.17 проявляло ограниченную активность ADCC на клетках JJN3, которая была увеличена в ~ 100 раз по активности и в >2 раза по эффективности (максимальный лизис) мутантом CSG16.17. Аналогичным образом, для клеток U266 активность ADCC мутанта CSG16.17 была увеличена в 100 раз по эффективности и в 2 раза по эффективности по сравнению с исходным химерным антителом. Концентрация мутанта CSG16.17, необходимая для максимального лизиса как клеток JJN3 так и U266, составляла ~ 100 пмоль/л. В противоположность этому, константу диссоциации (K_D) CSG16.17 на клетках JJN3 и U266 оценивали как 15 и 10 нмоль/л, соответственно. Таким образом, максимальный лизис мутантом CSG16.17 был достигнут при концентрациях, значительно меньших, чем требуется для достижения насыщения связывания.

Авторы оценили способность SG16.17 и SG16.45 индуцировать цитотоксичность в качестве ADC с применением vcMMAF с стехиометрией восьми лекарственных средств на антитело. SG16.17 или SG16.45-vcMMAF8 было сильно цитотоксично по отношению к клеткам H929. С применением неперехватывающего АЦП или неконъюгированных антител снижение жизнеспособности клеток не наблюдалось. Авторы также исследовали эффективность ADC SG16.17 среди других линий клеток MM, включая клеточные линии JJN3 и U266. SG16.17-vcMMAF8 показало стабильную и высокую эффективность (значения $IC_{50} \leq 130$ пмоль/л) среди всех троих клеточных линий MM, тогда как SG16.45-vcMMAF8 показало

большую изменчивость и меньшую общую эффективность.

Пример 5. Исследование антитела SG16.17 на связывание с FcγRIIIa и передачу сигналов через FcγRIIIa.

Для анализа связывания, CHO клетки трансфецировали FcγRIIIa (hCD16) и связывание меченного антитела h00 измеряли при конкуренции с химерным SG16.17 за связывание с IgG1 дикого типа и IgG1 с генотипом S239D, A330L, I332E, а также с различными контрольными антителами IgG1. На фиг. 12 показано, что химерный SG16.17 конкурировал сильнее, чем два контрольных антитела, ритуксимаб и cOKT9. Мутантная форма SG16.17 конкурировала сильнее, чем форма IgG1 дикого типа. В анализе передачи сигнала использовали целевые клетки U266, экспрессирующие BCMA, эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие FcγRIIIa, и сконструированные для экспрессии репортентного белка люциферазы из элемента ответа NFAT и индикатора Bio-Glo. Все CSG16.17 G1 WT & S239D, A330L, I332E индуцировали сингальный путь FcγRIIIa, причем форма S239D, A330L, I332E была сильнее (фиг. 13).

Пример 6. Гуманизация SG16.17.

Таблица 2

Гуманизированные мутации в вариантах тяжелой цепи hSG16.17

Вариант vH	Акцепторная последовательность экзона HV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvH1	HV1-2/HJ3	H8, H20, H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	нет
hvH2	HV1-2/HJ3	H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH3	HV1-2/HJ3	H20, H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH4	HV1-2/HJ3	H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH5	HV1-46/HJ3	H48, H67, H71, H73, H76, H78, H80, H91, H93	нет
hvH6	HV1-46/HJ3	H8, H20, H48, H71, H73, H76, H78, H80, H91, H93	нет

Таблица 3

Гуманизированные мутации в вариантах легкой цепи каппа hSG16.17

Вариант vK	Акцепторная последовательность экзона KV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hVK2	KV1-12/KJ5	L46, L48, L87	L53
hVK3	KV1-12/KJ5	L46, L48, L87	L24, L53
hVK4	KV1-12/KJ5	L46, L48, L78, L85, L87	нет
hVK5	KV1-12/KJ5	L40, L46, L48, L87	L24, L53

Таблица 4

Специфические мутации каркаса в вариантах тяжелой цепи hSG16.17

Вариант	H8	H20	H48	H67	H69	H71	H73	H76	H78	H80	H88	H91	H93	% человеческие
hvH1	R*	L*	I*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	79,6
hvH2		L*	*	V	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	88,8
hvH3		L*	*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	86,7
hvH4		V	*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	88,8
hvH5		V	*	A*	M	A*	K*	N*	A*	V*	A	F*	T*	78,6
hvH6	*	L*	I*	V	M	A*	K*	N*	A*	V*	A	F*	T*	85,7

*Крысиные остатки

Таблица 5

Специфические мутации каркаса в вариантах легкой цепи каппа hSG16.17

Вариант	L40	L46	L48	L78	L85	L87	% человеческие
hvK2	P	V*	V*	L	T	F*	86,3
hvK3	P	V*	V*	L	T	F*	87,4
hvK4	P	V*	V*	M*	D*	F*	83,2
hvK5	S*	V*	V*	L	T	F*	86,3

*Крысиные остатки

Были секвенированы вариабельные области тяжелой и легкой цепи крысы гибридомы крысы, экспрессирующей SG16.17. HV1-2/HJ3 (SEQ ID NO: 9) или HV1-46/HJ3 (SEQ ID NO: 10) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для тяжелой цепи, а KV1-12/KJ5 (SEQ ID NO: 18) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для легкой цепи.

Положения, отличающиеся между донорами крысы и акцепторными последовательностями человека, включают H8, H20, H48, H67, H69, H71, H76, H78, H80, H88, H91, H93, L40, L46, L48, L78, L85 и L87. Различные пермутации этих остатков были включены как обратные мутации в разные последовательности гуманизированной тяжелой цепи и легкой цепи. Несколько остатков крыс в CDR по Кабат также испытывали на замещение соответствующими остатками акцепторных последовательностей человека. Положениями этих остатков были H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64 и H65, и L24 и L53. Были разработаны и экспрессированы шесть вариантов гуманизированной тяжелой цепи и четыре варианта гуманизированной легкой цепи. В табл. 2 и 3 показана акцепторная последовательность человека, обратные мутации (остатки донорного каркаса) и замещения CDR (акцепторные остатки CDR) в каждом гуманизированном варианте цепи. В табл. 4 и 5 указаны аминокислоты, занимающие каждое из положений, которые рассматриваются для обратной мутации в каждом из гуманизированных вариантом цепи. В этих таблицах также указывается процент остатков, идентичных последовательности ближайших человеческих зародышевых линий. Согласно недавней нормы INN, только антитела с по меньшей мере на 85% идентичные последовательности зародышевой линии человека как в тяжелых, так и в легких цепях можно считать гуманизированными. На фиг. 7-9 изображены выравнивания вариабельных областей гуманизированной тяжелой цепи с вариабельной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. На фиг. 10 и 11 изображено выравнивание вариабельных областей гуманизированной легкой цепи с вариабельной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. С-концевой аргинин (R) вариабельных легких цепей в альтернативном варианте можно рассматривать как N-концевой аргинин константной области легкой цепи.

Шесть гуманизированных тяжелых цепей и четыре гуманизированные легкие цепи были испытаны во всех 24 возможных пермутациях на связывание с BCMA, экспрессируемым на клетках NCI-H929, которые экспрессируют около 50 000 молекул BCMA на клетку. Результаты приведены в табл. 6 ниже. Коротко, все гуманизированные легкие цепи показали хорошее связывание. Из гуманизированных тяжелых цепей варианты VH1, VH3 и VH5 показали улучшенное связывание по сравнению с химерным или крысиным антителом SG16.17.

Таблица 6

Связывание гуманизированных антител hSG16.17 с BCMA, экспрессируемым на клетках NCI-H929

hSG16.17	vH	vK	Анализ 3-pt NCI-H929
1	vH1	vK2	++++
2	vH1	vK3	++++
3	vH1	vK4	++++
4	vH1	vK5	++++
5	vH2	vK2	-
6	vH2	vK3	-
7	vH2	vK4	-
8	vH2	vK5	-
9	vH3	vK2	++++
10	vH3	vK3	++++
11	vH3	vK4	++++
12	vH3	vK5	++++
13	vH4	vK2	-
14	vH4	vK3	-
15	vH4	vK4	-
16	vH4	vK5	-
17	vH5	vK2	++++
18	vH5	vK3	++++
19	vH5	vK4	++++
20	vH5	vK5	++++
21	vH6	vK2	++
22	vH6	vK3	++
23	vH6	vK4	++
24	vH6	vK5	++
cSG16.17			+++
rSG16.17			+++

Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие результаты в анализе NCI-H929 (т.е. те, которые содержат тяжелые цепи VH1, VH3 или VH5), дополнительно испытывали на связывание с клетками U266 во всем диапазоне концентраций. В этом анализе гуманизированные антитела, содержащие тяжелые цепи VH1 (независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен), показали улучшенное связывание относительно крысиного или химерного SG16.17. Гуманизированные антитела, содержащие тяжелые цепи VH3 или VH5 (независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен), показали такое же связывание в пределах экспериментальной ошибки, что и связывание крысиного или химерного SG16.17. Гуманизированные антитела, содержащие вариабельные области VH2 или VH6, показали снижение связывания относительно крысиного или химерного

SG16.17 независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен.

Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие результаты в анализе NCI-H929, также сравнивали на уровень экспрессии белка, уровень мономера и процентную идентичность последовательности с зародышевой линией человека, как показано в табл. 7 ниже.

Таблица 7

hSG 16. 17	vH	vK	Связывание чBCMA	Преходящий титр (мг/л)	aSEC (% мономера)	≥ 85% человеческие (vH, vK) и обозначение INN			Выбор ведущих
1	vH1	vK2	++++	139	90,4	79,6	86,3	Смешанный	Y
2	vH1	vK3	++++	126	89,6	79,6	87,4	Смешанный	Y
3	vH1	vK4	++++	80	94,6	79,6	83,2	Химерное	N
4	vH1	vK5	++++	119	89,5	79,6	86,3	Смешанный	N
9	vH3	vK2	++++	129	94,1	86,7	86,3	Гуманизированное	Y
10	vH3	vK3	++++	116	94,1	86,7	87,4	Гуманизированное	Y
11	vH3	vK4	++++	82	95,2	86,7	83,2	Смешанный	Y
12	vH3	vK5	++++	117	93,5	86,7	86,3	Гуманизированное	Y
17	vH5	vK2	++++	97	96,2	78,6	86,3	Смешанный	Y
18	vH5	vK3	++++	86	96,1	78,6	87,4	Смешанный	Y
19	vH5	vK4	++++	65	96,5	78,6	83,2	Химерное	N
20	vH5	vK5	++++	73	95,0	78,6	86,3	Смешанный	Y

Гуманизированное антитело VH3 VK2 было выбрано в качестве ведущего гуманизированного антитела на основе наличия у него такой же аффинности связывания с BCMA человека, что и у антител SG16.17 крысы и мыши (в пределах экспериментальной ошибки); более 85% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека в вариабельных областях как тяжелой, так и легкой цепи, хорошей экспрессия и высокого процента мономеров.

Пример 7. Гуманизация SG16.45.

Таблица 8

Гуманизированные мутации в вариантах тяжелой цепи hSG16.45

Вариант vH	Акцепторная последовательность экзона HV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvH1	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H93, H94, H107	нет
hvH2	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H93, H94, H107	H50, H60
hvH3	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H76, H93, H94, H107	H50, H60
hvH4	HV3-23/HJ3	H30, H48, H76, H93, H94	H50
hvH5	HV3-74/HJ3	H30, H93, H94	H50
hvH6	HV3-9/HJ3	H30, H93, H94	H50, H60

Таблица 9

Гуманизированные мутации в вариантах легкой цепи каппа hSG16.45

Вариант vK	Акцепторная последовательность экзона KV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvK1	KV3-20/KJ2	L14, L19, L21. L38, L58, L71, L78	L24, L26
hvK2	KV3-20/KJ2	нет	L24, L26
hvK3	KV3-20/KJ2	L21, L38, L58, L71	L24, L26
hvK5	KV3-20/KJ2	L38, L71	нет

Таблица 10

Специфические мутации каркаса в вариантах тяжелой цепи hSG16.45

Вариант	H30	H37	H48	H76	H93	H94	H107	% человеческие
hvH1	N*	I*	I*	N	T*	S*	V*	86,5
hvH2	N*	I*	I*	N	T*	S*	V*	88,5
hvH3	N*	I*	I*	S*	T*	S*	V*	87,5
hvH4	N*	V	I*	S*	T*	S*	T	87,5
hvH5	N*	V	V	N	T*	S*	T	88,5
hvH6	N*	V	V	N	T*	S*	T	88,5

*Крысиные остатки

Таблица 11

Специфические мутации каркаса в вариантах легкой цепи каппа hSG16.45

Вариант	L14	L19	L21	L38	L58	L71	L78	% человеческие
hvK1	A*	V*	I*	H*	V*	Y*	M*	79,2
hvK2	L	A	L	Q	I	F	L	86,5
hvK3	L	A	I*	H*	V*	Y*	L	82,3
hvK5	L	A	L	H*	I	Y*	L	82,3

*Крысиные остатки

Были секвенированы вариабельные области тяжелой и легкой цепи крысы гибридомы крысы, экспрессирующей SG16.45. HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO: 24) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для тяжелой цепи, а KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO: 34) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для легкой цепи.

Каркасные положения вариабельной области, отличающиеся от крысиных донорных и человеческих акцепторных последовательностей, включают H30, H37, H48, H67, H93, H94 и H107 и положения L14, L19, L21, L38, L58, L71 и L78. Различные пермутации этих остатков были включены как обратные мутации в разные последовательности гуманизированной тяжелой цепи и легкой цепи. Несколько остатков крыс в CDR по Кабат также испытывали на замещение соответствующими остатками акцепторных последовательностей человека. Положениями этих остатков были H50, H60, L24 и L26. Были разработаны и экспрессированы шесть вариантов гуманизированной тяжелой цепи и четыре варианта гуманизированной легкой цепи. В табл. 8 и 9 показана акцепторная последовательность человека, обратные мутации (остатки донорного каркаса) и замещения CDR (акцепторные остатки CDR) в каждом гуманизированном варианте цепи. В табл. 10 и 11 указаны аминокислоты, занимающие каждое из положений, которые рассматриваются для обратной мутации в каждом из гуманизированных вариантом цепи. В этих таблицах также указывается процент остатков, идентичных последовательности ближайших человеческих зародышевых линий. Согласно недавней нормы INN, только антитела с по меньшей мере на 85% идентичные последовательности зародышевой линии человека как в тяжелых, так и в легких цепях можно считать гуманизированными. На фиг. 14-17 изображено выравнивание вариабельных областей гуманизированной тяжелой цепи с вариабельной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. На фиг. 18 и 19 изображены выравнивания вариабельных областей легкой цепи. С-концевой аргинин (R) вариабельных легких цепей в альтернативном варианте можно рассматривать как N-концевой аргинин константной области легкой цепи.

Шесть гуманизированных тяжелых цепей и четыре гуманизированные легкие цепи были испытаны во всех 24 возможных пермутациях на связывание с BCMA, экспрессируемым на клетках NCI-H929, которые экспрессируют около 50000 молекул BCMA на клетку. Результаты приведены в табл. 12 ниже.

Таблица 12

Связывание гуманизированных антител hSG16.45 с BCMA, экспрессируемым на клетках NCI-H929

hSG16.45	vH	vK	Анализ 3-pt NCI-H929
1	vH1	vK1	+++
2	vH1	vK2	+++
3	vH1	vK3	+++
4	vH1	vK5	+++
5	vH2	vK1	-
6	vH2	vK2	-
7	vH2	vK3	-
8	vH2	vK5	-
9	vH3	vK1	-
10	vH3	vK2	-
11	vH3	vK3	-
12	vH3	vK5	++
13	vH4	vK1	+
14	vH4	vK2	+
15	vH4	vK3	+
16	vH4	vK5	++
17	vH5	vK1	++
18	vH5	vK2	++
19	vH5	vK3	++
20	vH5	vK5	++
21	vH6	vK1	+
22	vH6	vK2	+
23	vH6	vK3	+
24	vH6	vK5	++
cSG16.45			+++
rSG16.45			+++

Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие результаты в анализе NCI-H929, дополнительно тестировали на связывание с клетками U266 в полном диапазоне точек концентрации, а также на экспрессию и содержание мономера, а также на идентичность последовательности с зародышевой линией человека (табл. 13).

Таблица 13

hSG16.45	VH	VK	чBCMA	IgG мг	aSEC %	VH %	VK %	INN
1	VH1	VK1	+++	0,67	94,5	86,5	79,2	Смешанный
3	VH1	VK3	+++	0,54	94,6	86,5	82,3	Смешанный
4	VH1	VK5	+++	0,16	76,0	86,5	82,3	Смешанный
17	VH5	VK1	++	0,64	94,4	88,5	79,2	Смешанный
18	VH5	VK2	++	0,65	93,7	88,5	86,5	Чел
19	VH5	VK3	++	0,64	94,1	88,5	82,3	Смешанный

VH5 VK2, VH1 VK1 и VH1 VK3 были лучшими антителами в целом на основе аффинности связывания для человека, идентичности последовательности с последовательностью зародышевой линии человека в вариабельных областях как тяжелой, так и легкой цепи, хорошей экспрессии и высокого процента мономеров, VH1 VK1 и VH1 VK3 имели несколько более высокое связывание (такое же, как крысиное или химерное в пределах экспериментальной ошибки), но более низкую идентичность последовательности с зародышевой линией человека.

Пример 8. Синтез восстановленного фукозилированного антитела hSG16.17 или hSG16.45.

Антитело hSG16.17 VH3 VK2 или hSG16.45 VH5 VK2 экспрессировали в клетках CHO. Ингибитор фукозилирования, 2-фторфукоза, был включен в среды для выращивания культур клеток во время продуцирования антител, что приводило к получению нефукозилированного антитела. См., например, Okeley и соавт., Proc. Nat'l Acad. Sci. 110:5404-55409 (2013 год). Основная среда для роста клеток, свободная от фукозы и 2-фторфукозы, была добавлена в среду с целью ингибирования фукозилирования белка. Ibid. Встраивание фукозы в антитела измеряли с помощью ЖК-МС через хроматографию PLRP-S и квадрупольную время-пролетную масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией (TOF MS). Ibid.

Пример 9. Активность in vivo hSG16.17-SEA у мышей SCID или NSG.

На фиг. 20A-C изображена активность in vivo мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID. Животным в/в имплантировали клетки MM1S, а введение антител начинали через 9 дней после имплантации. За выживанием животных следили в течении времени. N=8 животных на группу. Копия BCMA #=7000, копия CD38 #=14000. A) 1 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель B) 3 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель и C) 10 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель. Животные SCID содержат эффекторные клетки для опосредования ADCC и ADCP. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA улучшает выживаемость, по сравнению с даратумумабом (целевое Ат CD38). Несвязывающий контроль h00 не показал активности.

На фиг. 21A-C изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG. Животные NSG не содержат клеток NK и минимально активных макрофагов. Животным в/в имплантировали клетки EJM, а однократную дозу антитела вводили внутрибрюшинно через 5 дней после имплантации. За выживанием животных следили в течении времени. N=8 животных на группу. Копия BCMA #=45000. Копия CD38 #=47000. Копия CS1 #=14000. A) доза 1 мг/кг B) 3 мг/кг доза C) доза 10 мг/кг. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA увеличивает выживаемость в равной или большей степени, чем даратумумаб (целевое Ат CD38) и элотузумаб (целевое Ат CS1). SG16.17 ДТ также может вызывать увеличение выживаемости. Несвязывающий контроль h00 не показал активности при максимальной дозе. Поскольку у этих животных присутствовали минимальные эффекторные клетки, активность антител hSG16.17 SEA и ДТ, вероятно, связана с блокировкой сигналов пролиферации APRIL и BAFF.

На фиг. 22 изображена in vivo активность мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после имплантации, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируются внутрибрюшинно еженедельно в общем количестве 5 доз. N=5 животных на группу. Копия BCMA #=25000. Копия CD38 #=45000. Копия CS1 #=3000. Среднее значение люминесценции составлено с течением времени по сравнению с необработанными и здоровыми животными. hSG16.17 SEA проявляло гораздо лучшую активность по сравнению с дарутумумабом (целевое Ат CD38) и элотузумабом (целевое Ат CS1). Повышенная люминесценция, наблюдаемая в группе hSG16.17-SEA 10 мг/кг, наблюдалась у одного животного.

На фиг. 23A и 23B изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после инъекции, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. A) 3 мг/кг антител ДТ против SEA. B) Диапазон дозы hSG16.17 SEA. Данные на этом рисунке

показывают, что hSG16.17 SEA может быть активным при однократной дозе 0,3 мг/кг, а hSG16.17SEA может быть более активным, чем его (фукозилированный) аналог ДТ.

На фиг. 23A и 23B изображена активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после инъекции, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. A) 3 мг/кг антител ДТ против SEA. B) Диапазон дозы hSG16.17 SEA. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA может быть активным при однократной дозе 0,3 мг/кг, а hSG16.17SEA может быть более активным, чем его (фукозилированный) аналог ДТ. Воздействие на люминесценцию приводит к длительной выживаемости животных (данные не показаны).

На фиг. 24. Активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID. Животным SCID в/в имплантировали клетки MOLP-8 люцифераза. Введение антител начинали через 13 дней после инъекции, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. Копия BCMA #=2000. Динамика люминесценции изображена с течением времени. Эти данные показывают, что даже при наличии только 2000 копий BCMA hSG16.17-SEA демонстрирует значительную противоопухолевую активность. Дегликозилированное антитело SEA BCMA, которое не связывает FcγRII или FcγRIII, не проявляет активности, сходной с несвязывающим контролем h00 SEA. Это свидетельствует о важности Fc-опосредованной активности в этой модели.

На фиг. 25. Антитело SG16.17 SEA демонстрирует улучшенную активность ADCC на целевых клетках MM1R по сравнению с антителом ДТ in vitro. Клетки NK были выделены из МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови) с помощью негативного отбора с применением набора для обогащения NK EasySep Human, и полученные клетки CD16+ были количественно определены. Целевые клетки ADCC MM1R множественной миеломы были помечены хромом-51 в течение 1-го часа. В аналитический планшет добавляли серию разбавлений антител, а затем целевые клетки (T) и эффекторные клетки NK (E) в соотношении 13:1 E:T. Лизис рассчитывали на основе общего контроля и контроля спонтанного высвобождения через 4 ч при 37°C. Эти данные показывают значительное улучшение активности ADCC афукозилированного антитела SEA SG16.17 по сравнению с антителом ДТ, а также клиническими антителами, даратумумаб и элотузумаб.

Несмотря на то, что изобретение было подробно описано для ясности понимания, некоторые модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, включая номера доступа, веб-сайты и тому подобное, а также патентные документы, приведенные в данной заявке, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждый из них был обозначен отдельно. В случае разных версий последовательностей, в документе может находится ссылка на веб-сайт или другая ссылка, но считается корректной версия со ссылкой на действительную дату подачи. Действительная дата подачи означает самую раннюю дату приоритета, в которой раскрывается номер доступа. Если иное не очевидно из контекста, любой элемент, вариант осуществления, стадия, признак или аспект изобретения могут быть осуществлены в сочетании с любым другим.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его связывающий фрагмент, которые связываются с BCMA человека, содержащие зрелую вариабельную область тяжелой цепи и зрелую вариабельную область легкой цепи,

где зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO: 13) и

где зрелая вариабельная область легкой цепи содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO: 19),

при условии, что положение H58 может быть занято N или K,

положение H60 может быть занято A или N,

положение H61 может быть занято Q или E,

положение H62 может быть занято K или N,

положение H64 может быть занято Q или K,

положение H65 может быть занято G или T,

положение L24 может быть занято R или L и

положение L53 может быть занято S или R.

2. Антитело или его связывающий фрагмент по п.1, содержащие

три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO: 13) и

три CDR по Кабат (SEQ ID NO: 90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO: 19).

3. Антитело или его связывающий фрагмент по п.1 или 2, где

положения H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T соответственно, и

положения L46, L48 и L87 заняты V, V и F соответственно.

4. Антитело или его связывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где

зрелая вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO: 13) и

зрелая вариабельная область легкой цепи содержит последовательность VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO: 19).

5. Антитело или его связывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где

зрелая вариабельная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи и

зрелая вариабельная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

6. Антитело или его связывающий фрагмент по п.5, где константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека с ослабленным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью человека.

7. Антитело или его связывающий фрагмент по п.5 или 6, где константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

8. Антитело или его связывающий фрагмент по п.5, где

константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5, и

константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3.

9. Антитело или его связывающий фрагмент по п.5, где

константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7 (S239C), и

константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3.

10. Антитело или его связывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой "голое" антитело.

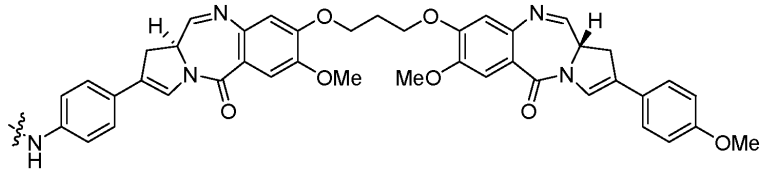
11. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-9, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим средством.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.11, где антитело или связывающий фрагмент конъюгирован с цитотоксическим средством.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.12, где цитотоксический агент конъюгирован с антителом или его связывающим фрагментом через линкер, расщепляемый ферментом.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.12 или 13, где цитотоксическое средство представляет собой средство, связывающееся в малой борозде ДНК.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по по п.14, где цитотоксическое средство имеет формулу



16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.12 или 13, где цитотоксический агент представляет собой MMAE или MMAF.

17. Антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-16 со сниженным уровнем корового фукозилирования.

18. Антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-16, которые не фукозилированы.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-10, 17, или 18 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, где фармацевтическая композиция содержит множество антител, или их связывающих фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство и где менее примерно 10% антител, или их связывающих фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство фукозилированы фукозой или аналогом фукозы.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, где менее примерно 5% антител, или их связывающих фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство фукозилированы фукозой или аналогом фукозы.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, где примерно 2% антител, или их связывающих фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство фукозилированы фукозой или аналогом фукозы.

23. Антитело, или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-10, или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-16, где антитело, или его связывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой множество антител, или их связывающих

фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство, так что менее 5% связанных с N-гликозидом сахарных цепей по остатку Asn в положении 297 согласно нумерации ЕС константной области тяжелой цепи антител, или их связывающих фрагментов, или конъюгатов антитело-лекарственное средство включают фукозу.

24. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область зрелой тяжелой цепи и вариабельную область зрелой легкой цепи антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10.

25. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.24.

26. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область зрелой тяжелой цепи антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10.

27. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область зрелой легкой цепи антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10.

28. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием или злокачественным новообразованием с экспрессией BCMA, включающий

введение пациенту антитела или его связывающего фрагмента по любому из пп.1-10, 17, 18 и 23, или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-18 и 23, или фармацевтической композиции по любому из пп.19-22.

29. Способ по п.28, где злокачественным новообразованием является гематологическая злокачественная опухоль.

30. Способ по п.29, где гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелому, лейкоз и лимфому.

31. Способ по п.28, где гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

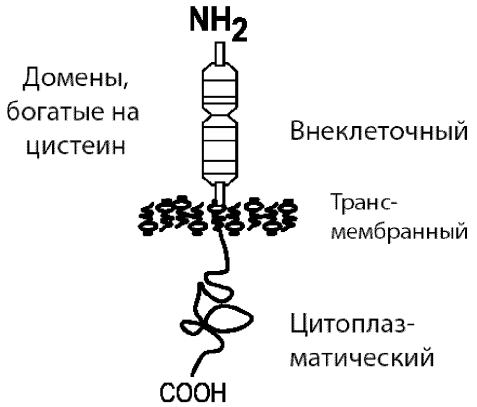
32. Способ по п.28, где гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ) или лимфому Ходжкина.

33. Способ по п.28, где гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС), макроглобулинемию Вальденстрема или лимфому Беркитта.

34. Способ лечения пациента, страдающего иммунным заболеванием или с риском развития иммунного заболевания, опосредованного иммунными клетками, экспрессирующими BCMA, включающий введение пациенту антитела или связывающего фрагмента по любому из пп.1-10, 17, 18 и 23, или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.11-18 и 23, или фармацевтической композиции по любому из пп.19-22 по любому из предыдущих пунктов по эффективной схеме лечения.

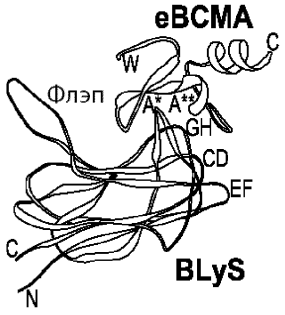
35. Способ по п.34, где иммунное заболевание представляет собой опосредуемое В-клетками нарушение.

36. Способ по п.34, где иммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, системную волчанку Е (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина".



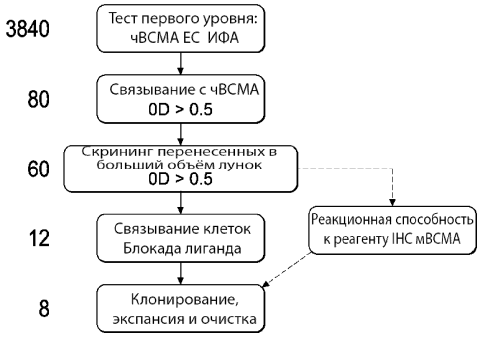
Jelinek и Darce (2005) *Curr Dir Autoimmun.* Basel, Karger 8: 266-288

Фиг. 1А

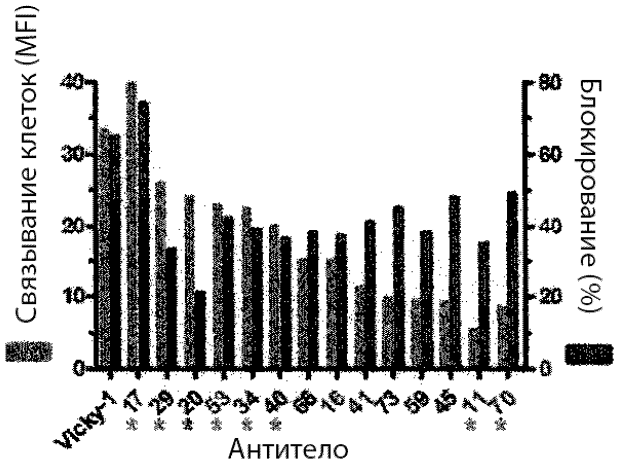


Wallweber (2004) *J Mol Biol* 343: 283-290

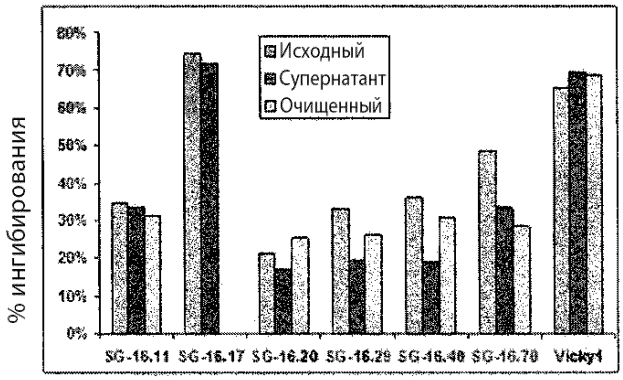
Фиг. 1В



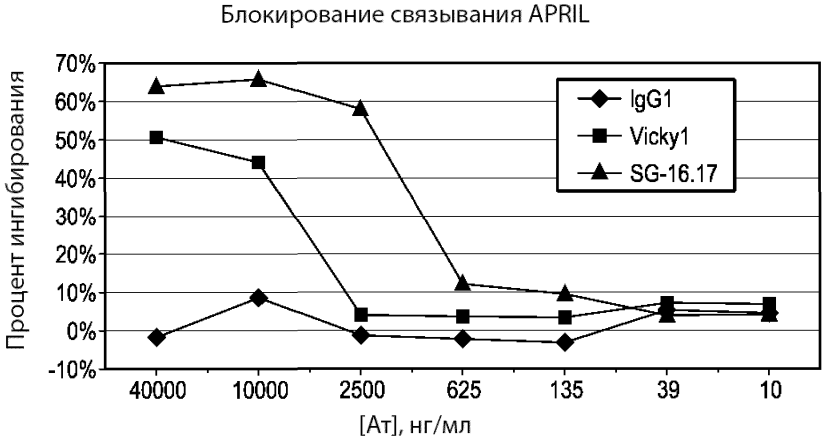
Фиг. 2



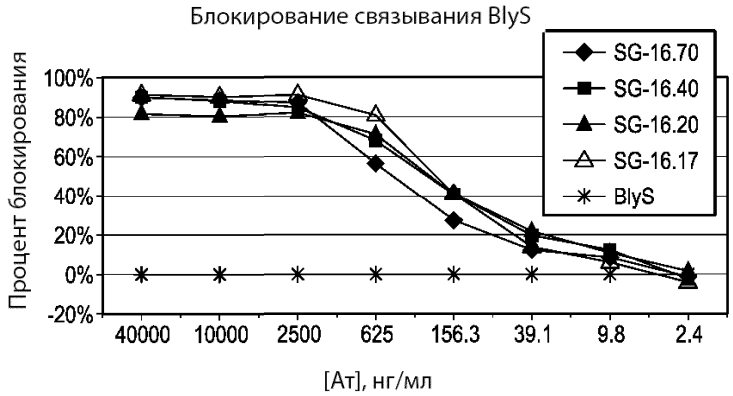
Фиг. 3



Фиг. 4

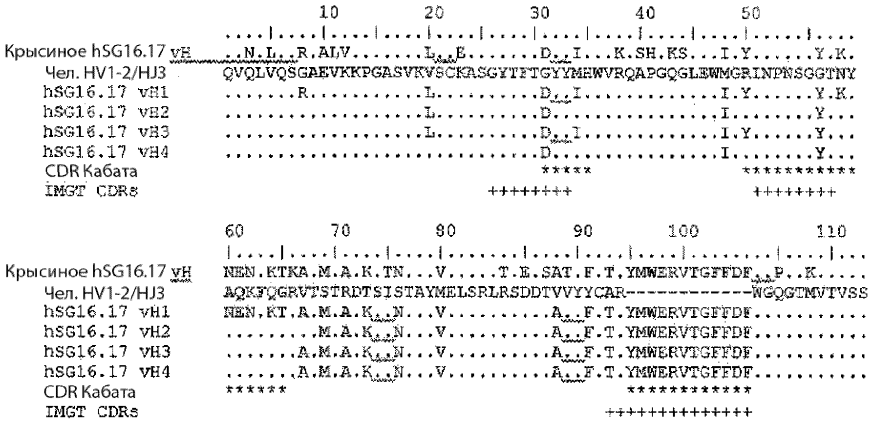


Фиг. 5



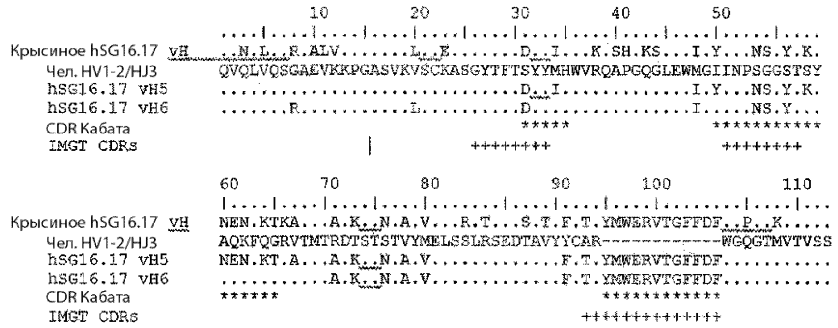
Фиг. 6

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17
с акцепторной последовательностью VH человека, HV1-2/HJ3



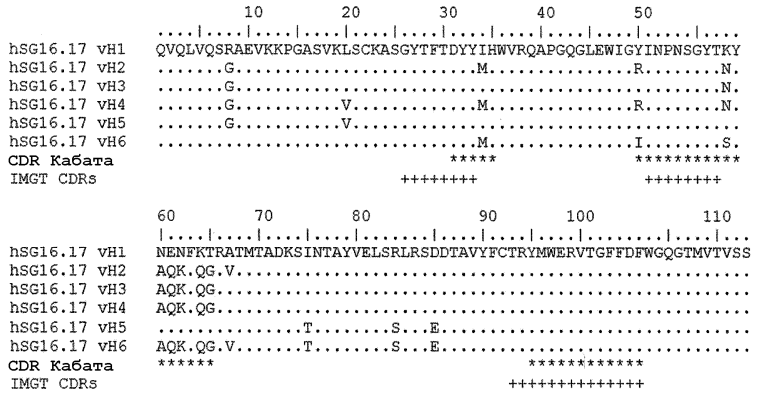
Фиг. 7

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17
с акцепторной последовательностью VH человека; HV1-46/HJ3



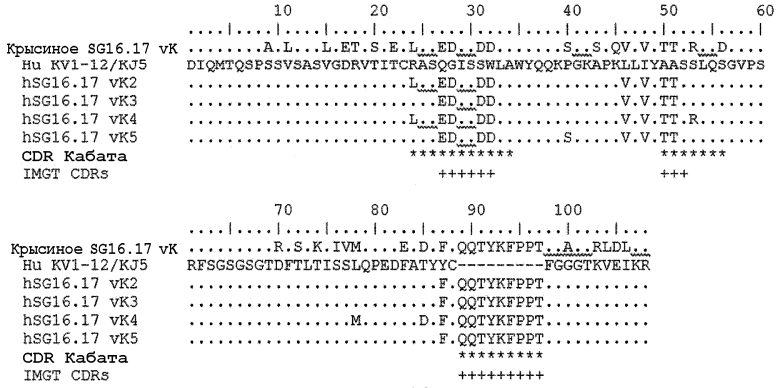
Фиг. 8

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17



Фиг. 9

Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VK человека; KV1-12/KJ5



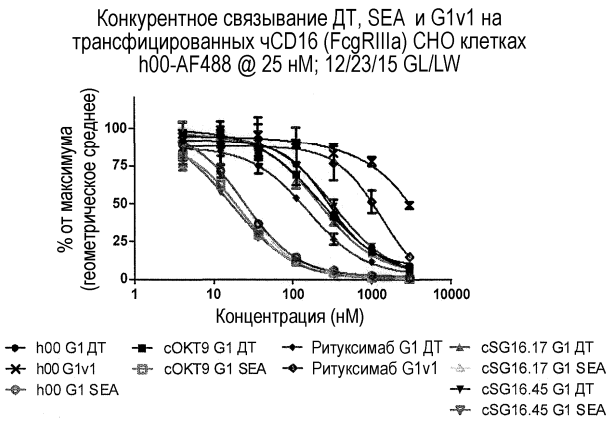
Фиг. 10

Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17

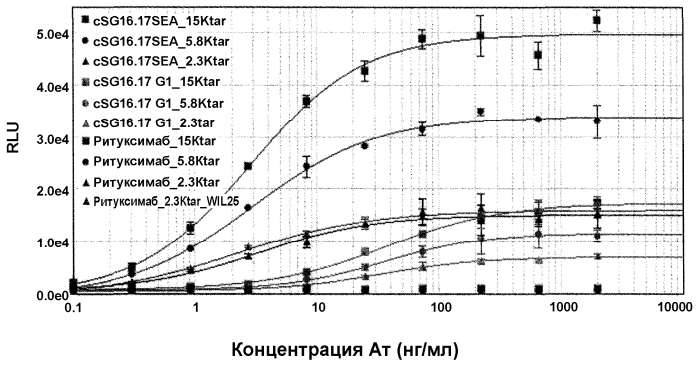
```
                    10        20        30        40        50        60
                    |....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
hSG16.17 vK2        DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASEDISDDLAWYQQKPGKAPKVLVYTTSSLQSGVPS
hSG16.17 vK3        ......................R.................................
hSG16.17 vK4        ................................................R.......
hSG16.17 vK5        ......................R................S..................
CDR Кабата                               ***********               *******
IMGT CDRs                                ++++++                    +++

                    70        80        90       100
                    |....|....|....|....|....|....|....|....|...
hSG16.17 vK2        RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQTYKFPPTFGGGTKVEIKR
hSG16.17 vK3        ...............................................
hSG16.17 vK4        ................M.....D........................
hSG16.17 vK5        ...............................................
CDR Кабата                                 *********
IMGT CDRs                                  +++++++++
```

Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

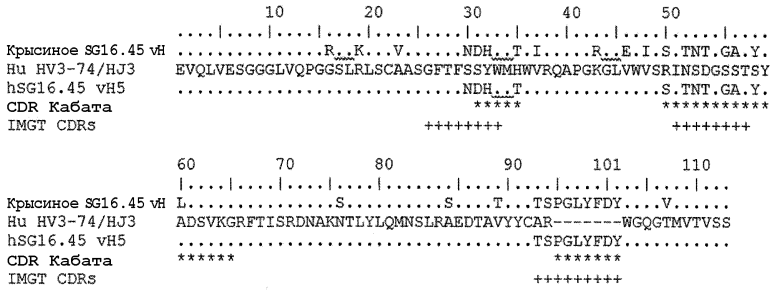
Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью HV человека; HV3-23/HJ3

```
                    10        20        30        40        50
                    |....|....|....|....|....|....|....|....|.....|....
Крысиное SG16.45 vH ....V.........R..K...V......NDHW.T.I.....R....I.S.TNT..A...
 Hu HV3-23/HJ3      EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
 hSG16.45 vH1       ............................NDHW.T.I..........I.S.TNT..A...
 hSG16.45 vH2       ............................NDHW.T.I..........I...TNT..A...
 hSG16.45 vH3       ............................NDHW.T.I..........I...TNT..A...
 hSG16.45 vH4       ............................NDHW.T............I.S.TNT..A...
 CDR Кабата                                      *****             ***********
 IMGT CDRs                                  ++++++++                 ++++++++

                    60        70        80            90       101      110
                    |....|....|....|....|.......|....|....|....|...|....|...
Крысиное SG16.45 vH L.............A.S.........S....T...TSPGLYFDY....V......
 Hu HV3-23/HJ3      ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-------WGQGTMVTVSS
 hSG16.45 vH1       L.................................TSPGLYFDY....V......
 hSG16.45 vH2       ..................................TSPGLYFDY....V......
 hSG16.45 vH3       ................S..................TSPGLYFDY....V......
 hSG16.45 vH4       ...............S...................TSPGLYFDY...........
 CDR Кабата         ******                                *******
 IMGT CDRs                                                +++++++++
```

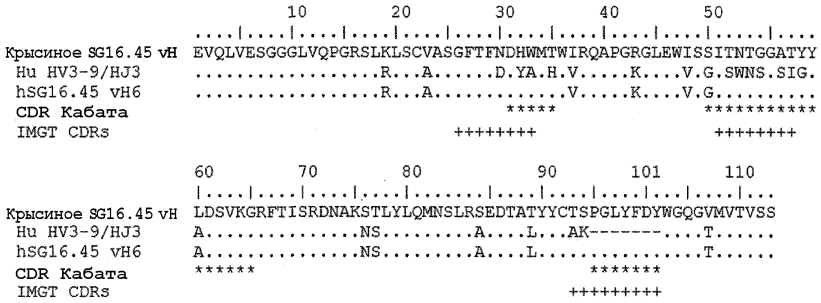
Фиг. 14

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью HV человека; HV3-74/HJ3



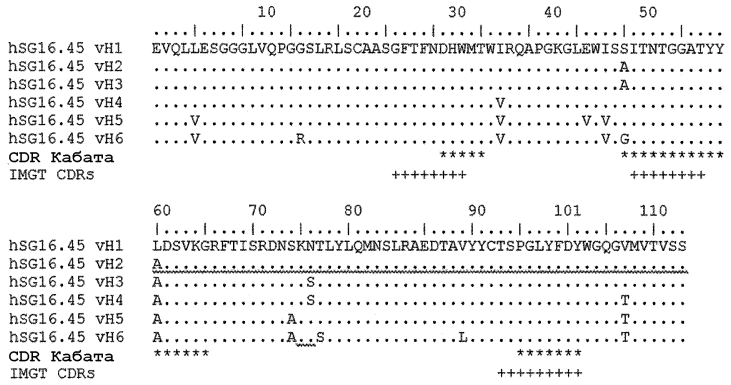
Фиг. 15

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью HV человека; HV3-9/HJ3



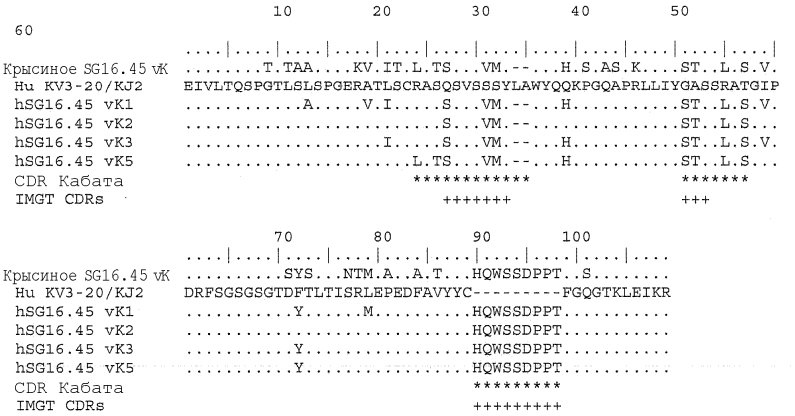
Фиг. 16

Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45



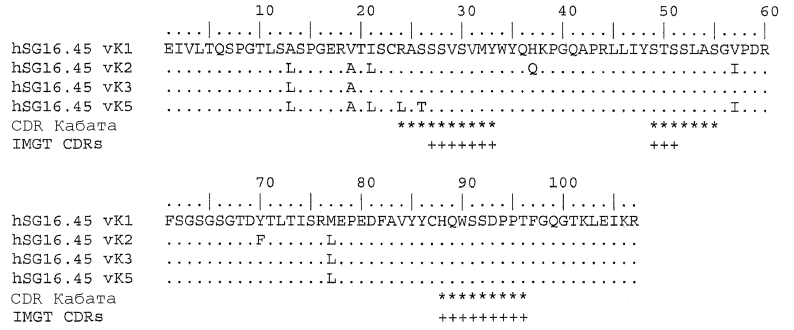
Фиг. 17

Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью KV человека; KV3-20/KJ2



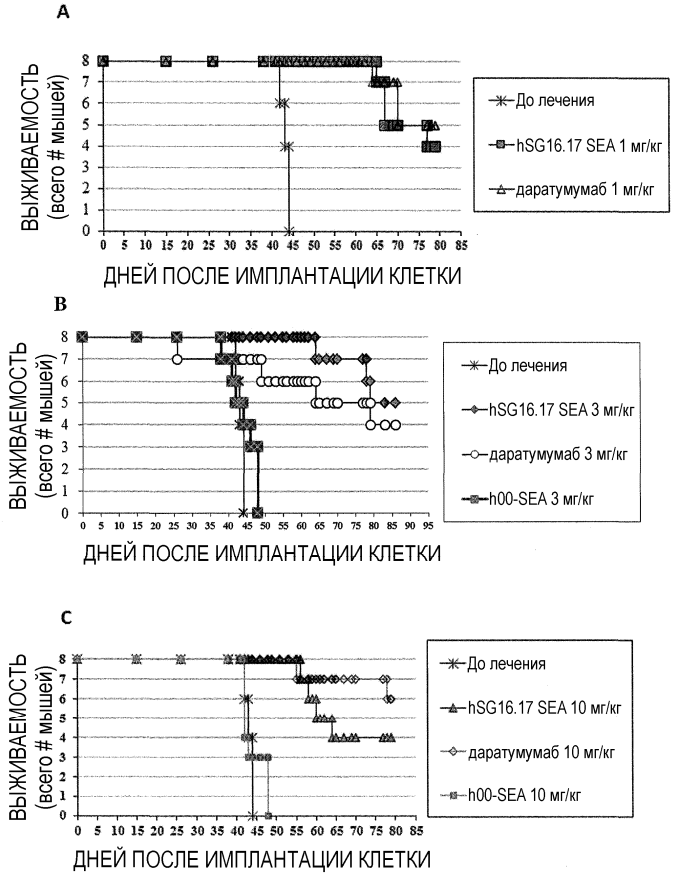
Фиг. 18

Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45



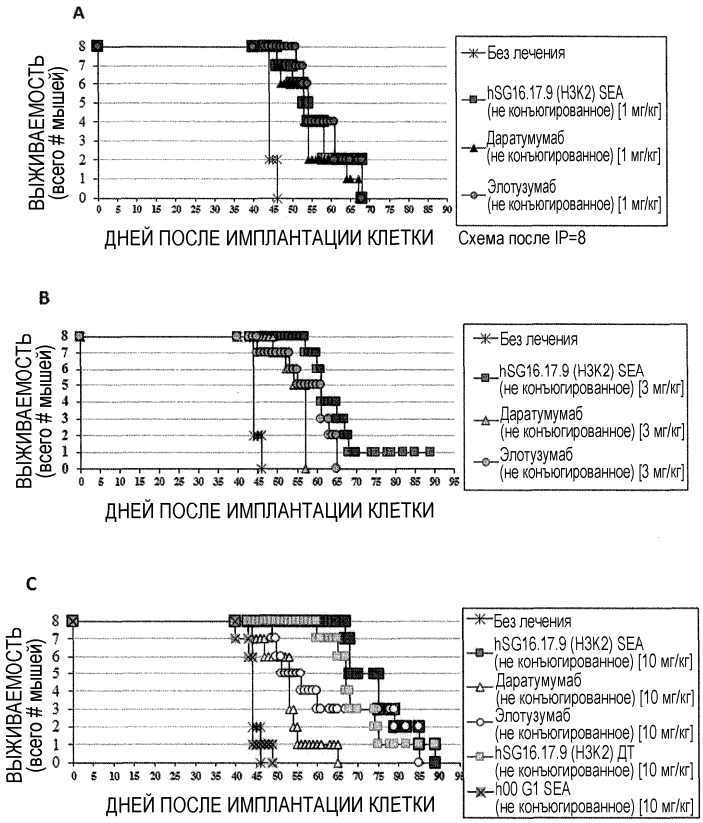
Фиг. 19

Активность in vivo мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID



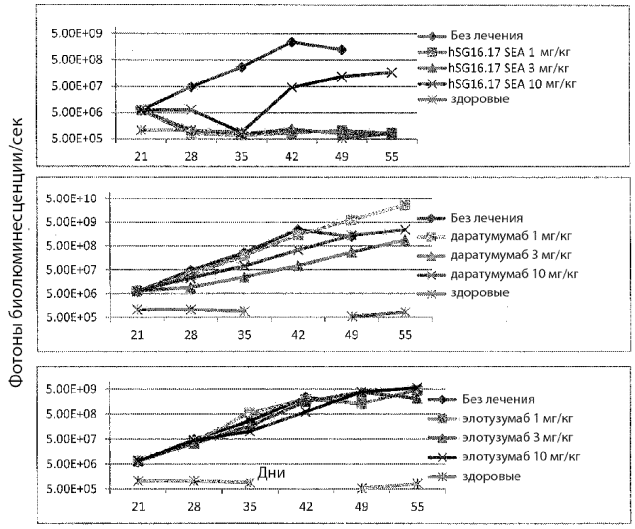
Фиг. 20

Активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG



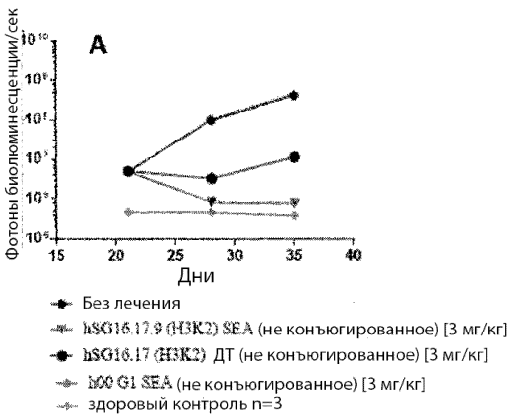
Фиг. 21

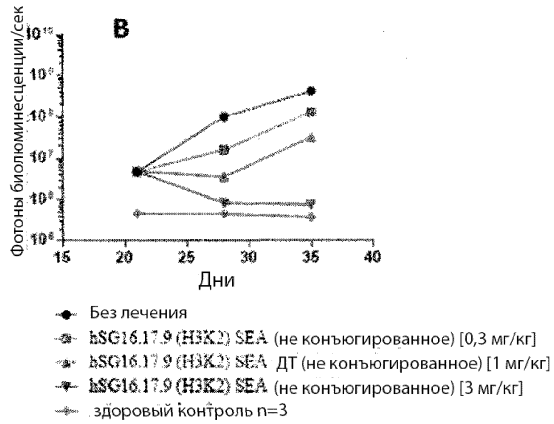
Активность in vivo мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG



Фиг. 22

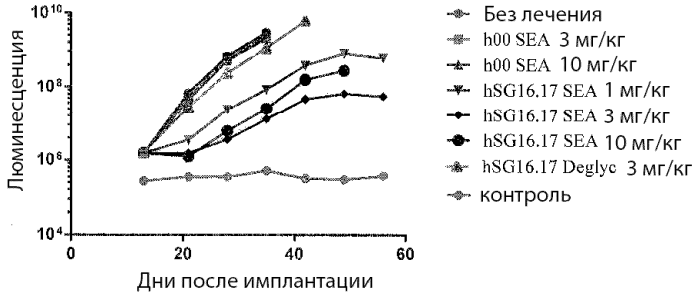
Активность in vivo однократно дозированного hSG16.17-SEA
в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG





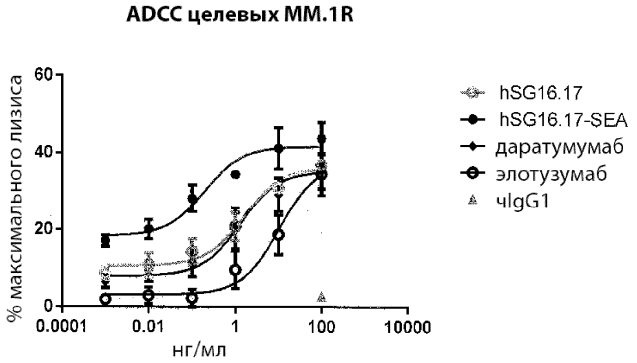
Фиг. 23

Активность in vivo однократно дозированного hSG16.17-SEA
в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID.



Фиг. 24

Антитело SG16.17 SEA демонстрирует улучшенную ADCC активность на целевых клетках MM1R



Фиг. 25