

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390131 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.21(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.07.30

(54) АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНОЕ В ОТНОШЕНИИ МУЦИНА-1, И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/059,497

(72) Изобретатель:

(32) 2020.07.31

Рабука Дэвид, Дрейк Пенелопа М.,

(33) US

Ким Юн Чхол, Барфилд Робин М.,

(86) PCT/US2021/043868

Бозон Максин, Огункойя Айдоле

(87) WO 2022/026809 2022.02.03

(US)

(71) Заявитель:

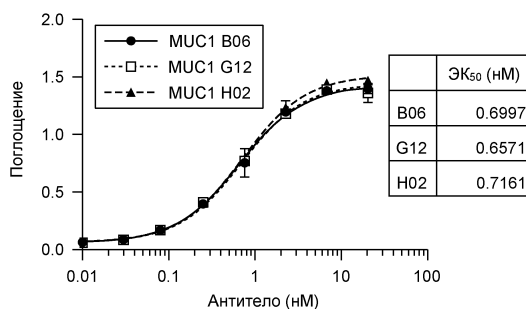
(74) Представитель:

Р.П. ШЕРЕР ТЕКНОЛОДЖИС, ЛЛС
(US)

Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены антитела, специфичные в отношении муцина-1. Также предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют одну или обе переменные цепи антитела согласно настоящему изобретению, а также клетки, которые включают такие нуклеиновые кислоты. Также предложены композиции, которые включают антитела согласно настоящему изобретению, включая в некоторых случаях фармацевтические композиции. Также предложены способы получения и применения антител согласно настоящему изобретению. В некоторых аспектах предложены способы, которые включают введение индивидууму, имеющему клеточное пролиферативное расстройство, терапевтически эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело вводят индивидууму для усиления иммунного ответа, например ответа Т-клеток, на патологически пролиферирующие клетки клеточного пролиферативного расстройства. Антитела также можно применять в различных диагностических и мониторинговых приложениях, которые также предложены.

20-членный гликозилированный MUC1-биотин



A1

202390131

202390131

A1

АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧНОЕ В ОТНОШЕНИИ МУЦИНА-1, И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/059497, поданной 31 июля 2020 г., содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННОГО В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА

10 [0002] Перечень последовательностей предоставлен в виде текстового файла «RDWD-035WO SEQ LIST_ST25.txt», созданного 27 июля 2021 г. и имеющего размер 29 килобайт. Содержимое текстового файла полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

15 ВВЕДЕНИЕ

[0003] Муцин-1 (также называемый муцин 1 или MUC1) является членом семейства муцинов. Муцины представляют собой О-гликозилированные белки, которые играют существенную роль в образовании защитных слизистых барьеров на эпителиальных поверхностях. MUC1 экспрессируется на апикальной поверхности
20 эпителиальных клеток, которые выстилают поверхности слизистых оболочек многих различных тканей, включая легкие, молочную железу, желудок и поджелудочную железу. Этот белок протеолитически расщепляется на альфа- и бета-субъединицы, которые образуют гетеродимерный комплекс. N-концевая альфа-субъединица действует в адгезии клеток, а C-концевая бета-субъединица участвует в передаче клеточных сигналов.
25 Сверхэкспрессия, aberrантная внутриклеточная локализация и изменения гликозилирования этого белка связаны с карциномами.

[0004] В данной области техники существует потребность в безопасных и эффективных агентах, которые нацелены на MUC1, для диагностики и лечения состояний, связанных с MUC1, таких как рак.

30

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0005] Согласно настоящему изобретению предложены антитела, специфичные в отношении MUC1. Также предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или оба полипептида варибельной цепи антитела согласно настоящему изобретению, а также клетки, которые включают такие нуклеиновые кислоты. Также предложены композиции, которые включают антитела согласно настоящему изобретению, включая в некоторых случаях фармацевтические композиции. Также предложены способы получения и применения антител согласно настоящему изобретению. В некоторых аспектах предложены способы, которые включают введение индивидууму, имеющему клеточное пролиферативное расстройство, терапевтически эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело вводят индивидууму для усиления иммунного ответа, например, ответа Т-клеток, на патологически пролиферирующие клетки клеточного пролиферативного расстройства. Антитела можно применять в различных диагностических и мониторинговых приложениях, которые также предложены.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0006] На фиг. 1 показано, что антитела к MUC1, MUC1 gB06, MUC1 G12 и MUC1 H02, являются мономерными более чем на 99%, более чем на 99% и более чем на 98%, соответственно, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

[0007] На фиг. 2А-2С показано, что антитела к MUC1, MUC1 gB06, MUC1 G12 и MUC1 H02, связываются с рекомбинантным 20-членным гликозилированным MUC1-биотином, но не с рекомбинантным 60-членным негликозилированным MUC1-биотином или с гликозилированным пептидом-ловушкой, согласно оценке с помощью ИФА.

[0008] На фиг. 3А-3В показан уровень связывания антител к MUC1, MUC1 gB06, MUC1 G12 и MUC1 H02, с непокрытым планшетом со стрептавидином или планшетом Maxisorp.

[0009] На фиг. 4 показаны наложенные гистограммы, показывающие связывание указанных антител с указанными линиями клеток, протестированное с тремя повторами.

[0010] На фиг. 5 показаны гистограммы с разнесением, показывающие связывание указанных антител с указанными линиями клеток.

[0011] На фиг. 6 показана температура плавления областей CH2 и Fab антител к MUC1 B06, G12 и H02, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии.

5 [0012] На фиг. 7 показана *in vivo* эффективность антитела к MUC1 B06 против ксенотрансплантата T47D. n = 10 мышей/группу; стрелки указывают дни, в которые вводили антитело или наполнитель.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0013] Термины «антитела» и «иммуноглобулин» включают антитела или
10 иммуноглобулины любого изотипа (например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgE, IgD, IgA, IgM и т. д.), целые антитела (например, антитела, состоящие из тетрамера, который в свою очередь состоит из двух димеров полипептида тяжелой и легкой цепей);
одноцепочечные антитела (например, scFv); фрагменты антител (например, фрагменты
15 целых или одноцепочечных антител), которые сохраняют специфичное связывание с антигеном, включая, но не ограничиваясь перечисленными, фрагменты Fab, Fv, scFv и Fd,
химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела и слитые
белки, содержащие антигенсвязывающую часть антитела и белок, не являющийся
антителом. Антитела могут быть помечены с возможностью детектирования, например,
20 радиоизотопом, ферментом, который генерирует детектируемый продукт, флуоресцентным белком и тому подобным. Антитела могут быть дополнительно
конъюгированы с другими фрагментами, такими как члены пар специфичного связывания,
например, биотином (членом пары специфичного связывания биотин-авидин) и тому
подобным. Антитела также могут быть связаны с твердой подложкой, включая, но не
ограничиваясь перечисленными, полистирольные планшеты или гранулы и тому
25 подобное. Также термин охватывает Fab', Fv, F(ab')₂ и/или другие фрагменты антител,
которые сохраняют специфичное связывание с антигеном, и моноклональные антитела.
Антитело может быть одновалентным или двухвалентным.
«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, например,
антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела. Примеры
30 фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные
антитела (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечных

антител; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами «Fab», каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточный фрагмент «Fc», обозначение, отражающее способность к легкой

5 кристаллизации. Обработка пепсином дает фрагмент $F(ab')_2$, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

[0014] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий сайт. Эта область состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного

10 домена легкой цепи, которые тесно нековалентно связаны. Именно в этой конфигурации три определяющих комплементарных участка (CDR) каждого переменного домена взаимодействуют для формирования антигенсвязывающего сайта на поверхности димера

VH-VL. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже одиночный переменный домен (или половина Fv,

15 содержащая только три CDR, специфичных в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

[0015] Фрагмент «Fab» также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH₁) тяжелой цепи. Fab-фрагменты отличаются от фрагментов

20 Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH₁ тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение в настоящей заявке для Fab', в котором остаток(остатки) цистеина константных доменов несет(ут) свободную тиольную группу.

F(ab')₂-фрагменты антител первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, 25 которые имеют цистеины шарнира между ними. Также известны другие типы химического соединения фрагментов антител.

[0016] «Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) из любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В

30 зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам. Существует пять

основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

[0017] Фрагменты антител «одноцепочечный Fv» или «sFv» содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Согласно некоторым аспектам полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена.

[0018] Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

[0019] В настоящей заявке термин «аффинность» относится к равновесной константе обратимого связывания двух агентов и выражается как константа диссоциации (K_d). Аффинность может быть по меньшей мере в 1 раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз или более больше, чем аффинность антитела в отношении неродственных аминокислотных последовательностей. Аффинность антитела в отношении белка-мишени может составлять, например, от примерно 100 наномолярной (нМ) до примерно 0,1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пикомолярной (пМ) или от примерно 100 нМ до примерно 1 фемтомолярной (фМ) или более. В настоящей заявке термин «авидность» относится к устойчивости комплекса двух или более агентов к диссоциации после

разбавления. Термины «иммунореактивный» и «преимущественно связывается» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо по отношению к антителам и/или антигенсвязывающим фрагментам.

5 **[0020]** Термин «связывание» относится к непосредственной ассоциации между двумя молекулами, например, вследствие ковалентных, электростатических, гидрофобных и ионных и/или водородных взаимодействий, включая такие взаимодействия как солевые мостики и водные мостики. Рассматриваемое антитело к MUC1 специфично связывается с эпитопом в полипептиде MUC1, например, полипептиде MUC1 человека, например, гликозилированном MUC1 или его фрагменте. Неспецифичное связывание будет
10 относиться к связыванию с аффинностью менее примерно 10^{-7} M, например, к связыванию с аффинностью 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M и т. д.

[0021] Термин «специфично связывается» в контексте антитела и антигена означает, что антитело связывается или ассоциируется с антигеном с аффинностью или K_a (то есть, равновесной константой ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами 1/M), например, более или равной примерно 10^5 M⁻¹.
15

[0022] «Высокоаффинное» связывание относится к связыванию с K_a по меньшей мере 10^7 M⁻¹, по меньшей мере 10^8 M⁻¹, по меньшей мере 10^9 M⁻¹, по меньшей мере 10^{10} M⁻¹, по меньшей мере 10^{11} M⁻¹, по меньшей мере 10^{12} M⁻¹, по меньшей мере 10^{13} M⁻¹ или более. В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_D) конкретного связывающего взаимодействия с единицами M (например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M или менее). Согласно некоторым вариантам реализации специфичное связывание означает, что антитело связывается с антигеном со значением K_D
20 менее или равным примерно 10^{-5} M, менее или равным примерно 10^{-6} M, менее или равным примерно 10^{-7} M, менее или равным примерно 10^{-8} M или менее или равным примерно 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M или 10^{-12} M или менее. Аффинность связывания антитела с антигеном можно легко определить с помощью обычных методик, например, с помощью конкурентного ИФА (твёрдофазного иммуноферментного анализа), равновесного диализа, с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, прибора BIAcore 2000, с использованием общих процедур,
25 изложенных производителем); с помощью радиоиммуноанализа; или тому подобного.
30

[0023] В настоящей заявке термин «CDR» или «определяющий комплементарность участок» предназначен для обозначения содержащих несмежные участки антигенсвязывающих сайтов, обнаруживаемых в вариабельной области полипептидов тяжелой и легкой цепей. CDR описаны Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of proteins of immunological interest» (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), в которых определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или их подгруппы при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения в отношении CDR антитела или привитых антител или их вариантов считается входящим в объем данного термина, определенного и используемого в настоящей заявке. Аминокислотные остатки, которые составляют CDR, согласно определению каждого из указанных выше источников, изложены ниже в Таблице 1 с целью сравнения.

Таблица 1: Определения CDR

	Kabat¹	Chothia²	MacCallum³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

- 15 ¹ Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat et al., см. выше
² Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia et al., см. выше
³ Нумерация остатков соответствует номенклатуре MacCallum et al., см. выше

[0024] По всему тексту настоящего раскрытия нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина и в легкой цепи иммуноглобулина соответствует той, которая описана в работе Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), явным образом включенной в настоящую заявку посредством ссылки.

[0025] В настоящей заявке термин «каркас» при использовании в отношении вариабельной области антитела предназначен для обозначения всех аминокислотных остатков за пределами участков CDR в вариабельной области антитела. Каркас вариабельной области обычно представляет собой прерывистую аминокислотную

последовательность из примерно 100-120 аминокислот в длину, но предназначен для ссылки только на те аминокислоты, которые находятся за пределами CDR. В настоящей заявке термин «каркасный участок» предназначен для обозначения каждого домена каркаса, который отделен CDR.

- 5 **[0026]** «Исходный полипептид Ig» представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой отсутствует меченная альдегидом константная область, как описано в настоящей заявке. Исходный полипептид может содержать константную область с нативной последовательностью или может содержать константную область с уже существующими модификациями аминокислотной
- 10 последовательности (такими как добавления, делеции и/или замены).
- [0027]** В контексте полипептида Ig термин «константная область» хорошо известен в данной области техники и относится к С-концевой области тяжелой цепи Ig или легкой цепи Ig. Константная область тяжелой цепи Ig содержит домены CH1, CH2 и CH3 (и домены CH4, если тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь μ или ϵ). В нативной
- 15 тяжелой цепи Ig домены CH1, CH2, CH3 (и CH4, если он присутствует) начинаются сразу после (на С-конце) вариабельной области тяжелой цепи (VH), и каждый из них имеет от примерно 100 аминокислот до примерно 130 аминокислот в длину. В нативной легкой цепи Ig константная область начинается сразу после (на С-конце) вариабельной области легкой цепи (VL) и составляет от примерно 100 аминокислот до 120 аминокислот в длину.
- 20 **[0028]** «Эпитоп» представляет собой сайт на антигене (например, сайт на MUC1), с которым связывается антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, сближенных укладкой (например, третичной укладкой) белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы,
- 25 образованные 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 линейной или пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См.,
- 30 например, Epitope Mapping Protocols в Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996). Несколько коммерческих лабораторий предлагают услуги по

картированию эпитопов. Эпитопы, связанные антителом, иммунореактивным с мембраноассоциированным антигеном, могут находиться на поверхности клетки (например, во внеклеточной области трансмембранного белка), в результате этого такие эпитопы считаются доступными на клеточной поверхности, доступными для растворителя и/или экспонируемыми на клеточной поверхности.

[0029] Термин «генетически кодируемый», используемый в отношении аминокислотной последовательности полипептида, пептида или белка, означает, что аминокислотная последовательность состоит из аминокислотных остатков, которые могут быть получены в результате транскрипции и трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, причем транскрипция и/или трансляция может происходить в клетке или в бесклеточной системе транскрипции/трансляции *in vitro*.

[0030] Термин «контрольные последовательности» относится к последовательностям ДНК, которые облегчают экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной системе экспрессии, например, клетке млекопитающего, бактериальной клетке, бесклеточном синтезе и т. д. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариотических систем, например, включают промотор, необязательно последовательность оператора, и сайт связывания рибосомы. В эукариотических клеточных системах могут применяться промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

[0031] Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде препротейна, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить инициацию трансляции. Обычно «функционально связанный» означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и находятся в рамке считывания.

Связывание осуществляют путем лигирования или посредством реакций амплификации. Синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры можно применять для связывания последовательностей в соответствии с общепринятой практикой.

5 [0032] Термин «экспрессионная кассета» в контексте настоящей заявки относится к сегменту нуклеиновой кислоты, обычно ДНК, который может быть вставлен в нуклеиновую кислоту (например, с помощью сайтов рестрикции, совместимых с лигированием в представляющую интерес конструкцию или путем гомологичной рекомбинации в представляющую интерес конструкцию или в геном клетки-хозяина). Обычно сегмент нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который кодирует 10 представляющий интерес полипептид, а кассета и сайты рестрикции предназначены для облегчения вставки кассеты в правильную рамку считывания для транскрипции и трансляции. Экспрессионные кассеты также могут содержать элементы, которые облегчают экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, в клетке-хозяине, например, клетке-хозяине млекопитающего. Эти элементы 15 могут включать, но не ограничиваются перечисленными: промотор, минимальный промотор, энхансер, элемент ответа, последовательность терминатора, последовательность полиаденилирования и тому подобное.

[0033] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его природной среды. 20 Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно некоторым вариантам реализации антитело будет очищено (1) до более чем 90%, более чем 95% или более чем 98% по массе антитела, согласно определению 25 методом Лоури, например, более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих 30 условиях с использованием окрашивания Кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей

мере один компонент природной среды антитела не будет присутствовать. В некоторых случаях выделенное антитело может быть получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

[0034] Термин «природное антитело» относится к антителу, в котором тяжелые и легкие цепи антитела были изготовлены и спарены иммунной системой многоклеточного организма. Селезенка, лимфатические узлы, костный мозг и сыворотка являются примерами тканей, которые продуцируют природные антитела. Например, антитела, продуцируемые клетками, продуцирующими антитела, выделенными из первого животного, иммунизированного антигеном, представляют собой природные антитела.

[0035] Термин «гуманизированное антитело» или «гуманизированный иммуноглобулин» относится к нечеловеческому (например, мышинному или кроличьему) антителу, содержащему одну или более аминокислот (в каркасном участке, константной области или CDR, например), которые были заменены аминокислотой из человеческого антитела, имеющей соответствующее расположение. Обычно гуманизированные антитела продуцируют сниженный иммунный ответ у человека-хозяина по сравнению с негуманизированным вариантом этого же антитела. Антитела могут быть гуманизированы с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая, например, прививку CDR, маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности, перестановку цепей и тому подобное. Согласно определенным вариантам реализации каркасные замены идентифицируют путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. Соответственно, описанные выше антитела могут быть гуманизированы с использованием способов, которые хорошо известны в данной области техники.

[0036] Согласно определенным вариантам реализации молекулы антител, раскрытые в настоящей заявке, включают тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, предложенную в настоящей заявке, и константную область IgG1 человека, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в UniProt: P01857-1, версия 1. Согласно определенным вариантам реализации молекулы антител, раскрытые в настоящей заявке, включают легкую цепь, содержащую переменную область легкой

цепи, предложенную в настоящей заявке, и константную область легкой цепи человека.

Согласно определенным вариантам реализации константная область легкой цепи человека представляет собой константную область легкой каппа-цепи человека, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в UniProtKB/Swiss-Prot: P01834.2.

5 Согласно определенным вариантам реализации константная область тяжелой цепи IgG1 человека, присутствующая в рассматриваемых антителах, может содержать мутации, например, замены для модуляции функции Fc. Например, для снижения антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) могут быть введены мутации эффекторной функции LALAPG (L234A, L235A и P329G) или мутация N297A. Нумерация
10 замен основана на системе нумерации ЕС. «Система нумерации ЕС» или «индекс ЕС» обычно используется в указании остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс ЕС, описанный в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). «Индекс ЕС по Kabat» относится к нумерации ЕС остатков антитела IgG1
15 человека.

[0037] Термин «химерные антитела» относится к антителам, гены легкой и тяжелой цепи которых были сконструированы, как правило, с помощью генной инженерии, из генов переменных и константных областей антител, принадлежащих различным видам. Например, переменные сегменты генов мышинного моноклонального
20 антитела могут быть присоединены к константным сегментам человека, таким как гамма 1 и гамма 3. Примером терапевтического химерного антитела является гибридный белок, состоящий из переменного или антигенсвязывающего домена из антитела мыши и константного или эффекторного домена из антитела человека, хотя можно использовать домены из других видов млекопитающих.

25 **[0038]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке для обозначения полимерной формы аминокислот любой длины. Если конкретно не указано иное, «полипептид», «пептид» и «белок» могут включать генетически кодируемые и не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты и
30 полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы. Термин включает слитые белки, включая, но не ограничиваясь перечисленными, слитые белки с гетерологичной

аминокислотной последовательностью, слияния с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, белки, которые содержат по меньшей мере один N-концевой остаток метионина (например, для облегчения продукции в рекомбинантной клетке-хозяине); иммунологически меченые белки; и тому подобное. Применительно к антителу ясно, что цепь или домен содержит полипептид.

[0039] «Нативная аминокислотная последовательность» или «исходная аминокислотная последовательность» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для обозначения аминокислотной последовательности полипептида до модификации для включения модифицированного аминокислотного остатка.

[0040] Термины «аналог аминокислоты», «неприродная аминокислота» и тому подобные могут использоваться взаимозаменяемо и включают аминокислотоподобные соединения, которые по структуре и/или общей форме сходны с одной или более аминокислотам, обычно обнаруживаемыми во встречающихся в природе белках (например, Ala или A, Cys или C, Asp или D, Glu или E, Phe или F, Gly или G, His или H, Ile или I, Lys или K, Leu или L, Met или M, Asn или N, Pro или P, Gln или Q, Arg или R, Ser или S, Thr или T, Val или V, Trp или W, Tyr или Y). Аналоги аминокислот также включают природные аминокислоты с модифицированными боковыми цепями или остовами. Аналоги аминокислот также включают аналоги аминокислот с той же стереохимией, что и у встречающейся в природе D-формы, а также L-форму аналогов аминокислот. В некоторых случаях аналоги аминокислот имеют общие структуры остова и/или структуры боковых цепей с одной или более природными аминокислотами, при этом различие(различия) представляет(ют) собой одну или более модифицированных групп в молекуле. Такая модификация может включать, но не ограничивается перечисленными, замену атома (такого как N) родственным атомом (таким как S), добавление группы (такой как метил или гидроксил и т.д.) или атома (такого как Cl или Br и т.д.), делецию группы, замену ковалентной связи (одинарной связи двойной связью и т.д.) или их комбинации. Например, аналоги аминокислот могут включать α -гидроксикислоты и α -аминокислоты и тому подобное.

[0041] Термины «аминокислотная боковая цепь» или «боковая цепь аминокислоты» и тому подобное могут быть использованы для обозначения заместителя, присоединенного к α -углероду остатка аминокислоты, включая природные аминокислоты,

неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот. Боковая цепь аминокислоты также может включать боковую цепь аминокислоты, как описано в контексте модифицированных аминокислот и/или конъюгатов, описанных в настоящей заявке.

[0042] Термин «конъюгированный» обычно относится к химической связи, ковалентной или нековалентной, обычно ковалентной, которая проксимально связывает одну представляющую интерес молекулу со второй представляющей интерес молекулой. Согласно некоторым вариантам реализации агент выбран из фрагмента, продлевающего период полывыведения, агента для мечения и терапевтического агента. Например, для продления периода полувыведения антитела согласно настоящему изобретению могут быть необязательно модифицированы для обеспечения улучшенного фармакокинетического профиля (например, путем пегилирования, гипергликозилирования и т. п.). Модификации, которые могут увеличить период полувыведения в сыворотке, представляют интерес.

[0043] Термин «углевод» и подобные термины может использоваться для обозначения мономерных звеньев и/или полимеров моносахаридов, дисахаридов, олигосахаридов и полисахаридов. Термин сахар может использоваться для обозначения меньших углеводов, таких как моносахариды, дисахариды. Термин «производное углевода» включает соединения, в которых одна или более функциональных групп представляющего интерес углевода замещены (замещены любым удобным заместителем), модифицированы (преобразованы в другую группу с использованием любой удобной химии) или отсутствуют (например, устранены или замещены H). Различные углеводы и производные углеводов доступны и могут быть адаптированы для применения в рассматриваемых соединениях и конъюгатах.

[0044] В настоящей заявке термины «лечение», «осуществление лечения» и т. п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или нежелательного эффекта, связанного с заболеванием. «Лечение» в контексте настоящей заявки охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть

предрасположен к развитию заболевания, но у которого оно еще не было диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т. е. остановку его развития; и (c) облегчение заболевания, т. е. вызов регресса заболевания.

[0045] Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент», используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо, относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь перечисленными, мышей (например, крыс, мышей), приматов, не относящихся к человеку, человека, собачьих, кошачьих, копытных (например, лошадей, крупный рогатый скот, овец, свиней, коз) и т. д.

[0046] «Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству рассматриваемого антитела к MUC1, которое при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания является достаточным для осуществления такого лечения заболевания. «Терапевтически эффективное количество» будет варьировать в зависимости от антитела к MUC1, заболевания и его тяжести, а также возраста, массы и т. д. субъекта, подлежащего лечению.

[0047] «Биологический образец» охватывает множество типов образцов, полученных от индивидуума, и может быть использован в диагностическом или мониторинговом анализе. Это определение включает кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы солидных тканей, такие как биоптат, или полученные из них тканевые культуры или клетки и их потомство. Это определение также включает образцы, с которыми после получения были произведены какие-либо манипуляции, такие как обработка реагентами, солибилизация или обогащение определенными компонентами, такими как полинуклеотиды. Термин «биологический образец» охватывает клинический образец, а также включает клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей. В некоторых случаях биологический образец будет включать клетки печени.

[0048] Прежде чем обратиться к более подробному описанию настоящего изобретения следует понять, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами реализации, так как они, безусловно, могут изменяться. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для описания частных вариантов реализации и не имеет ограничительного

характера, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0049] В тех случаях, когда предложен диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение, вплоть до десятой единицы нижнего предела, если иное явным образом не следует из контекста, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включено в объем настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также включены в настоящее изобретение, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0050] Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Несмотря на то, что любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, также могут использоваться при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Все публикации, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации.

[0051] Следует отметить, что в настоящей заявке и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают их эквиваленты во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Таким образом, например, указание «антитела» включает множество таких антител и ссылка на «CDR» включает ссылку на один или более CDR и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее. Также следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любые необязательные элементы. Таким образом, это утверждение предназначено для использования в качестве предшествующего основания для использования такой исключающей терминологии как «исключительно», «только» и т.п. в

отношении перечисления элементов формулы изобретения или использования «отрицательного» ограничения.

[0052] Публикации, обсуждаемые в настоящей заявке, представлены исключительно по причине их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем описании не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

10

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0053] Согласно настоящему изобретению предложены антитела, специфичные в отношении MUC1. Также предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или оба полипептида варибельной цепи антитела согласно настоящему изобретению, а также клетки, которые включают такие нуклеиновые кислоты. Также предложены композиции, которые включают антитела согласно настоящему изобретению, включая в некоторых случаях фармацевтические композиции. Также предложены способы получения и применения антител согласно настоящему изобретению. В некоторых аспектах предложены способы, которые включают введение индивидууму, имеющему клеточное пролиферативное расстройство, терапевтически эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению, причем указанное антитело вводят индивидууму для усиления иммунного ответа, например, ответа Т-клеток, на патологически пролиферирующие клетки клеточного пролиферативного расстройства. Антитела можно применять в различных диагностических и мониторинговых приложениях, которые также предложены.

25

АНТИТЕЛА К MUC1

[0054] Как обобщено выше, согласно настоящему изобретению предложены антитела к MUC1.

[0055] В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело согласно настоящему изобретению специфично связывается с MUC1 и конкурирует за связывание с MUC1 с антителом, и содержит:

30

[0056] вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1-3) цепи VH, имеющую последовательность:

[0057] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKQRPKGLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRLRYALDY
5 WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:1); и

[0058] вариабельную легкую цепь (VL), содержащую CDR1-3 легкой цепи (LCDR1-3) цепи VL, имеющую последовательность:

[0059] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIYG
TSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLEIK
10 (SEQ ID NO:2);

[0060] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQQKPGQAPRLWIYR
STKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDAAVYYCHQYRWSPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:3); или

[0061] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIIGT
15 SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLLEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK (SEQ
ID NO:4).

[0062] Любой пригодный подход можно применять для определения того, конкурирует ли первое антитело со вторым антителом за связывание с MUC1. Можно легко определить, «конкурирует» ли первое антитело со вторым антителом за связывание с MUC1, с использованием анализов конкурентного связывания, известных в данной области техники. Конкурирующие антитела могут быть идентифицированы, например, с помощью конкурентного анализа антител. Например, образец первого антитела может быть связан с твердой подложкой. Затем добавляют образец второго антитела, предположительно способного конкурировать с таким первым антителом. Одно из двух
20 антител метят. Если меченое антитело и немеченое антитело связываются с отдельными и дискретными сайтами на MUC1, меченое антитело будет связываться на одном и том же уровне, независимо от того, присутствует ли предположительно конкурирующее антитело или нет. Однако если сайты взаимодействия идентичны или перекрываются, немеченое антитело будет конкурировать, и количество меченого антитела, связанного с MUC1,
25 будет снижено. Если немеченое антитело присутствует в избытке, будет связываться очень незначительное количество меченого антитела, если это вообще имеет место.
30

[0063] Для целей настоящего изобретения конкурирующие антитела представляют собой антитела, которые снижают связывание антитела к MUC1 примерно на 50% или более, примерно на 60% или более, примерно на 70% или более, примерно на 80% или более, примерно на 85% или более, примерно на 90% или более, примерно на 95% или более или примерно на 99% или более. Подробности процедур проведения таких конкурентных анализов хорошо известны в данной области техники. Такие анализы могут быть выполнены количественно с использованием очищенных антител. Стандартную кривую можно построить путем титрования одного антитела против самого себя, т.е. одно и то же антитело применяют как в качестве метки, так и конкурента. Может быть протитрована способность немеченого конкурирующего антитела ингибировать связывание меченого антитела с антигеном. Результаты могут быть нанесены на график, и концентрации, необходимые для достижения желаемой степени ингибирования связывания, могут быть сопоставлены.

[0064] В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело согласно настоящему изобретению специфично связывается с MUC1 и содержит:

[0065] переменную тяжелую цепь (VH), содержащую CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1-3) цепи VH, имеющую последовательность:

[0066] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKRPGKGLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRLRYALDY
WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1); и

[0067] переменную легкую цепь (VL), содержащую CDR1-3 легкой цепи (LCDR1-3) цепи VL, имеющую последовательность:

[0068] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIYG
TSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:2);

[0069] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQQKPGQAPRLWIYR
STKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYRWSPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:3); или

[0070] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIIGT
SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK (SEQ
ID NO:4).

[0071] HCDR1-3 и LCDR1-3 могут быть такими, как определено согласно номенклатуре Chothia, Kabat или IMGT. HCDR1-3 антител к MUC1, описанных в настоящей заявке, как определено в перечисленных номенклатурах, могут быть следующими:

Таблица 2:

Антитело к MUC1	Chothia	Kabat	IMGT
HCDR1	GYTFTDH (SEQ ID NO:7)	DHTMH (SEQ ID NO:17)	GYTFTDHT (SEQ ID NO:34)
HCDR2	YPRDDS (SEQ ID NO:8)	YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18)	FYPRDDST (SEQ ID NO:44)
HCDR3	GLRYALDY (SEQ ID NO:9)	GLRYALDY (SEQ ID NO:9)	ARGLRYALDY (SEQ ID NO:45)

5

[0072] LCDR1-3 антител к MUC1, описанных в настоящей заявке, могут быть такими, как определено в соответствии с номенклатурами, перечисленными в Таблицах 3-5.

10 Таблица 3

Антитело к MUC1	Chothia и Kabat	IMGT
LCDR1	RASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:10)	SSVSSSY (SEQ ID NO:33)
LCDR2	GTSNLAS (SEQ ID NO:11)	GT
LCDR3	HQYAWSPPT (SEQ ID NO:12)	HQYAWSPPT (SEQ ID NO:12)

Таблица 4

Антитело к MUC1	Chothia и Kabat	IMGT
LCDR1	RASSSVGSSNLY (SEQ ID NO:13)	SSVGSSN (SEQ ID NO:46)
LCDR2	RSTKLAS (SEQ ID NO:14)	RS
LCDR3	HQYRWSPTT	HQYRWSPTT

	(SEQ ID NO:15)	(SEQ ID NO:15)
--	----------------	----------------

Таблица 5

Антитело к MUC1	Chothia и Kabat	IMGT
LCDR1	RASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:10)	SSVSSSY (SEQ ID NO:33)
LCDR2	GTSNLAS (SEQ ID NO:11)	GT
LCDR3	HQYSWSPPT (SEQ ID NO:16)	HQYSWSPPT (SEQ ID NO:16)

- [0073]** Согласно определенным вариантам реализации цепь VH антитела к MUC1
5 содержит HCDR1-3, как изложено в настоящей заявке, и цепь VL антитела к MUC1
содержит LCDR1-3, причем
- [0074]** LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVG/SSSYLY
(SEQ ID NO:41);
- [0075]** LCDR2 содержит аминокислотную последовательность G/RT/SS/TN/KLAS
10 (SEQ ID NO:42);
- [0076]** LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYA/R/SWSPPT
(SEQ ID NO:43) согласно определению Kabat.
- [0077]** Согласно определенным вариантам реализации цепь VH антитела к MUC1
содержит HCDR1-3, как изложено в настоящей заявке, и содержит аминокислотную
15 последовательность, имеющую 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или
более, 99% или более или 100% идентичности последовательности с аминокислотной
последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:1. Согласно определенным вариантам
реализации любые аминокислотные различия между цепью VH антитела к MUC1
согласно настоящему изобретению и SEQ ID NO:1 могут быть ограничены областями за
20 пределами CDR, например, в одном или более из каркасных участков (FR), например,
FR1, FR2, FR3 и/или FR4.
- [0078]** Согласно определенным вариантам реализации цепь VL антитела к MUC1
содержит LCDR1-3, как изложено в настоящей заявке в Таблице 3, и содержит
аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более, 85% или более, 90% или

более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:2.

[0079] Согласно определенным вариантам реализации цепь VL антитела к MUC1 содержит LCDR1-3, как изложено в настоящей заявке в Таблице 4, и содержит
5 аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:3.

[0080] Согласно определенным вариантам реализации цепь VL антитела к MUC1 содержит LCDR1-3, как изложено в настоящей заявке в Таблице 5, и содержит
10 аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:4.

[0081] Согласно определенным вариантам реализации любые аминокислотные различия между цепью VL антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению и SEQ ID
15 NO:2, 3 и 4, могут быть ограничены областями за пределами CDR, например, в одном или более из каркасных участков (FR), например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4.

[0082] Согласно определенным вариантам реализации антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению может содержать: а) тяжелую цепь, содержащую область VH, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:1; и легкую
20 цепь, содержащую область VL, имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:2, 3 или 4.

[0083] Антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению могут связываться с MUC-1 со значением ЭК₅₀ примерно 0,4-1 нМ, например, 0,5-0,9 нМ, 0,6-0,8 нМ или 0,65-
25 0,75 нМ, согласно измерению с помощью ИФА. Концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальный ответ (например, полумаксимальную интенсивность флуоресценции), измеряют как ЭК₅₀. MUC-1 может представлять собой 20-членный гликозилированный пептид MUC1, как описано в Примере 1.

[0084] Антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению могут связываться с 20-членным гликозилированным пептидом MUC1, но не с рекомбинантным 60-членным
30 негликозилированным пептидом MUC1, как описано в Примере 1.

[0085] Антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению могут связываться с раковой тканью и могут не связываться (например, незначительное связывание, измеренное с помощью иммуногистохимии, или связывание, не детектируемое с помощью иммуногистохимии) с нормальной тканью. Например, антитела к MUC1, описанные в настоящей заявке, могут связываться с тканями желудка, молочной железы и/или легких человека, которые имеют раковые клетки, при этом не показывают детектируемого связывания с тканями желудка, молочной железы и/или легких человека, которые не имеют раковых клеток.

[0086] Согласно определенным вариантам реализации область VH антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты:

[0087] GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
TACAGTGAAAATCTCCTGCAAGGTTTCTGGATACACCTTCACCGACCATACCATGCA
CTGGATCAAACAGCGACCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGATACTTCTACCCTA
GAGATGATTCCACAAATTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACCCTTACCGCG
GACAAATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAC
GGCCGTGTATTACTGTGCGCGTGGTCTTCGATACGCTCTTGACTACTGGGGCCAAGG
AACCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:19)

[0088] Согласно определенным вариантам реализации область VL антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты:

[0089] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTTAGCAGCAGCTACTTATAC
TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTGGATCTATGGTACCTCCAAC
CTTGCCTCCGGCGTCCCAGCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACT
CTCACCATCAGCTCCCTGGAGCCTGAAGATGCGGCAGTTTATTACTGTCACCAATAC

GCCTGGTCCCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGTTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:38);

[0090] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTGGCAGCAGCAACTTATA
5 CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTGGATCTATAGGTCCACCA
AACTTGCCTCCGGCGTCCCAGCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTAC
ACTCTACCATCAGCTCCCTGGAGCCTGAAGATGCGGCAGTTTATTACTGTCACCAA
TACAGATGGTCCCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGTTGGAAATCAAA (SEQ ID
NO:39); или

10 **[0091]** GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG
GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTAGCAGCAGCTACTTATAC
TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTGGATCATTGGTACCTCCAAC
CTTGCCTCCGGCGTCCCAGCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACT
CTCACCATCAGCTCCCTGGAGCCTGAAGATGCGGCAGTTTATTACTGTCACCAATAC
15 TCCTGGTCCCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGTTGGAAATCAAA (SEQ ID
NO:40).

[0092] Антитела находят применение в различных исследовательских,
диагностических и терапевтических приложениях, в том числе для выполнения любого из
способов, описанных в заявках на патент США №№ US20120141375A1,

20 US20160145343A1, содержание которых полностью включено в настоящую заявку
посредством ссылки для всех целей.

[0093] Рассматриваемое антитело специфично связывает полипептид MUC1, в
котором эпитоп содержит аминокислотные остатки в антигене MUC1 человека,
содержащем аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:20:

25 **[0094]** MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVS
MTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTS
APDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR
PAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH
30 GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA
PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP

PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT
RPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA
5 HGVTSA
PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVTASGSASGSAST
LVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTG
VSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLA
10 FREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLLV
ALAIVYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGN
GGSSLSYTNPAVAATSANL (SEQ ID NO:20)

[0095] Согласно определенным вариантам реализации эпитоп MUC1, связываемый антителами к MUC1, раскрытыми в настоящей заявке, является гликозилированным.

15 **[0095]** Согласно определенным вариантам реализации эпитоп MUC1, связываемый антителами к MUC1, раскрытыми в настоящей заявке, присутствует на MUC1, экспрессируемом линиями клеток эпителиальной аденокарциномы и эпителиальными клетками легких.

[0096] Рассматриваемое антитело проявляет высокую аффинность связывания с MUC1. Например, рассматриваемое антитело связывается с MUC1 с аффинностью по
20 меньшей мере примерно 10^{-7} M, по меньшей мере примерно 10^{-8} M, по меньшей мере примерно 10^{-9} M, по меньшей мере примерно 10^{-10} M, по меньшей мере примерно 10^{-11} M или по меньшей мере примерно 10^{-12} M или более чем 10^{-12} M. Рассматриваемое антитело связывается с эпитопом, присутствующим на MUC1, с аффинностью от примерно 10^{-7} M до примерно 10^{-8} M, от примерно 10^{-8} M до примерно 10^{-9} M, от примерно 10^{-9} M до
25 примерно 10^{-10} M, от примерно 10^{-10} M до примерно 10^{-11} M или от примерно 10^{-11} M до примерно 10^{-12} M, или более чем 10^{-12} M.

[0097] Антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению в некоторых случаях может индуцировать апоптоз в клетке, которая экспрессирует MUC1 на своей клеточной поверхности.

30 **[0098]** «Антиген MUC1» или «полипептид MUC1» может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере

примерно 95%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:20.

[0099] В настоящей заявке термин «иммуноглобулин» относится к белку, состоящему из одного или более полипептидов, по существу кодируемых генами иммуноглобулина. Установленные гены иммуноглобулинов человека включают гены константной области каппа, лямбда, альфа (IgA1 и IgA2), гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эпсилон и мю; и многочисленные гены вариабельной области иммуноглобулина. Полноразмерные легкие цепи иммуноглобулина (примерно 25 кДа или 214 аминокислот) кодируются геном вариабельной области на N-конце (примерно 110 аминокислот) и константной области каппа или лямбда на C-конце. Полноразмерные тяжелые цепи иммуноглобулина (примерно 50 кДа или 446 аминокислот) кодируются геном вариабельной области на N-конце (примерно 116 аминокислот) и одним из других упомянутых выше генов константной области на C-конце, например, гамма (кодирующим примерно 330 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит полноразмерную тяжелую цепь иммуноглобулина и полноразмерную легкую цепь иммуноглобулина.

[00100] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело не содержит полноразмерной тяжелой цепи иммуноглобулина и полноразмерной легкой цепи иммуноглобулина, а вместо этого содержит антигенсвязывающие фрагменты полноразмерной тяжелой цепи иммуноглобулина и полноразмерной легкой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие фрагменты содержатся на отдельных полипептидных цепях; в других вариантах реализации антигенсвязывающие фрагменты содержатся в одной полипептидной цепи. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к одному или более фрагментам полноразмерного антитела, которые способны специфично связываться с MUC1, как описано выше. Примеры связывающих фрагментов включают (i) фрагмент Fab (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области); (iii) фрагмент Fd (состоящий из доменов VH и CH1); (iv) фрагмент Fv (состоящий из доменов VH и VL одного плеча антитела); (v) фрагмент dAb (состоящий из домена VH); (vi) выделенный CDR; (vii) одноцепочечный Fv (scFv)

(состоящий из доменов VH и VL одного плеча антитела, соединенных синтетическим линкером с использованием рекомбинантных средств так, что домены VH и VL спариваются с образованием одновалентной молекулы); (viii) диатела (состоящие из двух scFv, в которых домены VH и VL объединены таким образом, что они не спариваются с образованием одновалентной молекулы; VH каждого из scFv спаривается с доменом VL другого scFv с образованием двухвалентной молекулы); (ix) биспецифичные антитела (состоящие из по меньшей мере двух антигенсвязывающих областей, при этом каждая область связывает разный эпитоп). Согласно некоторым вариантам реализации фрагмент рассматриваемого антитела представляет собой фрагмент Fab. Согласно некоторым вариантам реализации фрагмент рассматриваемого антитела представляет собой одноцепочечное антитело (scFv).

[00101] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело представляет собой рекомбинантное или модифицированное антитело, например, химерное, гуманизованное, деиммунизированное или созданное *in vitro* антитело.

15 Термин «рекомбинантное» или «модифицированное» антитело в контексте настоящей заявки включает все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как (i) антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина; (ii) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител; (iii) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека; или (iv) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека на другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела включают гуманизованные, с привитыми CDR, химерные, деиммунизированные и созданные *in vitro* антитела; и 20 необязательно могут включать константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека.

[00102] Полноразмерные биспецифичные антитела могут быть созданы, например, с использованием обмена плечами Fab (или обмена половинами молекулы) между двумя 30 моноспецифичными двухвалентными антителами путем введения замен на контактной поверхности СН3 тяжелой цепи в каждую полумолекулу, чтобы способствовать

образованию гетеродимера из двух полумолекул антитела, имеющих различную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена плечами Fab является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации доменов СНЗ. Дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях исходных моноспецифичных антител восстанавливаются. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифичных антител образуют дисульфидную связь между тяжелой цепью и остатками цистеина второй молекулы исходного моноспецифичного антитела и одновременно домены СНЗ исходных антител высвобождаются и реформируются путем диссоциации-ассоциации. Домены СНЗ плеч Fab могут быть сконструированы таким образом, чтобы способствовать гетеродимеризации в сравнении с гомодимеризацией. Полученный продукт представляет собой биспецифичное антитело, имеющее два плеча Fab или полумолекулы, каждая из которых связывает отдельный эпитоп.

[00103] Стратегия «выступ-во-впадину» (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936) может быть использована для создания полноразмерных биспецифичных антител. Вкратце, выбранные аминокислоты, образующие контактную поверхность доменов СНЗ в IgG человека, могут быть мутированы в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с небольшой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, специфично связывающего первый антиген, и аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, специфично связывающего второй антиген. После совместной экспрессии двух антител образуется гетеродимер в результате преимущественного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» с тяжелой цепью с «выступом». Примерные пары замен СНЗ, образующие выступ и впадину, представляют собой (выраженные как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394Y/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S/L368A/Y407V.

[00104] Могут быть использованы другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий

путем замены положительно заряженных остатков на поверхности одного СНЗ и отрицательно заряженных остатков на поверхности второго СНЗ, как описано в публикации патента США № US2010/0015133; публикации патента США № US2009/0182127; публикации патента США № U82010/028637 или публикации патента США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризации могут способствовать следующие замены (выраженные в виде модифицированного положения в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированного положения во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351 Y/F405A/Y407V/T394W, T366I/K392M/T394W/F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W/F405A/Y407V, L351Y/Y407A/T366A/K409F, L351Y/Y407A/T366V/K409F, Y407A/T366A/K409F или T350V/L351Y/F405A/Y407V, T350V/T366L/K392L/T394W, как описано в публикации патента США № US2012/0149876 или публикации патента США № US2013/0195849.

[00105] Также предложены одноцепочечные биспецифичные антитела. Согласно некоторым вариантам реализации одноцепочечное биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифичный scFv. Рассматриваемое антитело может быть гуманизировано. Константная область(области), если она присутствует, также может быть по существу или полностью из иммуноглобулина человека.

[00106] Способы получения гуманизированных антител известны в данной области техники. Замена мышиными CDR в каркасе переменного домена человека может привести к сохранению их правильной пространственной ориентации, причем, например, каркас переменного домена человека принимает ту же или сходную конформацию, что и каркас переменного домена мыши, из которого произошли CDR. Это может быть достигнуто путем получения переменных доменов человека из антител человека, каркасные последовательности которых проявляют высокую степень идентичности последовательности с каркасами переменного домена мыши, из которых были получены CDR. Каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей могут быть получены из одинаковых или различных последовательностей антител человека. Последовательности антител человека могут представлять собой последовательности встречающихся в природе антител человека или могут представлять собой консенсусные последовательности нескольких антител человека.

[00107] После идентификации определяющих комплементарность участков донорного иммуноглобулина мыши и подходящих акцепторных иммуноглобулинов человека, следующим шагом является определение того, какие остатки из этих компонентов следует заменить для оптимизации свойств полученного гуманизованного антитела, если таковые имеются. В целом, замена человеческих аминокислотных остатков мышинными должна быть сведена к минимуму, поскольку введение мышинных остатков увеличивает риск того, что антитело вызовет ответ с участием антител человека к Ig мыши (НАМА) у людей. Признанные в данной области техники способы определения иммунного ответа могут быть выполнены для мониторинга ответа НАМА у конкретного пациента или во время клинических исследований. У пациентов, которым вводят гуманизованные антитела, могут проводить оценку иммуногенности в начале и в течение всего периода введения указанной терапии. Ответ НАМА измеряют, например, путем детектирования антител к гуманизованному терапевтическому реагенту в образцах сыворотки от пациента с использованием способа, известного специалисту в данной области техники, включая технологию поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE) и/или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Согласно многим вариантам реализации рассматриваемое гуманизованное антитело по существу не вызывает ответа НАМА у субъекта-человека.

[00108] Некоторые аминокислоты из каркасных остатков переменной области человека выбирают для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Неприродное сближение участков CDR мыши с каркасом переменной области человека может привести к неприродным конформационным ограничениям, которые, если они не корректируются путем замены определенных остатков аминокислот, приводят к потере аффинности связывания. Выбор остатков аминокислот для замены может быть определен, в частности, с помощью компьютерного моделирования. Компьютерное оборудование и программное обеспечение для получения трехмерных изображений молекул иммуноглобулинов известны в данной области техники. В целом, молекулярные модели получают, исходя из установленных структур для цепей иммуноглобулинов или их доменов. Моделируемые цепи сравнивают по сходству аминокислотных последовательностей с цепями или доменами установленных трехмерных структур, и цепи или домены, демонстрирующие наибольшее

сходство последовательностей, выбирают в качестве исходных точек для построения молекулярной модели. Для моделирования отбирают цепи или домены, имеющие по меньшей мере 50% идентичности последовательности, и предпочтительно те, которые имеют по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% идентичности последовательностей или более. Установленные исходные структуры модифицируют с учетом различий между фактическими аминокислотами в моделируемых цепях или доменах иммуноглобулина и в исходной структуре. Затем модифицированные структуры собирают в составной иммуноглобулин. Наконец, модель уточняется по минимизации энергии и путем проверки того, что все атомы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга и что длины и углы связей находятся в химически приемлемых пределах.

[00109] Если каркасные остатки, как определено по Kabat, выше, представляют собой остатки структурной петли, как определено по Chothia, выше, аминокислоты, присутствующие в мышинном антителе, могут быть выбраны для замены в гуманизированное антитело. Остатки, которые «примыкают к участку CDR», включают аминокислотные остатки в положениях, непосредственно примыкающих к одному или более из CDR в первичной последовательности гуманизированной цепи иммуноглобулина, например, в положениях, непосредственно примыкающих к CDR, как определено по Kabat, или CDR, как определено по Chothia (см., например, Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987)). Эти аминокислоты особенно вероятно взаимодействуют с аминокислотами в CDR и, если они выбраны из акцептора, искажают донорские CDR и снижают аффинность. Кроме того, смежные аминокислоты могут напрямую взаимодействовать с антигеном (Amit et al., Science, 233:747 (1986)) и отбор этих аминокислот из донора может быть желательным для сохранения всех антигенных контактов, которые обеспечивают аффинность в исходном антителе.

[00110] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит мультимеры scFv. Например, согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело представляет собой димер scFv (например, содержит два tandemных scFv (scFv₂)), тример scFv (например, содержит три tandemных scFv (scFv₃)), тетрамер scFv (например, содержит четыре tandemных scFv (scFv₄)) или представляет собой мультимер более чем из четырех scFv (например, в tandemе). Мономеры scFv могут быть соединены в tandemе линкерами, имеющими от примерно 2 аминокислот до

примерно 10 аминокислот в длину, например, 2 аминокислоты, 3 аминокислоты, 4 аминокислоты, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 8 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот в длину. Подходящие линкеры включают, например, (Gly)_x, где x представляет собой целое число от 2 до 10, глицин-сериновые полимеры и

5

[00111] Согласно определенным вариантам реализации антитело конъюгировано с агентом за счет расщепляемого или нерасщепляемого линкера. Линкеры, подходящие для применения с рассматриваемым антителом, включают «гибкие линкеры». Если они присутствуют, линкерные молекулы обычно имеют достаточную длину, чтобы обеспечить некоторое гибкое перемещение между связанными областями. Линкерные молекулы

10 обычно имеют примерно 6-50 атомов в длину. Линкерные молекулы также могут представлять собой, например, олигомеры арилацетилена, этиленгликоля, содержащие 2-10 мономерных звеньев, диамины, дикислоты, аминокислоты или их комбинации. С учетом настоящего изобретения можно использовать другие линкерные молекулы,

15 которые могут связываться с полипептидами.

10

15

[00112] В соответствии с некоторыми вариантами реализации линкер представляет собой химически лабильный линкер, такой как расщепляемый кислотой линкер, который стабилен при нейтральном pH (pH кровотока 7,3-7,5), но подвергается гидролизу при интернализации в слабокислые эндосомы (pH 5,0-6,5) и лизосомы (pH 4,5-5,0) клетки-мишени (например, раковой клетки). Химически лабильные линкеры включают, но не ограничиваются перечисленными, линкеры на основе гидразона, линкеры на основе оксима, линкеры на основе карбоната, линкеры на основе сложного эфира и т. д.

20

Согласно некоторым вариантам реализации линкер представляет собой ферментативно лабильный линкер, такой как ферментативно лабильный линкер, который стабилен в кровотоке, но подвергается ферментативному расщеплению при интернализации в клетку-мишень, например, лизосомальной протеазой (такой как катепсин или плазмин) в лизосоме клетки-мишени (например, раковой клетки). Ферментативно лабильные линкеры

25 включают, но не ограничиваются перечисленными, линкеры, которые включают пептидные связи, например, линкеры на основе дипептида, такие как линкеры валин-цитруллин (VC), такие как линкер малеимидакапроил-валин-цитруллин-пара-аминобензил

30

(МС-vc-РАВ), линкер валил-аланил-пара-аминобензилокси (Val-Ala-РАВ) и тому подобное.

[00113] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит константную область иммуноглобулина (например, область Fc). Область Fc, если она присутствует, может представлять собой область Fc человека. В случае присутствия константных областей антитело может содержать как константные области легкой цепи, так и константные области тяжелой цепи. Антитела, описанные в настоящей заявке, включают антитела, имеющие все типы константных областей, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любой изотип, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Примером подходящей области Fc тяжелой цепи является Fc изотипа IgG1 человека. Константные области легкой цепи могут представлять собой области лямбда или каппа. Рассматриваемое антитело (например, рассматриваемое гуманизированное антитело) может содержать последовательности более чем из одного класса или изотипа. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, как Fab, Fab' F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепей связаны посредством спейсера.

[00114] Согласно некоторым вариантам реализации антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению может включать одну или более аминокислотных замен, введенных в область Fc. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более аминокислотных замен могут находиться в положениях 239, 298, 326, 330 и 332 в области Fc. Согласно некоторым вариантам реализации антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению может включать одну или более из следующих аминокислотных замен, введенных в область Fc: I332E; S239D/A330L/I332E; S239D/S298A/I332E; S239D/K326T/I332E; S239D/S298A/K326T/I332E; или S239D/A330L/I332E/D356E/L358M.

[00115] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит свободную тиольную группу (-SH) на карбоксильном конце, причем указанную свободную тиольную группу можно использовать для присоединения антитела ко второму полипептиду (например, другому антителу, включая рассматриваемое антитело), каркасу, носителю и т. д.

- [00116]** Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит одну или более не встречающихся в природе аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, гидразиновую группу, гидразидную группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Включение не встречающейся в природе аминокислоты может обеспечить связь с полимером, вторым полипептидом, каркасом и т.д. Примеры таких не встречающихся в природе аминокислот включают, но не ограничиваются ими, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.
- 5
- [00117]** Согласно настоящему изобретению также предложены антитела к MUC1, имеющие присоединенный фрагмент, представляющий интерес, например, детектируемую метку, лекарственное средство, фрагмент, продлевающий период полувыведения, и тому подобное. Модификация антител может быть осуществлена различными синтетическими и/или рекомбинантными способами. Фрагмент или
- 15
- фрагменты, присоединенные к антителу, могут обеспечивать одну или более из широкого спектра функций или признаков. Примерные фрагменты включают детектируемые метки (например, метки-красители (например, хромофоры, флуорофоры), биофизические зонды (спиновые метки, зонды для ядерного магнитного резонанса (ЯМР)), метки типа, подходящего для резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) (например, по
- 20
- меньшей мере один член пары FRET, включая по меньшей мере одного члена пары флуорофор/гаситель), метки типа, подходящего для резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET) (например, по меньшей мере один член пары BRET), иммунодетектируемые метки (например, FLAG, His(6) и тому подобные); водорастворимые полимеры (например, пегилирование); метки для очистки (например,
- 25
- для облегчения выделения с помощью аффинной хроматографии (например, присоединение эпитопа FLAG; домены локализации на мембране (например, якоря липидного или гликофосфатидилинозитольного (GPI) типа); иммобилизационные метки (например, для облегчения присоединения полипептида к поверхности, включая селективное присоединение); лекарственные средства (например, для облегчения
- 30
- нацеливания лекарственного средства, например, путем присоединения лекарственного средства к антителу); и тому подобное.

[00118] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело связано (например, ковалентно связано) с полимером (например, полимером, отличным от полипептида). Подходящие полимеры включают, например, биосовместимые полимеры и водорастворимые биосовместимые полимеры. Подходящие полимеры включают

5 синтетические полимеры и встречающиеся в природе полимеры. Подходящие полимеры включают, например, замещенный или незамещенный линейный или разветвленный полиалкилен, полиалкениленовые или полиоксиалкениленовые полимеры или разветвленные или неразветвленные полисахариды, например, гомо- или гетерополисахарид. Подходящие полимеры включают, например, сополимер

10 этиленвинилового спирта (широко известный под общим названием EVOH или торговым названием EVAL); полибутилметакрилат; полигидроксивалерат; поли-L-молочную кислоту; поликапролактон; сополимер лактида и гликолида; полигидроксибутират; сополимер гидроксибутирата и валерата; полидиоксанон; сложный полиортоэфир; полиангидрид; полигликолевую кислоту; поли-D,L-молочную кислоту; сополимер

15 гликолевой кислоты и триметиленкарбоната; сложный полифосфоэфир; сложный полифосфоэфир уретана; полиаминокислоты; цианоакрилаты; политриметиленкарбонат; полииминокарбонат; сополимеры простых и сложных эфиров (например, сополимеры полиэтиленоксида и полимолочной кислоты) (PEO/PLA); полиалкиленоксалаты; полифосфазены; биомолекулы, такие как фибрин, фибриноген, целлюлоза, крахмал,

20 коллаген и гиалуроновая кислота; полиуретаны; силиконы; сложные полиэфиры; полиолефины; сополимеры полиизобутилена и этилен-альфаолефина; акриловые полимеры и сополимеры; винилгалогенидные полимеры и сополимеры, такие как поливинилхлорид; поливиниловые простые эфиры, такие как поливинилметилловый простой эфир; поливинилиденгалогениды, такие как поливинилиденфторид и

25 поливинилиденхлорид; полиакрилонитрил; поливинилкетоны; поливиниловые ароматические соединения, такие как полистирол; поливиниловые сложные эфиры, такие как поливинилацетат; сополимеры виниловых мономеров друг с другом и олефинами, такие как сополимеры этилена и метилметакрилата, сополимеры акрилонитрила и стирола, смолы ABS и сополимеры этилена и винилацетата; полиамиды, такие как нейлон

30 66 и поликапролактамы; алкидные смолы; поликарбонаты; полиоксиметилены; полиимиды; простые полиэфиры; эпоксидные смолы; полиуретаны; искусственный шелк;

триацетатный шелк; целлюлозу; ацетат целлюлозы; бутират целлюлозы; бутират-ацетат целлюлозы; целлофан; нитрат целлюлозы; пропионат целлюлозы; простые эфиры целлюлозы; аморфный тефлон; полиэтиленгликоль; и карбоксиметилцеллюлозу.

[00119] Подходящие синтетические полимеры включают незамещенный и

5 замещенный линейный или разветвленный полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт и их производные, например, замещенный полиэтиленгликоль, такой как метоксиполиэтиленгликоль, и его производные. Подходящие встречающиеся в природе полимеры включают, например, альбумин, амилозу, декстран, гликоген и их производные.

10 **[00120]** Подходящие полимеры могут иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 Да до 50000 Да, например, от 5000 Да до 40000 Да или от 25000 до 40000 Да. Например, согласно некоторым вариантам реализации, в которых рассматриваемое антитело содержит полимер полиэтиленгликоля (ПЭГ) или метоксиполиэтиленгликоля, указанный полимер ПЭГ или метоксиполиэтиленгликоля может иметь молекулярную

15 массу в диапазоне от примерно 0,5 килодальтон (кДа) до 1 кДа, от примерно 1 кДа до 5 кДа, от 5 кДа до 10 кДа, от 10 кДа до 25 кДа, от 25 кДа до 40 кДа или от 40 кДа до 60 кДа.

[00121] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело ковалентно связано с полимером ПЭГ. Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемый мультимер scFv ковалентно связан с полимером ПЭГ. ПЭГ, подходящий

20 для конъюгации с белком, обычно растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R представляет собой водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа, и где n представляет собой целое число от 1 до 1000. Если R представляет собой защитную группу, она обычно имеет от 1 до 8 атомов углерода. ПЭГ, конъюгированный с рассматриваемым антителом, может быть

25 линейным или разветвленным. Разветвленные производные ПЭГ включают звездчатый ПЭГ и многофункциональный ПЭГ.

[00122] Рассматриваемое антитело может быть гликозилированным, например, рассматриваемое антитело может содержать ковалентно связанный углеводный или полисахаридный фрагмент. Гликозилирование антител обычно является N-связанным или

30 O-связанным. Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она

содержала сайты N- или O-связанного гликозилирования. Аналогичным образом, удаление сайтов гликозилирования можно осуществлять путем изменения аминокислоты в нативных сайтах гликозилирования антитела.

[00123] Рассматриваемое антитело может быть ковалентно связано со вторым фрагментом (например, липидом, полипептидом, отличным от рассматриваемого антитела, синтетическим полимером, углеводом и тому подобным) с использованием, например, глутаральдегида, гомобифункционального перекрестно сшивающего агента или гетеробифункционального перекрестно сшивающего агента. Глутаральдегид перекрестно сшивает полипептиды за счет их аминокислотных групп. Гомобифункциональные перекрестно сшивающие агенты (например, гомобифункциональный сложный имидоэфир, гомобифункциональный сложный эфир N-гидроксисукцинимид (NHS) или гомобифункциональный перекрестно сшивающий агент, реагирующий с сульфгидрильными группами) содержат два или более идентичных реакционноспособных фрагментов и могут быть применены в одностадийной реакции, в которой перекрестно сшивающий агент добавляют к раствору, содержащему смесь полипептидов, подлежащих связыванию. Гомобифункциональные сложные эфиры NHS и сложные имидоэфиры перекрестно сшивают полипептиды, содержащие амины. При мягком щелочном pH сложные имидоэфиры реагируют только с первичными аминами с образованием имидоамидов, и общий заряд перекрестно сшитых полипептидов не изменяется.

Гомобифункциональные перекрестно сшивающие агенты, реагирующие с сульфгидрильными группами, включают бисмалеимидгексан (BMH), 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (DFDNB) и 1,4-ди-(3',2'-пиридилдитио)пропинамидобутан (DPDPB).

[00124] Гетеробифункциональные перекрестно сшивающие агенты имеют два или более различных реакционноспособных фрагментов (например, реагирующий с аминокислотными группами фрагмент и реагирующий с сульфгидрильными группами фрагмент) и перекрестно сшиты с одним из полипептидов за счет реагирующего с аминокислотными группами или сульфгидрильными группами фрагмента, а затем вступили в реакцию с другим полипептидом за счет непрореагировавшего фрагмента. Доступны многочисленные гетеробифункциональные галогенацетильные перекрестно сшивающие агенты, а также пиридилдисульфидные перекрестно сшивающие агенты. Карбодиимиды являются

классическим примером гетеробифункциональных перекрестно сшивающих реагентов для связывания карбоксилов с аминами, что приводит к образованию амидной связи.

[00125] Рассматриваемое антитело может быть иммобилизовано на твердой подложке. Подходящие подложки хорошо известны в данной области техники и включают, помимо прочего, коммерчески доступные материалы колонок, полистирольные гранулы, латексные гранулы, магнитные гранулы, коллоидные частицы металла, стеклянные и/или кремниевые чипы и поверхности, нитроцеллюлозные полоски, нейлоновые мембраны, листы, дурациты, лунки реакционных лотков (например, многолуночных планшетов), пластиковые пробирки и т. д. Твердая подложка может содержать любое из множества веществ, включая, например, стекло, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозу, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Подходящие способы иммобилизации рассматриваемого антитела на твердую подложку хорошо известны и включают, но не ограничиваются перечисленными, ионные, гидрофобные, ковалентные взаимодействия и тому подобное. Твердые подложки могут быть растворимыми или нерастворимыми, например, в водном растворе. Согласно некоторым вариантам реализации подходящая твердая подложка обычно нерастворима в водном растворе.

[00126] Рассматриваемое антитело может в некоторых вариантах реализации содержать детектируемую метку. Подходящие детектируемые метки включают любую композицию, детектируемую спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими средствами. Подходящие метки включают, но не ограничиваются перечисленными, магнитные гранулы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, изотиоцианат флуоресцеина, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и подобные им), радиоактивные метки (например, H³, I¹²⁵, S³⁵, C¹⁴ или P³²), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие, обычно используемые в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА)), и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветные стеклянные или пластиковые гранулы (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т. д.).

- [00127]** Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит контрастный агент или радиоизотоп, при этом указанный контрастный агент или радиоизотоп представляет собой тот, который подходит для применения в качестве детектируемой метки, например, при визуализации, например, при процедурах визуализации, проводимых на людях. Неограничивающие примеры меток включают радиоизотоп, такой как I^{1231} (йод), F^{18} (фтор), Tc^{99} (технеций), In^{111} (индий) и Ga^{67} (галлий), и контрастный агент, такой как гадолиний (Gd), диспрозий и железо. Радиоактивные изотопы Gd (Gd^{153}) также доступны и пригодны для процедур визуализации у млекопитающих, отличных от человека.
- 5
- [00128]** Подходящие флуоресцентные белки, которые могут быть связаны с рассматриваемым антителом, включают, но не ограничиваются перечисленными, зеленый флуоресцентный белок из *Aequoria victoria* или его мутант или производное, улучшенный GFP, многие такие GFP, которые доступны коммерчески, например, от Clontech, Inc.; красный флуоресцентный белок; желтый флуоресцентный белок; любой из множества флуоресцентных и окрашенных белков из видов Anthozoan; и тому подобное.
- 10
- [00129]** Рассматриваемое антитело в некоторых вариантах реализации будет содержать «рентгеноконтрастную» метку, например, метку, которая может быть легко визуализирована с использованием, например, рентгеновских лучей. Рентгеноконтрастные материалы хорошо известны специалистам в данной области техники. Наиболее распространенные рентгеноконтрастные материалы включают йодидные, бромидные или бариевые соли. Другие рентгеноконтрастные материалы также известны и включают, но не ограничиваются перечисленными, органические производные висмута, рентгеноконтрастные мультиуретаны, органовисмутные композитные материалы, рентгеноконтрастные мультимерные комплексы бария и тому подобное.
- 15
- [00130]** Рассматриваемое антитело в некоторых вариантах реализации будет связано (например, ковалентно или нековалентно связано) с партнером по слиянию, например, лигандом; эпитопной меткой; пептидом; белком, отличным от антитела; и тому подобным. Подходящие партнеры по слиянию включают пептиды и полипептиды, которые придают повышенную стабильность *in vivo* (например, повышенный период полувыведения из сыворотки); обеспечивают легкость очистки и тому подобное; обеспечивают секрецию слитого белка из клетки; обеспечивают эпитопную метку, например, (His)_n, например,
- 20
- 25
- 30

6His, и тому подобное; обеспечивают секрецию слитого белка из клетки; обеспечивают эпитопную метку, например, GST, гемагглютинин (HA; например, CYPYDVPDYA; SEQ ID NO:35), FLAG (например, DYKDDDDK; SEQ ID NO:36), с-тус (например, SEQKLISEEDL; SEQ ID NO:37), и тому подобные; обеспечивают детектируемый сигнал, например, фермент, который генерирует детектируемый продукт (например, β-галактозидаза, люцифераза), или белок, который сам поддается детектированию, например, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и т. д.; обеспечивают мультимеризацию, например, домен мультимеризации, такой как часть Fc иммуноглобулина; и тому подобное.

5

10 **[00131]** Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит модификацию полиамином. Рассматриваемое антитело может быть модифицировано полиаминами, которые либо встречаются в природе, либо являются синтетическими. Полезные встречающиеся в природе полиамины включают путресцин, спермидин, спермин, 1,3-диаминопропан, норспермидин, син-гомоспермидин, термин, термоспермин, кальдопентамин, гомокальдопентамин и канавалмин. Особенно полезными являются путресцин, спермидин и спермин. Синтетические полиамины состоят из эмпирической формулы $C_xH_yN_z$, могут представлять собой циклические или ациклические, разветвленные или неразветвленные углеводородные цепи из 3-12 атомов углерода, которые дополнительно включают 1-6 фрагментов NR или N(R)₂, где R представляет собой H, (C₁-C₄) алкил, фенил или бензил. Полиамины могут быть соединены с антителом любым стандартным способом перекрестного сшивания.

15

20 **[00132]** Если антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению содержит ковалентно связанный гетерологичный фрагмент, указанный гетерологичный фрагмент может быть связан с тяжелой и/или легкой цепью антитела к MUC1 непосредственно или за счет линкера. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину из различных вариантов длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

25

30

[00133] Примеры гибких линкеров включают полимеры глицина (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO:21) и (GGGS)_n (SEQ ID NO:22), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере одному), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

Методы модификации антител

[00134] Антитела могут быть модифицированы, чтобы иметь ковалентно присоединенный гетерологичный фрагмент (например, детектируемую метку, лекарственное средство и т. д.), с использованием любого из множества способов.

10 Согласно настоящему изобретению предложено антитело к MUC1, конъюгированное с представляющим интерес фрагментом, причем указанное антитело к MUC1, конъюгированное с представляющим интерес фрагментом, называют «конъюгатом антитела к MUC1». Конъюгат антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению может включать: 1) константную область тяжелой цепи Ig, конъюгированную с представляющим
15 интерес фрагментом; и константную область легкой цепи Ig, конъюгированную с представляющим интерес фрагментом; 2) константную область тяжелой цепи Ig, конъюгированную с представляющим интерес фрагментом; и константную область легкой цепи Ig, не конъюгированную с представляющим интерес фрагментом; или 3)
20 константную область тяжелой цепи Ig, не конъюгированную с представляющим интерес фрагментом; и константную область легкой цепи Ig, конъюгированную с представляющим интерес фрагментом. Рассматриваемый конъюгат антитела к MUC1 также может включать домены VH и/или VL, конъюгированные с представляющим интерес фрагментом.

[00135] В одном примере антитело может быть модифицировано для включения остатка 2-формилглицина, который может служить в качестве химической ручки для
25 присоединения гетерологичного фрагмента. Например, константная область тяжелой и/или легкой цепи антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению может быть модифицирована таким образом, чтобы включать аминокислотную последовательность сульфатазного мотива, которая может быть преобразована под действием 2-
30 формилглицин-генерирующего фермента (FGE), так, чтобы она содержала 2-формилглицин (fGly). Такие сульфатазные мотивы также могут называться в настоящей заявке сайтом FGE-модификации. Действие FGE направлено специфичным для

последовательности образом так, что FGE действует на сульфатазный мотив, расположенный в полипептиде иммуноглобулина. Представляющий интерес фрагмент обеспечен в виде компонента реакционноспособного партнера для реакции с альдегидом остатка fGly преобразованной альдегидной метки меченого полипептида Ig. Широкий спектр коммерчески доступных реагентов можно применять для осуществления присоединения представляющего интерес фрагмента к остатку fGly меченого альдегидом полипептида Ig. Например, аминокси-, гидразидные или тиосемикарбазидные производные ряда представляющих интерес фрагментов являются подходящими реакционноспособными партнерами и легко доступны или могут быть созданы с использованием стандартных химических способов.

[00136] Например, для присоединения фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ) к меченому полипептиду Ig аминокси-ПЭГ может быть создан из моноамино-ПЭГ и аминоксиглицина с использованием стандартных протоколов. Затем аминокси-ПЭГ может быть приведен в реакцию с полипептидом Ig, меченым преобразованным альдегидом (например, fGly-модифицированным), чтобы обеспечить присоединение фрагмента ПЭГ. Доставка фрагмента биотина в полипептид, меченный преобразованным альдегидом, может быть осуществлена с использованием аминоксибиотина, гидразида биотина или 2,4-динитрофенилгидразина.

[00137] Минимальный сульфатазный мотив альдегидной метки обычно составляет 5 или 6 остатков аминокислот в длину, обычно не более 6 остатков аминокислот в длину. Сульфатазные мотивы, обеспеченные в полипептиде Ig, содержат по меньшей мере 5 или 6 аминокислотных остатков и могут составлять, например, от 5 до 16, 6-16, 5-15, 6-15, 5-14, 6-14, 5-13, 6-13, 5-12, 6-12, 5-11, 6-11, 5-10, 6-10, 5-9, 6-9, 5-8 или 6-8 аминокислотных остатков в длину, чтобы образовать сульфатазный мотив длиной менее 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислотных остатков. Согласно определенным вариантам реализации применяемый сульфатазный мотив может быть описан формулой:

[00138] $X^1Z^1X^2Z^2X^3Z^3$ (SEQ ID NO:29) (I), где

[00139] Z^1 представляет собой цистеин или серин (который также может быть представлен (C/S));

[00140] Z^2 представляет собой либо остаток пролина, либо остаток аланина (который также может быть представлен (P/A));

- [00141] Z^3 представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P)), обычно A, G, L, V или I;
- 5 [00142] X^1 присутствует или отсутствует и, при его наличии, может представлять собой любую аминокислоту, хотя обычно алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту (то есть, отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), обычно L, M, V, S или T, чаще всего L, M, S или V, при условии, что, если сульфатазный мотив
- 10 находится на N-конце целевого полипептида, X^1 присутствует; и
- [00143] X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, хотя обычно алифатическую аминокислоту, полярную, незаряженную аминокислоту или серосодержащую аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C; например, S, T, A, V или G. В
- 15 одном примере альдегидная метка имеет формулу L(C/S)TPSR (SEQ ID NO:5), например, LCTPSR (SEQ ID NO:6) или LSTPSR (SEQ ID NO:23). Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые включают меченную альдегидом тяжелую цепь Ig и/или меченную альдегидом легкую цепь Ig, причем
- 20 указанное меченное альдегидом антитело Ig содержит аминокислотную последовательность константной области Ig тяжелой и/или легкой цепи, содержащую такой сульфатазный мотив.
- [00144] В целом, FGE, используемый для облегчения превращения цистеина или серина в fGly в сульфатазном мотиве альдегидной метки целевого полипептида, выбирают
- 25 в соответствии с сульфатазным мотивом, присутствующим в альдегидной метке. FGE может быть нативным для клетки-хозяина, в которой экспрессируется меченный альдегидом полипептид, или клетка-хозяин может быть генетически модифицирована для экспрессии соответствующего FGE. Согласно некоторым вариантам реализации желательным может быть применение сульфатазного мотива, совместимого с FGE
- 30 человека, и экспрессия белка, меченного альдегидом, в клетке человека, которая экспрессирует FGE, или в клетке-хозяине, обычно клетке млекопитающего, генетически модифицированной для экспрессии FGE человека. В целом, FGE, подходящий для

применения при создании fGly-модифицированного антитела, можно получить из встречающихся в природе источников или синтетически. Например, подходящий FGE может быть получен из биологических источников, которые естественным образом продуцируют FGE или которые генетически модифицированы для экспрессии

5 рекомбинантного гена, кодирующего FGE. Нуклеиновые кислоты, кодирующие ряд FGE, известны в данной области техники и легко доступны.

[00145] После воздействия FGE на сульфатазный мотив Z_1 окисляется с генерацией остатка 2-формилглицина (fGly). Кроме того, после FGE-опосредуемого преобразования и реакции с реакционноспособным партнером, содержащим представляющий интерес

10 фрагмент, положение fGly в Z_1 в приведенной выше формуле ковалентно связано с представляющим интерес фрагментом (например, детектируемой меткой, водорастворимым полимером, полипептидом, лекарственным средством и т. д.). Таким образом, согласно настоящему изобретению предложено антитело к MUC1, модифицированное таким образом, чтобы содержать фрагмент fGly, причем указанное

15 антитело к MUC1 содержит fGly-преобразованный сульфатазный мотив, имеющий формулу:

[00146] $X^1(fGly)X^2Z^2X^3Z^3$ (SEQ ID NO:30), в которой:

[00147] X^1 присутствует или отсутствует и, при его наличии, представляет собой любую аминокислоту, при условии, что, если сульфатазный мотив находится на N-конце

20 полипептида, X^1 присутствует;

[00148] Каждый из X^2 и X^3 независимо представляет собой любую аминокислоту; и

[00149] Z^2 представляет собой либо остаток пролина, либо остаток аланина (который также может быть представлен (P/A));

[00150] Z^3 представляет собой основную аминокислоту; и

25 где fGly-модифицированное антитело к MUC1 презентует группу fGly на поверхности, доступной для растворителя, в уложенном состоянии. Согласно некоторым вариантам реализации fGly-преобразованный сульфатазный мотив имеет формулу $L(fGly)TPSR$ (SEQ ID NO:24).

[00151] Как отмечено выше, рассматриваемое антитело к MUC1, модифицированное

30 для включения фрагмента fGly, может быть дополнительно модифицировано для включения гетерологичного фрагмента, представляющего интерес (например,

детектируемой метки, водорастворимого полимера, полипептида, лекарственного средства и т. д.), ковалентно связанного с антителом к MUC1 за счет фрагмента fGly. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен конъюгат антитела к MUC1 (также называемый в настоящей заявке «конъюгат антитела к MUC1»), причем указанный конъюгат антитела к MUC1 содержит:

[00152] $X^1(\text{fGly}')X^2Z^2X^3Z^3$ (SEQ ID NO:31) (I'), где

[00153] fGly' представляет собой остаток 2-формилглицина, имеющий ковалентно присоединенный фрагмент;

[00154] Z^2 представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен (P/A)); Z^3 представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R), и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин), или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P)), обычно A, G, L, V или I;

[00155] X^1 может присутствовать или отсутствовать и, если он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, хотя обычно алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту (то есть, отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), обычно L, M, V, S или T, чаще всего L, M или V, при условии, что, если сульфатазный мотив находится на N-конце целевого полипептида, X^1 присутствует; и X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, хотя обычно алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту (т. е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), обычно S, T, A, V, G или C, чаще S, T, A, V или G. Согласно некоторым вариантам реализации мотив имеет формулу $L(\text{fGly}')\text{TPSR}$ (SEQ ID NO:25).

25

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

[00156] В некоторых случаях антитело к MUC1 согласно настоящему изобретению содержит лекарственное средство, ковалентно связанное с тяжелой и/или легкой цепью антитела. «Лекарственные средства» включают низкомолекулярные лекарственные средства, пептидные лекарственные средства, токсины (например, цитотоксины) и тому подобное.

30

[00157] «Низкомолекулярное лекарственное средство» в контексте настоящей заявки относится к соединению, например, органическому соединению, которое проявляет представляющую интерес фармацевтическую активность и которое обычно имеет молекулярную массу не более примерно 800 Да или не более 2000 Да, но может охватывать молекулы до 5 кДа и может быть размером до примерно 10 кДа. Малая неорганическая молекула относится к молекуле, не содержащей атомов углерода, в то время как малая органическая молекула относится к соединению, содержащему по меньшей мере один атом углерода.

[00158] «Пептидное лекарственное средство» в контексте настоящей заявки относится к полимерным соединениям, содержащим аминокислоты, и включает встречающиеся в природе и не встречающиеся в природе пептиды, олигопептиды, циклические пептиды, полипептиды и белки, а также пептидные миметики. Пептидные лекарственные средства могут быть получены с помощью химического синтеза или получены из генетически кодируемого источника (например, рекомбинантного источника). Пептидные лекарственные средства могут колебаться по молекулярной массе и могут иметь молекулярную массу от 200 Да до 10 кДа или более.

[00159] В некоторых случаях лекарственное средство представляет собой токсин, например, цитотоксин. Инактивирующие рибосому белки (RIP), которые являются классом белков, распространенных в высших растениях, являются примерами таких цитотоксинов. Подходящие цитотоксины включают, но не ограничиваются перечисленными, рицин, абрин, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas* (например, PE35, PE37, PE38, PE40 и т. д.), сапорин, гелонин, противовирусный белок лаконоса (PAP), ботулинический токсин, бриодин, момордин и буганин.

[00160] В некоторых случаях лекарственное средство представляет собой противораковый химиотерапевтический агент. Противораковые химиотерапевтические агенты включают непептидные (т.е. небелковые) соединения, которые уменьшают пролиферацию раковых клеток, и включают цитотоксические агенты и цитостатические агенты. Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, нитрозомочевины, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, растительные алкалоиды (барвинка) и стероидные гормоны. Также можно применять пептидные соединения.

[00161] Подходящие противораковые химиотерапевтические агенты включают доластатин и его активные аналоги и производные; и ауристатин и его активные аналоги и производные. Подходящие противораковые химиотерапевтические агенты также включают майтанзиноиды и их активные аналоги и производные; и дуокармицины и их активные аналоги и производные.

[00162] Агенты, уменьшающие клеточную пролиферацию, известны в данной области техники и широко используются. Такие агенты включают алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты, нитрозомочевины, производные этиленмина, алкилсульфонаты и триазены, включая, но не ограничиваясь перечисленными, мехлорэтамин, циклофосфамид (цитоксан™), мелфалан (L-сарколизин), кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (метил-CCNU), стрептозоцин, хлорозотоцин, урациловый иприт, хлорметин, ифосфамид, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, дакарбазин и темозоломид.

[00163] Антиметаболитные агенты включают аналоги фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, цитарабин (CYTOSAR-U), цитозинарабинозид, фторурацил (5-FU), флоксуридин (FudR), 6-тиогуанин, 6-меркаптопурин (6-MP), пентостатин, 5-фторурацил (5-FU), метотрексат, 10-пропаргил-5,8-дидезафолат (PDDF, СВ3717), 5,8-дидезазатетрагидрофолиевую кислоту (DDATHF), лейковорин, фосфат флударабина, пентостатин и гемцитабин.

[00164] Подходящие природные продукты и их производные (например, алкалоиды барвинка, противоопухолевые антибиотики, ферменты, лимфокины и эпиподофиллотоксины) включают, но не ограничиваются перечисленными, Ага-С, паклитаксел (таксол®), доцетаксел (таксотер®), дезоксикоформин, митомицин-С, L-аспарагиназу, азатиоприн; бреквинар; алкалоиды, например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин и т. д.; подофиллотоксины, например, этопозид, тенипозид и т. д.; антибиотики, например, антрациклин, даунорубицина гидрохлорид (дауномицин, рубидомицин, церубидин), идарубицин, доксорубицин, эпирубицин и морфолинопроизводные и т. д.; феноксизон-бисциклопептиды, например, дактиномицин; основные гликопептиды, например, блеомицин; антрахиноновые гликозиды, например, пликамицин (митрамицин); антрацендионы, например, митоксантрон; азиринопирролоиндолдионы,

например, митомицин; макроциклические иммунодепрессанты, например, циклоспорин, FK-506 (такролимус, програф), рапамицин и т. д.; и тому подобное.

[00165] Другие антипролиферативные цитотоксические агенты представляют собой навельбен, СРТ-11, анастрозол, летразол, капецитабин, релоксафин, циклофосфамид, ифосамид и дролоксафин.

[00166] Агенты, влияющие на микротрубочки, которые обладают антипролиферативной активностью, также подходят для применения и включают, но не ограничиваются перечисленными, аллоколхицин (NSC 406042), галихондрин В (NSC 609395), колхицин (NSC 757), производные колхицина (например, NSC 33410), долстатин 10 (NSC 376128), майтанзин (NSC 153858), ризоксин (NSC 332598), паклитаксел (таксол[®]), производные таксола[®], доцетаксел (таксотер[®]), тиоколхицин (NSC 361792), тритилцистерин, винбластин сульфат, винкристина сульфат, природные и синтетические эпотилоны, включая, но не ограничиваясь перечисленными, эпотилон А, эпотилон В, дискодермолид; эстрамустин, нокодазол и тому подобное.

[00167] Модуляторы гормонов и стероиды (включая синтетические аналоги), которые подходят для применения, включают, но не ограничиваются перечисленными, аденокортикостероиды, например, преднизон, дексаметазон и т. д.; эстрогены и прегестины, например, гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат, мегестрола ацетат, эстрадиол, кломифен, тамоксифен; т. д.; и аденокортикальные супрессоры, например, аминоклутетимид; 17 α -этинилэстрадиол; диэтилстильбэстрол, тестостерон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, метилпреднизолон, метил-тестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестерона ацетат, лейпролид, флутамид (дрогенил), торемифен (фарестон) и золадекс[®]. Эстрогены стимулируют пролиферацию и дифференцировку; поэтому соединения, которые связываются с рецептором эстрогена, используются для блокирования этой активности.

[00168] Другие подходящие химиотерапевтические агенты включают комплексы металлов, например, цисплатин (цис-DDP), карбоплатин и т. д.; мочевины, например, гидроксимочевину; и гидразины, например, N-метилгидразин, эпидофиллотоксин; ингибитор топоизомеразы; прокарбазин; митоксантрон; лейковорин; тегафур; и т.п. Другие представляющие интерес антипролиферативные агенты включают

иммуносупрессоры, например, микофеноловую кислоту, талидомид, дезоксипергуалин, азаспорин, лефлуномид, мизорибин, азаспиран (SKF 105685); иресса® (ZD 1839, 4-(3-хлор-4-фторфениламино)-7-метокси-6-(3-(4-морфолинил)пропокси)хиназолин); и т.п.

5 [00169] Таксаны подходят для применения. «Таксаны» включают паклитаксел, а также любое активное производное или пролекарство таксана. «Паклитаксел» (который следует понимать в настоящей заявке как включающий аналоги, составы и производные, такие как, например, доцетаксел, таксол™, таксотер™ (состав доцетаксела), 10-дезацетильные аналоги паклитаксела и 3'N-дезбензоил-3'N-t-бутоксикарбонильные аналоги паклитаксела) может быть легко получен с использованием методик, известных
10 специалистам в данной области техники (см. также WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; патенты США №№ 5294637; 5283253; 5279949; 5274137; 5202448; 5200534; 5229529; и EP 590267), или получен из различных коммерческих источников, включая, например, Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Миссури (T7402 из *Taxus brevifolia*; или T-1912 из *Taxus yunnanensis*).

15 [00170] Следует понимать, что паклитаксел относится не только к обычной химически доступной форме паклитаксела, но и к аналогам и производным (например, доцетаксел таксотер™, как указано выше) и конъюгатам паклитаксела (например, паклитаксел-ПЭГ, паклитаксел-декстран или паклитаксел-ксилоза).

[00171] Термин «таксан» также включает множество известных производных, включая как гидрофильные производные, так и гидрофобные производные. Производные таксана включают, но не ограничиваются перечисленными, производные галактозы и маннозы; пиперазино и производные пиперазино.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛА

25 [00172] Рассматриваемое антитело может быть получено любым известным способом, например, обычными синтетическими способами синтеза белка; методами рекомбинантной ДНК и т.д.

[00173] Если рассматриваемое антитело представляет собой одноцепочечный полипептид, оно может быть синтезировано с использованием стандартных методик
30 химического синтеза пептидов. Если полипептид химически синтезирован, синтез может проходить через жидкую фазу или твердую фазу. Твердофазный синтез полипептидов

(SPPS), при котором С-концевую аминокислоту последовательности присоединяют к нерастворимой подложке с последующим последовательным добавлением оставшихся аминокислот в последовательности, является примером подходящего способа химического синтеза рассматриваемого антитела. Для синтеза рассматриваемого антитела доступны различные формы SPPS, такие как Fmoc и Boc.

[00174] Для получения рассматриваемого антитела можно применять стандартные рекомбинантные способы. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепи, необязательно связанные с константными областями, вставляют в векторы экспрессии. Легкие и тяжелые цепи могут быть клонированы в одном и том же или различных векторах экспрессии. Сегменты ДНК, кодирующие цепи иммуноглобулина, функционально связаны с контрольными последовательностями в векторе(векторах) экспрессии, которые обеспечивают экспрессию полипептидов иммуноглобулина. Последовательности контроля экспрессии включают, но не ограничиваются перечисленными, промоторы (например, ассоциированные в природе или гетерологичные промоторы), сигнальные последовательности, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Последовательности контроля экспрессии могут представлять собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева (например, клетки COS или CHO). После включения вектора в соответствующего хозяина указанного хозяина поддерживают в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей с высокими уровнями, а также сбора и очистки антител.

[00175] Из-за вырожденности кода различные последовательности нуклеиновых кислот могут кодировать каждую аминокислотную последовательность иммуноглобулина. Целевые последовательности нуклеиновой кислоты могут быть получены с помощью *de novo* твердофазного синтеза ДНК или мутагенеза на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) ранее полученного варианта целевого полинуклеотида.

[00176] Подходящие векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры (например, устойчивость к ампициллину, устойчивость к гигромицину, устойчивость к тетрациклину,

устойчивость к канамицину или устойчивость к неомицину), позволяющие детектировать эти клетки, трансформированные целевыми последовательностями ДНК.

[00177] *Escherichia coli* является примером прокариотической клетки-хозяина, которую можно применять для клонирования полинуклеотида, кодирующего рассматриваемое антитело. Другие микробные хозяева, подходящие для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие *Enterobacteriaceae*, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Другие микробы, такие как дрожжи, также подходят для экспрессии. *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* являются примерами подходящих дрожжевых клеток-хозяев.

10 **[00178]** В дополнение к микроорганизмам клетки млекопитающих (например, клетки млекопитающих, выращенные в культуре клеток *in vitro*) также можно применять для экспрессии и получения полипептидов согласно настоящему изобретению (например, полинуклеотидов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты). Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают линии клеток СНО, различные линии клеток
15 Cos, клетки HeLa, линии клеток миеломы и трансформированные В-клетки или гибридомы. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер, и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов
20 транскрипции. Примерами подходящих последовательностей контроля экспрессии являются промоторы, полученные из генов иммуноглобулина, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота, цитомегаловируса и т. п.

[00179] После синтеза (химического или рекомбинантного) целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи или другие формы рассматриваемого антитела
25 (например, scFv и т. д.) могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, очистку методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), гель-электрофорез и т. п. (см. в общих чертах Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Рассматриваемое антитело может быть по
30 существу чистым, например, по меньшей мере от примерно 80% до 85% чистым, по меньшей мере от примерно 85% до 90% чистым, по меньшей мере от примерно 90% до

95% чистым или от 98% до 99% или более чистым, например, без загрязняющих веществ, таких как клеточный дебрис, макромолекулы, отличные от рассматриваемого антитела, и т.д.

КОМПОЗИЦИИ

5 **[00180]** Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая рассматриваемое антитело. Композиция рассматриваемого антитела может содержать, помимо рассматриваемого антитела, одно или более из: соли, например, NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ и т.д.; буферного агента, например, буфера Tris, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновой кислоты) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты
10 (MES), натриевой соли 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты (MOPS), N-трис[гидроксиметил] метил-3-аминопропансульфоновой кислоты (TAPS) и т. д.; солюбилизующего агента; детергента, например, неионогенного детергента, такого как Tween-20, и т. д.; ингибитора протеазы; глицерина; и тому подобного.

15 **Нуклеиновые кислоты**

[00181] Согласно настоящему изобретению предложены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие рассматриваемое антитело. Нуклеотидная последовательность, кодирующая рассматриваемое антитело, может быть функционально связана с одним или более регуляторными элементами, такими как
20 промотор и энхансер, которые обеспечивают экспрессию нуклеотидной последовательности в предполагаемых целевых клетках (например, клетке, которая генетически модифицирована для синтеза кодируемого антитела).

[00182] Подходящие промоторные и энхансерные элементы известны в данной области техники. Для экспрессии в бактериальной клетке подходящие промоторы
25 включают, но не ограничиваются перечисленными, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, лямбда P и trc. Для экспрессии в эукариотической клетке подходящие промоторы включают, но не ограничиваются перечисленными, промоторный и энхансерный элементы гена легкой и/или тяжелой цепи иммуноглобулина; немедленный ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40;
30 промотор, присутствующий в длинных концевых повторах ретровируса; промотор

мышинного металлотиюнеина-I; и различные тканеспецифические промоторы, известные в данной области техники.

[00183] Согласно некоторым вариантам реализации, например, для экспрессии в дрожжевой клетке, подходящий промотор представляет собой конститутивный промотор, такой как промотор ADH1, промотор PGK1, промотор ENO, промотор PУK1 и тому подобное; или регулируемый промотор, такой как промотор GAL1, промотор GAL10, промотор ADH2, промотор PНО5, промотор CUP1, промотор GAL7, промотор MET25, промотор MET3, промотор CYC1, промотор HIS3, промотор ADH1, промотор PGK, промотор GAPDH, промотор ADC1, промотор TRP1, промотор URA3, промотор LEU2, промотор ENO, промотор TP1 и AOX1 (например, для использования в *Pichia*). Выбор подходящего вектора и промотора находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники.

[00184] Промоторы, подходящие для применения в прокариотических клетках-хозяевах включают, но не ограничиваются перечисленными, промотор РНК-полимеразы бактериофага T7; промотор trp; промотор lac-оперона; гибридный промотор, например, гибридный промотор lac/tac, гибридный промотор tac/trc, промотор trp/lac, промотор T7/lac; промотор trc; промотор tac и т.п. Подходящие сильные промоторы для применения у прокариотов, таких как *Escherichia coli*, включают, но не ограничиваются перечисленными, T_{гс}, T_{ас}, T₅, T₇ и P_{Lambda}. Неограничивающие примеры операторов для применения в бактериальных клетках-хозяевах включают оператор промотора лактозы (белок-репрессор LacI изменяет конформацию при контакте с лактозой, что препятствует связыванию белка-репрессора LacI с оператором), оператор промотора триптофана (в комплексе с триптофаном белок-репрессор TrpR имеет конформацию, которая связывает оператор; в отсутствие триптофана белок-репрессор TrpR имеет конформацию, которая не связывается с оператором), и оператор промотора tac.

[00185] Нуклеотидная последовательность, кодирующая рассматриваемое антитело, может присутствовать в векторе экспрессии и/или векторе клонирования. Если рассматриваемое антитело содержит два отдельных полипептида, нуклеотидные последовательности, кодирующие два полипептида, могут быть клонированы в одном и том же или в разных векторах. Вектор экспрессии может включать селективный маркер,

точку начала репликации и другие характерные особенности, которые обеспечивают репликацию и/или поддержание вектора.

[00186] Специалистам в данной области техники известно большое количество подходящих векторов и промоторов; многие из которых коммерчески доступны для создания рассматриваемых рекомбинантных конструкций. Следующие векторы представлены в качестве примера. Бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, Упсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

Клетки

[00187] Согласно настоящему изобретению предложены выделенные генетически модифицированные клетки-хозяева (например, клетки *in vitro*), которые генетически модифицированы рассматриваемой нуклеиновой кислотой. Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемая выделенная генетически модифицированная клетка-хозяин может продуцировать рассматриваемое антитело.

[00188] Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и иммортализованные линии клеток. Подходящие линии клеток млекопитающих включают линии клеток человека, линии клеток приматов, отличных от человека, линии клеток грызунов (например, мыши, крысы) и т.п. Подходящие линии клеток млекопитающих включают, но не ограничиваются перечисленными, клетки HeLa (например, Американская коллекция типовых культур (ATCC) № CCL-2), клетки CHO (например, ATCC № CRL9618, CCL61, CRL9096), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC № CRL-1658), клетки Huh-7, клетки ВНК (например, ATCC № CCL10), клетки PC12 (ATCC № CRL1721), клетки COS, клетки COS-7 (ATCC № CRL1651), клетки RAT1, L-клетки мыши (ATCC № CCL1.3), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK) (ATCC № CRL1573), клетки HLHerG2 и т.п.

[00189] Подходящие дрожжевые клетки включают, но не ограничиваются перечисленными, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia*

guercuum, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*,
5 *Fusarium venenatum*, *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, и т.п.

[00190] Подходящие прокариотические клетки включают, но не ограничиваются перечисленными, любой из множества лабораторных штаммов *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, и т.п.

10 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[00191] Согласно настоящему изобретению предложены композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие рассматриваемое антитело. В целом, состав содержит эффективное количество рассматриваемого антитела. «Эффективное количество» означает дозировку, достаточную для получения желаемого результата,
15 например, уменьшения числа раковых клеток. В некоторых случаях желаемый результат представляет собой по меньшей мере уменьшение симптома злокачественного новообразования по сравнению с контролем.

Составы

[00192] В рассматриваемых способах рассматриваемое антитело можно вводить
20 хозяину с использованием любого удобного средства, способного привести к желаемому терапевтическому эффекту или диагностическому эффекту. Таким образом, агент может быть включен в различные составы для терапевтического введения. Более конкретно, рассматриваемое антитело может быть изготовлено в виде фармацевтических композиций путем комбинирования с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или
25 разбавителями и может быть изготовлено в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингалянты и аэрозоли.

[00193] В фармацевтических лекарственных формах рассматриваемое антитело можно вводить в форме его фармацевтически приемлемых солей, или его также можно
30 применять по отдельности или в соответствующей ассоциации, а также в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Следующие способы и

вспомогательные вещества являются исключительно примерными и никоим образом не ограничивающими.

[00194] В случае пероральных препаратов рассматриваемое антитело можно применять отдельно или в комбинации с подходящими добавками для изготовления 5 таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, 10 картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния; и, при необходимости, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и ароматизирующими агентами.

[00195] Рассматриваемое антитело может быть изготовлено в виде препаратов для инъекций путем его растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или 15 неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, при необходимости, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, стабилизаторы и консерванты.

[00196] Фармацевтические композиции, содержащие рассматриваемое антитело, получают путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с 20 необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами, стабилизаторами, поверхностно-активными веществами, буферами и/или агентами, регулирующими тоничность. Приемлемые носители, вспомогательные вещества 25 и/или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин и лимонную кислоту; консерванты (такие как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпарабены, хлорид 30 бензалкония или их комбинации); аминокислоты, такие как аргинин, глицин, орнитин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин,

аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин, пролин и их комбинации; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем примерно 10 остатков); белки, такие как желатин или сывороточный альбумин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, манноза, мальтоза, галактоза, фруктоза, сорбоза, рафиноза, глюкозамин, N-метилглюкозамин, галактозамин и нейраминная кислота; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Brij Pluronic, тритон-X или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00197] Фармацевтическая композиция может быть в жидкой форме, лиофилизированной форме или жидкой форме, восстановленной из лиофилизированной формы, причем указанный лиофилизированный препарат должен быть восстановлен стерильным раствором перед введением. Стандартная процедура восстановления лиофилизированной композиции заключается в добавлении обратно объема чистой воды (обычно эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации); однако растворы, содержащие антибактериальные агенты, могут быть использованы для получения фармацевтических композиций для парентерального введения.

[00198] Примерные концентрации антител в рассматриваемой фармацевтической композиции могут быть в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 50 мг/мл до примерно 200 мг/мл, или от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

[00199] Водный состав антитела может быть получен в pH-забуференном растворе, например, при pH в диапазоне от примерно 4,0 до примерно 7,0, или от примерно 5,0 до примерно 6,0, или, альтернативно, примерно 5,5. Примеры буферов, которые подходят для pH в этом диапазоне, включают буферы на основе фосфата, гистидина, цитрата, сукцината, ацетата и буферы на основе других органических кислот. Концентрация буфера может составлять от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ или от примерно 5 мМ до примерно 50 мМ, в зависимости, например, от буфера и желаемой тоничности состава.

[00200] Также может быть добавлен лиопротектор для защиты лабильного активного ингредиента (например, белка) от дестабилизирующих условий во время процесса лиофилизации. Например, известные лиопротекторы включают сахара (включая глюкозу и сахарозу); полиолы (включая маннит, сорбит и глицерин); и аминокислоты

(включая аланин, глицин и глутаминовую кислоту). Лиопротекторы могут быть включены в количестве от примерно 10 нМ до 500 нМ.

[00201] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемый состав включает рассматриваемое антитело и один или более агентов (например, поверхностно-активное вещество, буфер, стабилизатор, агент, регулирующий тоничность) и по существу не содержит одного или более консервантов, таких как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропилпарабены, хлорид бензалкония и их комбинации. Согласно другим вариантам реализации в состав включен консервант, например, в концентрациях в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 2% (масс./об.).

[00202] Например, рассматриваемый состав может представлять собой жидкий или лиофилизированный состав, подходящий для парентерального введения, и может содержать: от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл рассматриваемого антитела; от примерно 0,001% до примерно 1% по меньшей мере одного поверхностно-активного вещества; от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ буфера; необязательно от примерно 10 мМ до примерно 500 мМ стабилизатора; и от примерно 5 мМ до примерно 305 мМ агента, регулирующего тоничность; и имеет рН от примерно 4,0 до примерно 7,0.

[00203] В качестве другого примера, рассматриваемый парентеральный состав представляет собой жидкий или лиофилизированный состав, содержащий: от примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл рассматриваемого антитела; 0,04% Tween 20 мас./об.; 20 мМ L-гистидина; и 250 мМ сахарозы; и имеет рН 5,5.

[00204] Термин «единичная лекарственная форма» в контексте настоящей заявки относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для человека и животных-субъектов, причем каждая единица содержит предварительно определенное количество соединений согласно настоящему изобретению, рассчитанное в количестве, достаточном для получения желаемого эффекта, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Спецификации для рассматриваемого антитела могут зависеть от конкретного применяемого антитела и эффекта, которого необходимо достичь, а также фармакодинамики, связанной с каждым антителом в организме хозяина.

[00205] Рассматриваемое антитело можно вводить в виде инъекционного состава. Как правило, инъекционные композиции получают в виде водных растворов или

суспензий; также можно получить твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в водных наполнителях перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован или может представлять собой антитело, инкапсулированное в липосомные носители.

- 5 **[00206]** Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители, легко доступны для общественности. Кроме того, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как регулирующие рН и буферные агенты, регулирующие тоничность агенты, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п., легко доступны для общественности.
- 10 **[00207]** Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело изготовлено в виде состава с контролируемым высвобождением. Препараты с замедленным высвобождением могут быть получены с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матриксы из твердых гидрофобных
- 15 полимеров, содержащих антитело, в которых матриксы находятся в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриксов с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, гидрогели, полилактиды, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты и поли-D-(-)-3-
- 20 гидроксимасляную кислоту. Возможная потеря биологической активности и возможные изменения иммуногенности антител, содержащихся в препаратах с замедленным высвобождением, могут быть предотвращены за счет использования соответствующих добавок, за счет контроля содержания влаги и за счет разработки специфических композиций полимерных матриксов.
- 25 **[00208]** Физические системы включают, но не ограничиваются перечисленными, резервуарные системы с регулирующими скорость мембранами, например, микроинкапсуляция, макроинкапсуляция и мембранные системы; резервуарные системы без регулирующей скорости мембран, такие как полые волокна, ультрамикропористый триацетат целлюлозы и пористые полимерные субстраты и пены; монолитные системы,
- 30 включая те системы, которые физически растворены в непористых, полимерных или эластомерных матриксах (например, неэродируемые, эродируемые, проникновение агента

окружающей среды и разлагаемые), и материалы, физически диспергированные в непористых, полимерных или эластомерных матриксах (например, неэродируемые, эродируемые, проникновение агента окружающей среды и разлагаемые); слоистые структуры, включая резервуарные слои, химически сходные или отличные от внешних контрольных слоев; и другие физические способы, такие как осмотические насосы или адсорбция на ионообменных смолах.

[00209] Химические системы включают, но не ограничиваются перечисленными, химическую эрозию полимерных матриксов (например, гетерогенную или гомогенную эрозию) или биологическую эрозию полимерного матрикса (например, гетерогенную или гомогенную).

Дозировки

[00210] Подходящая дозировка может быть определена лечащим врачом или другим квалифицированным медицинским персоналом на основе различных клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, в том числе комплекции пациента, площади поверхности тела, возраста, конкретного соединения, которое подлежит введению, пола пациента, времени и пути введения, общего состояния здоровья и одновременного введения других лекарственных средств. Рассматриваемое антитело может быть введено в количествах от 1 нг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела на дозу, например, от 0,1 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела, например, от 0,5 мг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела; однако предусмотрены дозы ниже или выше этого примерного диапазона, в частности, с учетом упомянутых выше факторов. Если режим представляет собой непрерывную инфузию, она также может быть в диапазоне от 1 мкг до 10 мг на килограмм массы тела в минуту.

[00211] Специалисты в данной области техники легко поймут, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от конкретного антитела, тяжести симптомов и восприимчивости субъекта к побочным эффектам. Предпочтительные дозировки для данного соединения легко определяются специалистами в данной области техники различными средствами.

Пути введения

- [00212] Рассматриваемое антитело вводят индивидууму с использованием любого доступного способа и пути, подходящего для доставки лекарственного средства, включая способы *in vivo* и *ex vivo*, а также системные и локализованные пути введения.
- 5 [00213] Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают интраназальный, внутримышечный, внутритрахеальный, подкожный, внутрикожный, местное применение, внутривенный, внутриартериальный, ректальный, назальный, пероральный и другие энтеральные и парентеральные пути введения. Пути введения могут быть скомбинированы, при необходимости, или скорректированы в зависимости от
- 10 антитела и/или желаемого эффекта. Композицию рассматриваемого антитела можно вводить в виде однократной дозы или в виде нескольких доз. Согласно некоторым вариантам реализации композицию рассматриваемого антитела вводят перорально. Согласно некоторым вариантам реализации композицию рассматриваемого антитела вводят ингаляционным путем. Согласно некоторым вариантам реализации композицию
- 15 рассматриваемого антитела вводят интраназально. Согласно некоторым вариантам реализации композицию рассматриваемого антитела вводят локально. Согласно некоторым вариантам реализации композицию рассматриваемого антитела вводят интракраниально. Согласно некоторым вариантам реализации композицию рассматриваемого антитела вводят внутривенно.
- 20 [00214] Агент может быть введен хозяину с использованием любых доступных обычных способов и путей, подходящих для доставки обычных лекарственных средств, включая системные или локализованные пути. В целом, пути введения, предусмотренные настоящим изобретением, включают, но не обязательно ограничиваются ими, энтеральные, парентеральные или ингаляционные пути.
- 25 [00215] Парентеральные пути введения, отличные от ингаляционного введения, включают, но не обязательно ограничиваются ими, местный, трансдермальный, подкожный, внутримышечный, внутриорбитальный, внутрикапсульный, внутриспинальный, внутригрудинный, внутрипеченочный и внутривенный пути, т.е. любой путь введения, отличный от введения через пищеварительный канал.
- 30 Парентеральное введение можно выполнять для осуществления системной или локальной доставки рассматриваемого антитела. Там, где желательна системная доставка, введение

обычно включает инвазивное или системно всасываемое местное или мукозальное введение фармацевтических препаратов.

[00216] Рассматриваемое антитело также можно доставить субъекту путем энтерального введения. Энтеральные пути введения включают, но не обязательно ограничиваются ими, пероральную и ректальную (например, с использованием суппозитория) доставку.

[00217] Под лечением подразумевается по меньшей мере облегчение симптомов, связанных с патологическим состоянием, поражающим хозяина, при этом облегчение используется в широком смысле для обозначения по меньшей мере уменьшения величины параметра, например, симптома, связанного с патологическим состоянием, которое лечат, таким как рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак легких. Таким образом, лечение также включает ситуации, при которых патологическое состояние или по меньшей мере связанные с ним симптомы полностью ингибируются, например, предотвращается их развитие или останавливаются, например, прекращаются, так что хозяин больше не страдает от патологического состояния или по меньшей мере от симптомов, которые характеризуют патологическое состояние.

[00218] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело вводят путем инъекции, например, для системной доставки (например, внутривенной инфузии) или в локальный очаг.

[00219] Различные хозяева (причем термин «хозяин» используется в настоящей заявке взаимозаменяемо с терминами «субъект», «индивидуум» и «пациент») поддаются лечению в соответствии с рассматриваемыми способами. Обычно такие хозяева представляют собой «млекопитающих» или «относящихся к млекопитающим», при этом эти термины широко используются для описания организмов, которые относятся к классу млекопитающих, включая отряды хищников (например, собак и кошек), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс) и приматов (например, человека, шимпанзе и обезьян). Согласно некоторым вариантам реализации хозяева представляют собой людей.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[00220] Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения заболевания или расстройства, связанного с MUC1-положительной клеткой или

вызванного ей, например, раковой MUC1-положительной клеткой или аутореактивной MUC1-положительной клеткой.

Лечение злокачественных новообразований

[00221] Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения
5 злокачественного новообразования, включая солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, причем указанные способы обычно включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом (например, индивидууму, имеющему
10 злокачественное новообразование), эффективного количества рассматриваемого антитела по отдельности (например, в виде монотерапии) или в комбинации (например, в виде комбинированной терапии) с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

[00222] Злокачественные новообразования включают, например, ГЦК, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, множественную миелому, хронический лимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, рак
15 анального канала, рак аппендикса, рак желчного протока (т.е. холангиокарциному), рак мочевого пузыря, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак без выявленного первичного очага (CUP), рак пищевода, рак глаз, рак фаллопиевых труб, гастроэнтерологический рак, рак почек, рак печени, рак легких, медуллобластому, меланому, рак полости рта, рак яичников, рак поджелудочной железы,
20 паразитовидное заболевание, рак полового члена, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак горла, рак щитовидной железы, рак матки, рак влагалища, рак вульвы и тому подобное.

[00223] Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество рассматриваемого антитела представляет собой количество, которое при введении по
25 отдельности (например, в виде монотерапии) или в комбинации (например, в виде комбинированной терапии) с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в одной или более дозах, эффективно уменьшает число раковых клеток у индивидуума по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере
30 примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере

примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или более по сравнению с числом раковых клеток у индивидуума в отсутствие лечения антителом.

Комбинированная терапия

- 5 [00224] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемый способ лечения злокачественного новообразования включает введение рассматриваемого антитела и одного или более дополнительных терапевтических агентов. Подходящие дополнительные терапевтические агенты включают, но не ограничиваются
- 10 перечисленными противораковый химиотерапевтический агент (как описано выше).

СУБЪЕКТЫ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ

- [00225] Различные субъекты подходят для лечения рассматриваемым способом. Подходящие субъекты включают любого индивидуума, например, человека, у которого имеется злокачественное новообразование; которому был поставлен диагноз
- 15 злокачественного новообразования; который имел злокачественное новообразование и подвержен риску рецидива злокачественного новообразования; которого лечили от злокачественного новообразования агентом, отличным от рассматриваемого антитела к MUC1 (например, которого лечили противораковым химиотерапевтическим агентом), и который не ответил на агент; или которого лечили от злокачественного новообразования
- 20 агентом, отличным от рассматриваемого антитела к MUC1 (например, которого лечили противораковым химиотерапевтическим агентом), и который первоначально ответил на агент, но впоследствии прекратил отвечать (например, развился рецидив).

СПОСОБЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

- 25 [00226] Согласно настоящему изобретению предложены различные способы детектирования, которые включают применение рассматриваемого антитела. Способы детектирования включают диагностические способы, прогностические способы и мониторинговые способы. Рассматриваемый способ детектирования обычно включает детектирование MUC1-положительных клеток, например, раковых клеток.

[00227] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемый способ представляет собой диагностический способ, например, для определения того, имеет ли индивидум злокачественное новообразование.

5 **[00228]** Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемый способ представляет собой мониторинговый способ, например, у индивидума, у которого диагностировано наличие злокачественного новообразования и которого лечат от расстройства, проводят мониторинг ответа на лечение и/или прогрессирования/регрессии расстройства.

10 **[00229]** В некоторых случаях рассматриваемый способ детектирования включает введение индивидуму помеченного с возможностью детектирования антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению; и детектирование связывания антитела с тканями у индивидума. Детектирование можно осуществлять, например, путем магнитно-резонансной томографии или другой подходящей методики визуализации.

15 **[00230]** В других случаях рассматриваемый способ детектирования включает приведение помеченного с возможностью детектирования антитела к MUC1 согласно настоящему изобретению в контакт с биологическим образцом, полученным от индивидума; и детектирование связывания антитела с молекулами в биологическом образце.

20 **[00231]** Антитело к MUC1 может быть помечено непосредственно или опосредовано. Непрямые метки включают вторичное антитело, которое содержит детектируемую метку, причем указанное вторичное антитело связывает рассматриваемое антитело к MUC1. Другие непрямые метки включают биотин, причем биотинилированное антитело к MUC1 можно детектировать с использованием авидина или стрептавидина, который содержит детектируемую метку.

25 **[00232]** Подходящие детектируемые метки включают любую композицию, детектируемую спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими средствами. Подходящие метки включают, но не ограничиваются перечисленными, магнитные гранулы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, изотиоцианат
30 флуоресцеина, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и подобные им), радиоактивные

метки (например, H^3 , I^{125} , S^{35} , C^{14} или P^{32}), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазу и другие, обычно используемые в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА)) и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветные стеклянные или пластиковые гранулы (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т. д.).

[00233] Согласно некоторым вариантам реализации рассматриваемое антитело содержит контрастный агент или радиоизотоп, причем указанный контрастный агент или радиоизотоп представляет собой тот, который подходит для применения при визуализации, например, процедурах визуализации, проводимых на людях.

10 Неограничивающие примеры меток включают радиоизотоп, такой как I^{1231} (йод), F^{18} (фтор), Tc^{99} (технеций), In^{111} (индий) и Ga^{67} (галлий), и контрастный агент, такой как гадолиний (Gd), диспрозий и железо. Радиоактивные изотопы Gd (Gd^{153}) также доступны и пригодны для процедур визуализации у млекопитающих, отличных от человека. Антитело может быть мечено с использованием стандартных методик. Например, 15 рассматриваемое антитело может быть йодировано с использованием хлорамина T или 1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дефенилгликоурила. Рассматриваемое антитело также может быть помечено контрастным агентом посредством стандартных методик. Например, рассматриваемое антитело может быть помечено Gd путем конъюгации 20 низкомолекулярных хелатов Gd, таких как Gd диэтилентриаминпентауксусная кислота (GdDTPA) или Gd тетраазациклодекантетрауксусная кислота (GdDOTA) с антителом. Рассматриваемое антитело может быть помечено Gd, например, путем конъюгирования хелатов полилизин-Gd с антителом. В качестве альтернативы, рассматриваемое антитело может быть помечено Gd путем инкубации парамагнитных полимеризованных липосом, 25 которые включают хелатирующий Gd липид, с авидином и биотинилированным антителом.

[00234] Подходящие флуоресцентные белки, которые могут быть связаны с рассматриваемым антителом, включают, но не ограничиваются перечисленными, зеленый флуоресцентный белок из *Aequoria victoria* или его мутант или производное, улучшенный GFP, многие такие GFP, которые доступны коммерчески, например, от Clontech, Inc.; 30 красный флуоресцентный белок; желтый флуоресцентный белок; любой из множества флуоресцентных и окрашенных белков из видов Anthozoan; и тому подобное.

Примеры неограничивающих аспектов настоящего изобретения

[00235] Аспекты, включая варианты реализации, настоящего объекта изобретения, описанные выше, могут быть полезными по отдельности или в комбинации с одним или более другими аспектами или вариантами реализации. Ниже представлены некоторые неограничивающие аспекты настоящего раскрытия, пронумерованные 1-50, не ограничивающие приведенное выше описание. Как будет понятно специалистам в данной области техники при прочтении данного раскрытия, каждый из отдельно пронумерованных аспектов можно применять или комбинировать с любым из предшествующих или следующих индивидуально пронумерованных аспектов. Это предназначено для поддержания всех таких комбинаций аспектов и не ограничивается комбинациями аспектов, в явной форме изложенными ниже:

1. Антитело, которое специфично связывается с муцином-1 (MUC-1) и конкурирует за связывание с MUC-1 со вторым антителом, содержащее:

вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1-3) цепи VH, имеющую последовательность:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKQRPKGKLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLR
YALDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1); и

вариабельную легкую цепь (VL), содержащую CDR1-3 легкой цепи (LCDR1-3) цепи VL, имеющую последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIYGT
SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:2);

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQQKPGQAPRLWIYRS
TKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYRWSPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:3); или

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIIGTS
NLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:4).

2. Антитело, которое специфично связывается с муцином-1 (MUC-1), характеризующееся тем, что указанное антитело содержит:

вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1-3) цепи VH, имеющую последовательность:

5 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKQRPKGKLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLR
YALDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1); и

вариабельную легкую цепь (VL), содержащую CDR1-3 легкой цепи (LCDR1-3) цепи VL, имеющую последовательность:

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIYG
TSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLE
IK (SEQ ID NO:2);

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQQKPGQAPRLWIYR
STKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYRWSPPPTFGQGTKLEI
15 K (SEQ ID NO:3); или

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIIGT
SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:4).

20 3. Антитело по аспекту 1 или аспекту 2, характеризующееся тем, что указанный полипептид VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:1.

25 4. Антитело по любому из аспектов 1-3, характеризующееся тем, что указанный полипептид VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:2, 3 или 4.

30 5. Антитело по любому из аспектов 1-3, характеризующееся тем, что:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18);

5 HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID NO:9);

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVG/SSSYLY (SEQ ID NO:41);

10 LCDR2 содержит аминокислотную последовательность G/RT/SS/TN/KLAS (SEQ ID NO:42); и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYA/R/SWSPPT (SEQ ID NO:43) согласно определению Kabat; или

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:10);

15 LCDR2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO:11); и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYAWSPPT (SEQ ID NO:12) согласно определению Kabat.

20 6. Антитело по любому из аспектов 1-3, характеризующееся тем, что:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18);

25 HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID NO:9);

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSVGSSNLY (SEQ ID NO:13);

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность RSTKLAS (SEQ ID NO:14);

и

30 LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYRWSPPPT (SEQ ID NO:15) согласно определению Kabat.

7. Антитело по любому из аспектов 1-3, характеризующееся тем, что:
HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG
5 (SEQ ID NO:18);
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID
NO:9);
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVSSSYLY (SEQ ID
NO:10);
10 LCDR2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO:11);
и
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYSWSPPT (SEQ ID
NO:16) согласно определению Kabat.
- 15 8. Антитело по любому из аспектов 1-7, характеризующееся тем, что
указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
9. Антитело по любому из аспектов 1-8, характеризующееся тем, что
указанное антитело представляет собой химерное антитело.
- 20 10. Антитело по любому из аспектов 1-9, характеризующееся тем, что
указанное антитело выбрано из группы, состоящей из: IgG, Fv, одноцепочечного антитела,
scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'.
- 25 11. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что
указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с MUC1.
12. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что
указанное антитело представляет собой IgG.
- 30 13. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что
указанное антитело представляет собой IgG1.

14. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой Fab.
- 5 15. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело.
16. Антитело по любому из аспектов 1-10, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой scFv.
- 10 17. Антитело по любому из аспектов 1-16, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает MUC1, и причем указанный первый антигенсвязывающий домен содержит цепь VH и цепь VL по любому из аспектов
- 15 1-7.
18. Антитело по любому из аспектов 1-17, характеризующееся тем, что указанное антитело помечено с возможностью детектирования.
- 20 19. Антитело по любому из аспектов 1-18, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный непептидный синтетический полимер.
- 25 20. Антитело по аспекту 19, характеризующееся тем, что указанный синтетический полимер представляет собой полимер полиэтиленгликоля.
21. Антитело по любому из аспектов 1-19, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный фрагмент липида или жирной кислоты.
- 30 22. Антитело по любому из аспектов 1-18, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный фрагмент полисахарида или углевода.

23. Антитело по любому из аспектов 1-22, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит контрастный агент.
24. Антитело по любому из аспектов 1-23, характеризующееся тем, что
5 указанное антитело содержит аффинный домен.
25. Антитело по любому из аспектов 1-24, характеризующееся тем, что указанное антитело иммобилизовано на твердой подложке.
- 10 26. Антитело по любому из аспектов 1-25, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный цитотоксин.
27. Антитело по любому из аспектов 1-26, характеризующееся тем, что
15 указанное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области, содержащую аминокислотную последовательность сульфатазного мотива.
28. Антитело по любому из аспектов 1-26, характеризующееся тем, что
20 указанное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области, содержащую аминокислотную последовательность сульфатазного мотива, и причем указанный сульфатазный мотив модифицирован, чтобы содержать фрагмент 2-формилглицина (fGly).
29. Антитело по аспекту 28, характеризующееся тем, что указанное антитело
25 содержит гетерологичный фрагмент, ковалентно связанный с указанным антителом за счет фрагмента fGly.
30. Антитело по аспекту 29, характеризующееся тем, что указанный
гетерологичный фрагмент выбран из лекарственного средства, токсина, детектируемой метки, водорастворимого полимера и синтетического пептида.
- 30 31. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную тяжелую (VH) цепь, переменную легкую цепь (VL) или обе указанные цепи антитела по любому из аспектов 1-17.

32. Нуклеиновая кислота по аспекту 31, характеризующаяся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело, и причем указанная нуклеиновая кислота кодирует указанное одноцепочечное антитело.
- 5 33. Нуклеиновая кислота по аспекту 32, характеризующаяся тем, что указанное одноцепочечное антитело представляет собой scFv.
34. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из аспектов 31-33, характеризующийся тем, что указанная нуклеиновая кислота функционально связана с транскрипционным контрольным элементом, активным в 10 эукариотической клетке.
35. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из аспектов 31-33 или вектор экспрессии по аспекту 34.
- 15 36. Клетка по аспекту 35, характеризующаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота кодирует указанную цепь VH антитела и указанный полипептид VL антитела.
37. Клетка по аспекту 36, характеризующаяся тем, что указанное антитело 20 представляет собой одноцепочечное антитело, и причем указанная нуклеиновая кислота кодирует указанное одноцепочечное антитело.
38. Клетка по аспекту 37, характеризующаяся тем, что указанное одноцепочечное антитело представляет собой scFv.
- 25 39. Клетка, содержащая:
первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную тяжелую (VH) цепь антитела по любому из аспектов 1-17; и
вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную легкую (VL) цепь 30 указанного антитела.

40. Клетка по аспекту 39, содержащая:
первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту;
и
второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту.
- 5
41. Конъюгат, содержащий:
антитело по любому из аспектов 1-17; и
агент, конъюгированный с указанным антителом.
- 10
42. Конъюгат по аспекту 41, характеризующийся тем, что указанный агент выбран из группы, состоящей из: фрагмента, продлевающего период полувыведения, агента для мечения и терапевтического агента.
43. Слитый белок, содержащий:
вариабельную тяжелую (VH) цепь, вариабельную легкую (VL) цепь или обе
указанные цепи антитела по любому из аспектов 1-17; слитый с
гетерологичной аминокислотной последовательностью.
- 15
44. Фармацевтическая композиция, содержащая:
а) антитело по любому из аспектов 1-17; и
б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 20
45. Фармацевтическая композиция, содержащая:
а) конъюгат по любому из аспектов 41-42; и
б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 25
46. Фармацевтическая композиция, содержащая:
а) слитый белок по аспекту 43; и
б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 30
47. Фармацевтическая композиция по любому из аспектов 44-46, дополнительно содержащая активатор Т-клеток.

48. Фармацевтическая композиция по аспекту 47, характеризующаяся тем, что указанный активатор Т-клеток выбран из группы, состоящей из: ингибитора иммунной контрольной точки, цитокина и антагониста ингибирующего иммунного рецептора.

5

49. Фармацевтическая композиция по любому из аспектов 44-48, характеризующаяся тем, что указанное антитело инкапсулировано в липосому.

50. Способ лечения клеточного пролиферативного расстройства у субъекта, отличающийся тем, что указанный способ включает:

10

введение субъекту, имеющему клеточное пролиферативное расстройство, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из аспектов 44-49.

15

ПРИМЕРЫ

[00236] Следующие примеры приведены для того чтобы предоставить обычным специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять настоящее изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают созданным ими изобретением, они также не предназначены для демонстрации того, что приведенные ниже эксперименты представляют собой все или единственные выполненные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного. Могут использоваться стандартные сокращения, например, п.о., пара (ы) оснований; тыс.п.о., тысяча (тысяч) пар оснований; пл, пиколитр (ы); с или сек., секунда (секунды); мин, минута (минуты); ч или час, час (часы); амк., аминокислота (ы); тыс.п.о., тысяча (тысяч) пар оснований; п.о., пара (ы) оснований; нт., нуклеотид (ы); в/м, внутримышечный (внутримышечно); в/б, внутрибрюшинный (внутрибрюшинно); п/к, подкожный (подкожно); и тому подобное.

20

25

30

Коммерчески доступные реагенты, упомянутые в примерах, использовали в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное. Источником клеток, указанных в Примерах и по всему тексту описания по номерам доступа ЕСАСС, является Европейская коллекция клеточных культур (ЕСАСС), Солсбери, Англия. Если не указано иное, все 5 технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Примерные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в 10 настоящей заявке, также можно применять при практической реализации или тестировании настоящего изобретения. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕР 1: МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К MUC1

Материалы и методы

[00237] ЭХ ВЭЖХ: Для определения агрегации образцы анализировали с использованием аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC; Tosoh, № по 15 каталогу 08541) с подвижной фазой 300 мМ NaCl, 25 мМ фосфата натрия, pH 6,8.

[00238] ИФА MUC1: Антигены наносили в виде покрытия непосредственно на 96-луночный планшет со стрептавидином (Pierce, 15500) или Maxisorp (VWR, 62409-024) при 100 нг/лунку в ФСБ. Покрытые планшеты инкубировали при 4°C в течение 20 ночи. Планшеты блокировали буфером для блокирования с казеином (Thermo Fisher, 37528) и промывали ФСБ-Tween-20. Антитела последовательно разбавляли в ФСБ, добавляли в покрытые лунки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Чтобы проверить липкость, антитела также добавляли в непокрытые, 25 заблокированные лунки. Для детектирования использовали вторичное антитело к Fc, конъюгированное с пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson Immunoresearch, № по каталогу 109-035-098), затем субстрат TMR (Thermo Fisher, 34028) и гашение H₂SO₄. Поглощение измеряли при 450 нм на устройстве для считывания планшетов Molecular Devices.

[00239] Анализ методом проточной цитометрии: Линии клеток собирали с помощью Versene, переносили в ФСБ с 2% ФБС (ФСБ/ФБС) и охлаждали. Клетки 30 инкубировали в течение 20-30 минут на льду с указанными антителами (1 мкг/тест). После однократной промывки ФСБ/ФБС добавляли конъюгированное с AlexaFluor488 антитело

к IgG-Fc человека и краситель 7-AAD (использованный для исключения мертвых клеток), и клетки инкубировали на льду в течение 20 минут. Образцы промывали 2 раза ФСБ/ФБС с последующим анализом методом проточной цитометрии на приборе FACS Canto™ под управлением программного обеспечения FACSDiva™. Анализ выполняли путем

5 исключения дублетов и мертвых клеток и гейтинга на популяции клеток FSC/SSC. Для каждого антитела определяли среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (gMFI) канала AlexaFluor488. Все образцы анализировали с тремя повторами. Контроли включали MUC1-отрицательную линию клеток (HCT-116), клетки, меченные только вторичным антителом, и неокрашенные клетки.

- 10 **[00240]** *Дифференциальная сканирующая флуориметрия.* Антитело (10 мкл при 1 мг/мл) использовали для измерения температуры плавления белка с использованием набора для термического сдвига белка (Applied Biosystems). Антитело смешивали с 5 мкл буфера и 2,5 мкл 8X флуоресцентного красителя для реакции в объеме 20 мкл. Для
- 15 создания кривой плавления использовали устройство для ПЦР в реальном времени QuantStudio3 (Applied Biosystems). Условия включали: 25°C выдерживали в течение 2 мин с последующим повышением температуры на 0,05°C/с до 99°C с последующим выдерживанием в течение 2 мин при 99°C. Исходные данные анализировали с помощью программного обеспечения Protein Thermal Shift (Applied Biosystems).

Результаты

- 20 **[00241]** Получали три моноклональных антитела к MUC1, MUC1 gB06, MUC1 G12 и MUC1 H02. Три антитела имеют одну и ту же последовательность тяжелой цепи и имеют разные последовательности легкой цепи.

- [00242]** Показана последовательность варибельной области тяжелой цепи с каркасными участками (подчеркнуты) и HCDR (выделены жирным шрифтом),
- 25 разграниченными на основании определения Chothia, определения Kabat и определения IMGT:

[00243] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDHTMHWIKQRPGKGLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLRALD
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) (определение Chothia)

[00244] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKORPGKGLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDAVYYCARGLRYALD
YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1) (определение Kabat)

5 [00245] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWIKORPGKGLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDAVYYCARGLRYALD
YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1) (определение IMGT)

[00246] Показана последовательность вариабельной области легкой цепи с
каркасными участками (подчеркнуты) и LCDR (выделены жирным шрифтом),
разграниченными на основании определения Chothia, определения Kabat и определения
10 IMGT:

[00247] gB06, VL:

[00248] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQOKPGQAPRLWIYG
TSNLAGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:2) (определение Chothia и Kabat)

15 [00249] G12, VL:

[00250] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQOKPGQAPRLWIY
RSTKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDAAVYYCHQYRWSPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:3) (определение Chothia и Kabat)

[00251] H02, VL:

20 [00252] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQOKPGQAPRLWIIG
TSNLAGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:4) (определение Chothia и Kabat)

[00253] gB06, VL:

25 [00254] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQOKPGQAPRLWIYG
TSNLAGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:2) (определение IMGT)

[00255] G12, VL:

[00256] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQOKPGQAPRLWIYR
STKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDAAVYYCHQYRWSPTFGQGTKLEIK
30 (SEQ ID NO:3) (определение IMGT)

[00257] H02, VL:

[00258] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQOKPGQAPRLWIIG
TSNLAGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:4) (определение IMGT)

[00259] На фиг. 1 показано, что моноклональные антитела к MUC1, MUC1 gB06,
5 MUC1 G12 и MUC1 H02, являются мономерными более чем на 99%, более чем на 99% и
более чем на 98%, соответственно, как определено с помощью эксклюзионной
хроматографии (ЭХ).

[00260] На фиг. 2А-2С показано, что моноклональные антитела к MUC1, MUC1
gB06, MUC1 G12 и MUC1 H02, связываются с рекомбинантным 20-членным
10 гликозилированным MUC1-биотином, но не с рекомбинантным 60-членным
негликозилированным MUC1-биотином или с пептидом-ловушкой, согласно оценке с
помощью ИФА. 20-членный гликозилированный MUC1-биотин относится к пептиду,
содержащему последовательность VTSAPDTRPAPGSTAPPANG (SEQ ID NO:26) с
модификациями антигеном Tn (GalNac) или антигеном сиалил-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNac) на
15 некоторых остатках S/T, в котором биотин конъюгирован с N-концом. 60-членный
негликозилированный MUC1-биотин относится к пептиду, содержащему
последовательность

VTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANG
(SEQ ID NO:27), в котором биотин конъюгирован с N-концом. Пептид-ловушка относится
20 к пептиду, содержащему последовательность PLPVTSTSSASTGHATPLAV (SEQ ID
NO:28), с модификациями антигеном Tn (GalNac) или антигеном сиалил-Tn (Neu5Ac α 2-
6GalNac) на некоторых остатках S/T.

[00261] На фиг. 3А-3В показан уровень связывания антител к MUC1, MUC1 gB06,
MUC1 G12 и MUC1 H02, с непокрытым планшетом со стрептавидином или планшетом
25 Maxisorp.

[00262] На фиг. 4 показаны наложенные гистограммы, показывающие связывание
указанных антител с указанными линиями клеток, протестированное с тремя повторами.

[00263] На фиг. 5 показаны гистограммы с разнесением, показывающие связывание
указанных антител с указанными линиями клеток.

[00264] На фиг. 6 показана температура плавления областей CH2 и Fab антител к MUC1 B06, G12 и H02, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии.

5 **ПРИМЕР 2: ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К MUC1 *IN VIVO***

Исследования ксенотрансплантатов

[00265] *Методы:* Самкам мышей NCG (10/группу) имплантировали гранулы эстрогена (0,36 мг/90 дней, 17 β -эстрадиол), а затем инокулировали подкожно 20 миллионов клеток T47D в ФСБ с Matrigel (1:1 об./об.). В день, предшествующий началу

10 лечения (день 0), все животные получали внутривенную дозу 10 мг/кг IgG человека.

[00266] Лечение начали, когда опухоли достигли среднего значения 223 мм³ (День 1). Для лечения животным вводили внутривенно только наполнитель или антитело B06. Введение средства лечения происходило еженедельно для получения в общей сложности 4 доз. У животных дважды в неделю контролировали массу тела и размер опухоли.

15 Животных умерщвляли, когда опухоли достигали 2000 мм³.

[00267] *Результаты:* Опухоли в контрольной группе, получавшей наполнитель, росли медленно, но последовательно на протяжении всего исследования. У животных, которым вводили 10 мг/кг антитела B06, рост опухоли остановился.

[00268] На фиг. 7 показана *in vivo* эффективность антитела к MUC1 B06 против

20 ксенотрансплантата T47D. n = 10 мышей/группу; стрелки указывают дни, в которые вводили антитело или наполнитель.

[00269] Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты реализации, специалистам в данной области техники следует понимать, что

25 могут быть сделаны различные изменения, и эквиваленты могут быть заменены без отклонения от истинной сущности и объема настоящего изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, смеси химически связанных веществ, способа, стадии или стадий способа к задаче, сущности и

30 объема настоящего изобретения. Все такие модификации предусмотрены, как включенные в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфично связывается с муцином-1 (MUC-1), содержащее:

вариабельную тяжелую цепь (VH), содержащую CDR1-3 тяжелой цепи (HCDR1-3) цепи VH, имеющую последовательность:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTDHTMHWIKQRPKGKLEWM
GYFYPRDDSTNYNEKFKGRVTLTADKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLR
YALDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1); и

вариабельную легкую цепь (VL), содержащую CDR1-3 легкой цепи (LCDR1-3) цепи VL, имеющую последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIYG
TSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYAWSPPTFGQGTKLE
IK (SEQ ID NO:2);

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGSSNLYWYQQKPGQAPRLWIYR
STKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYRWSPPPTFGQGTKLEI
K (SEQ ID NO:3); или

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSSYLYWYQQKPGQAPRLWIIGT
SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCHQYSWSPPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:4).

2. Антитело по п. 1, характеризующееся тем, что указанная цепь VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:1.

3. Антитело по п. 2, характеризующееся тем, что указанная цепь VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO:2, 3 или 4.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18);

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID NO:9);

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:10);

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO:11); и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYAWSPPT (SEQ ID NO:12) согласно определению Kabat.

5. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18);

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID NO:9);

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVGSSNLY (SEQ ID NO:13);

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность RSTKLAS (SEQ ID NO:14); и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYRWSPPPT (SEQ ID NO:15) согласно определению Kabat.

6. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность DHTMH (SEQ ID NO:17);

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность YFYPRDDSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:18);

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность GLRYALDY (SEQ ID NO:9);

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASSSVSSSYLY (SEQ ID NO:10);

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность GTSNLAS (SEQ ID NO:11); и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность HQYSWSPPT (SEQ ID NO:16) согласно определению Kabat.

7. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело или химерное антитело.

8. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело выбрано из группы, состоящей из: IgG, Fv, одноцепочечного антитела, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab'.

9. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с MUC1.

10. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG, IgG1, Fab, одноцепочечное антитело, scFv или биспецифичное антитело.

11. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело помечено с возможностью детектирования.

12. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный непептидный синтетический полимер.

13. Антитело по п. 12, характеризующееся тем, что указанный синтетический полимер представляет собой полимер полиэтиленгликоля.

14. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный фрагмент липида или жирной кислоты.
15. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный фрагмент полисахарида или углевода.
16. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит контрастный агент.
17. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит аффинный домен.
18. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело иммобилизовано на твердой подложке.
19. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит ковалентно связанный цитотоксин.
20. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области, содержащую аминокислотную последовательность сульфатазного мотива.
21. Антитело по любому из пп. 1-3, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области, содержащую аминокислотную последовательность сульфатазного мотива, и причем указанный сульфатазный мотив модифицирован, чтобы содержать фрагмент 2-формилглицина (fGly).
22. Антитело по п. 21, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит гетерологичный фрагмент, ковалентно связанный с указанным антителом за счет фрагмента fGly.

23. Антитело по п. 22, характеризующееся тем, что указанный гетерологичный фрагмент выбран из лекарственного средства, токсина, детектируемой метки, водорастворимого полимера и синтетического пептида.

24. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную тяжелую (VH) цепь, переменную легкую цепь (VL) или обе указанные цепи антитела по любому из пп. 1-10.

25. Нуклеиновая кислота по п. 24, отличающаяся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело, и причем указанная нуклеиновая кислота кодирует одноцепочечное антитело.

26. Нуклеиновая кислота по п. 25, отличающаяся тем, что указанное одноцепочечное антитело представляет собой scFv.

27. Рекombинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 24-26, отличающийся тем, что указанная нуклеиновая кислота функционально связана с транскрипционным контрольным элементом, активным в эукариотической клетке.

28. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 24-26 или вектор экспрессии по п. 27.

29. Клетка по п. 28, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота кодирует указанную цепь VH антитела и указанную цепь VL антитела.

30. Клетка по п. 29, отличающаяся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело, и причем указанная нуклеиновая кислота кодирует указанное одноцепочечное антитело.

31. Клетка по п. 30, отличающаяся тем, что указанное одноцепочечное антитело представляет собой scFv.

32. Клетка, содержащая:
первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную тяжелую (VH) цепь антитела по любому из пп. 1-10; и
вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную легкую (VL) цепь указанного антитела.

33. Клетка по п. 32, содержащая:
первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту;
и
второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту.

34. Конъюгат, содержащий:
антитело по любому из пп. 1-10; и
агент, конъюгированный с указанным антителом.

35. Конъюгат по п. 34, отличающийся тем, что указанный агент выбран из группы, состоящей из: фрагмента, продлевающего период полувыведения, агента для мечения и терапевтического агента.

36. Слитый белок, содержащий:
переменную тяжелую (VH) цепь, переменную легкую (VL) цепь или обе указанные цепи антитела по любому из пп. 1-10; слитый с гетерологичной аминокислотной последовательностью.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая:
а) антитело по любому из пп. 1-10; и
б) фармацевтически приемлемый носитель.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая:
а) конъюгат по любому из пп. 34-35; и
б) фармацевтически приемлемый носитель.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а) слитый белок по п. 36; и
- б) фармацевтически приемлемый носитель.

40. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-39, дополнительно содержащая активатор Т-клеток.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, характеризующаяся тем, что указанный активатор Т-клеток выбран из группы, состоящей из: ингибитора иммунной контрольной точки, цитокина и антагониста ингибирующего иммунного рецептора.

42. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-41, отличающаяся тем, что указанное антитело инкапсулировано в липосому.

43. Способ лечения клеточного пролиферативного расстройства у субъекта, отличающийся тем, что указанный способ включает:

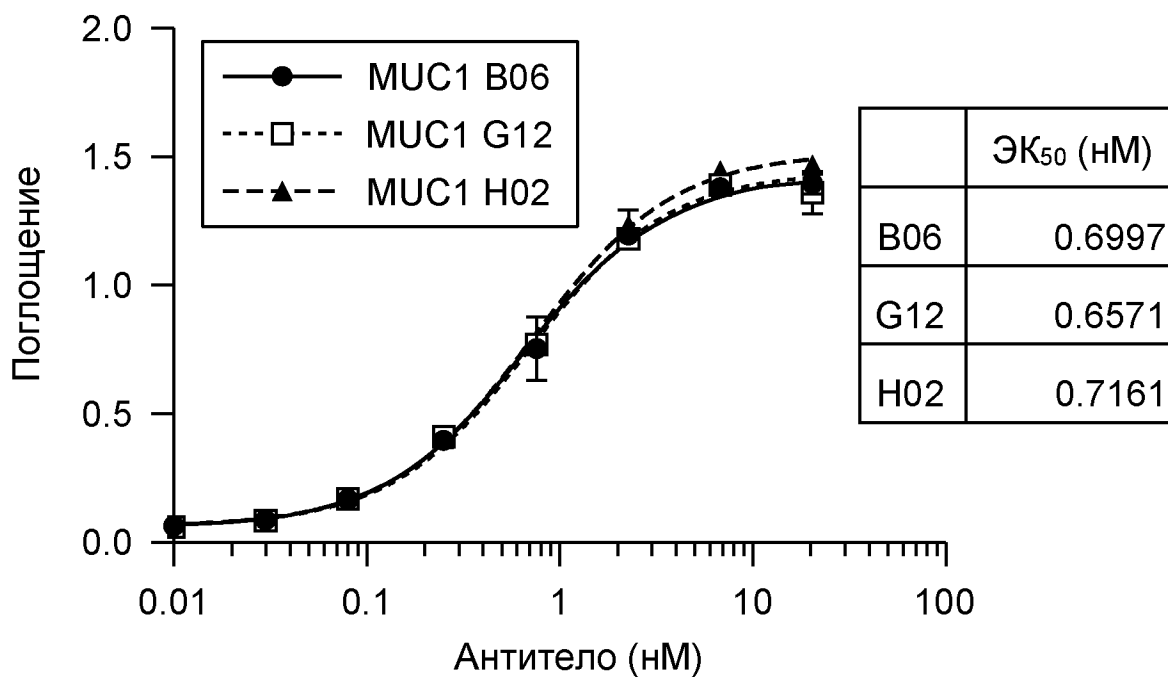
введение субъекту, имеющему клеточное пролиферативное расстройство, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 37-42.

Эксклюзионная хроматография

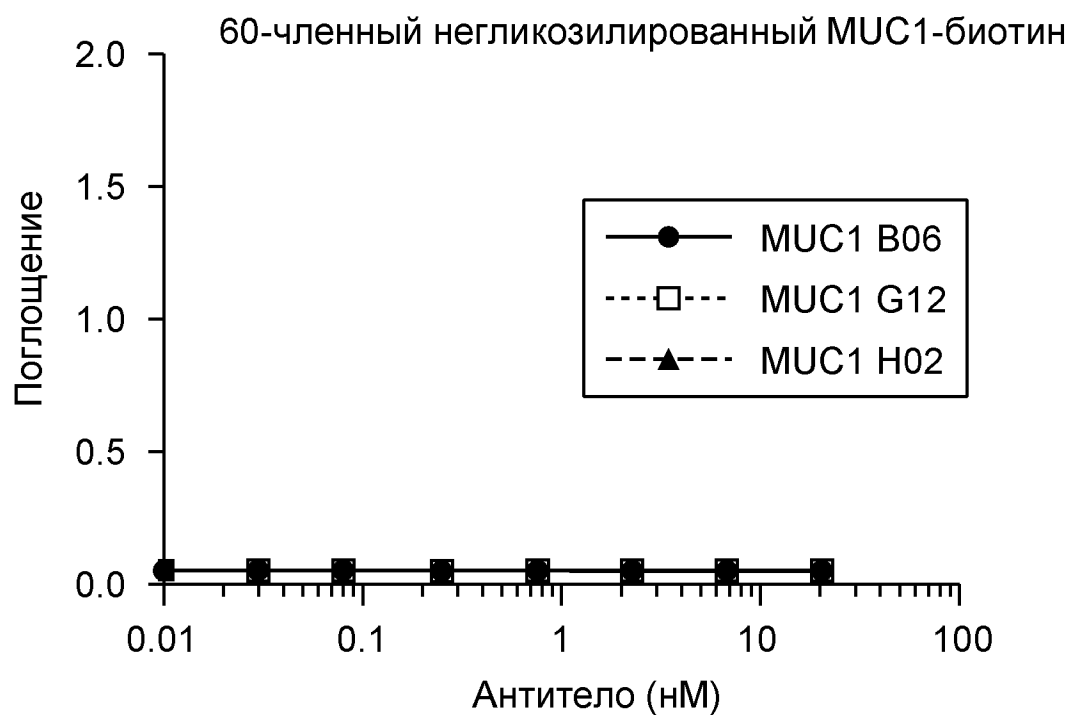
Антитело	Агрегация (%)
MUC1 gB06	0.54%
MUC1 G12	0.14%
MUC1 H02	1.01%

ФИГ. 1

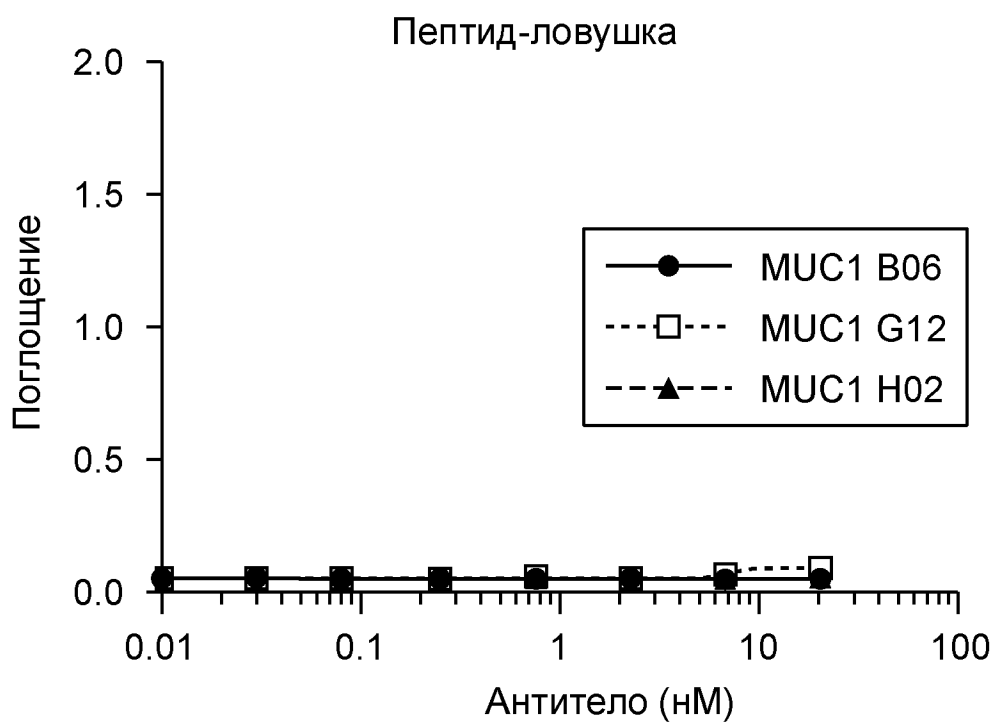
20-членный гликозилированный MUC1-биотин



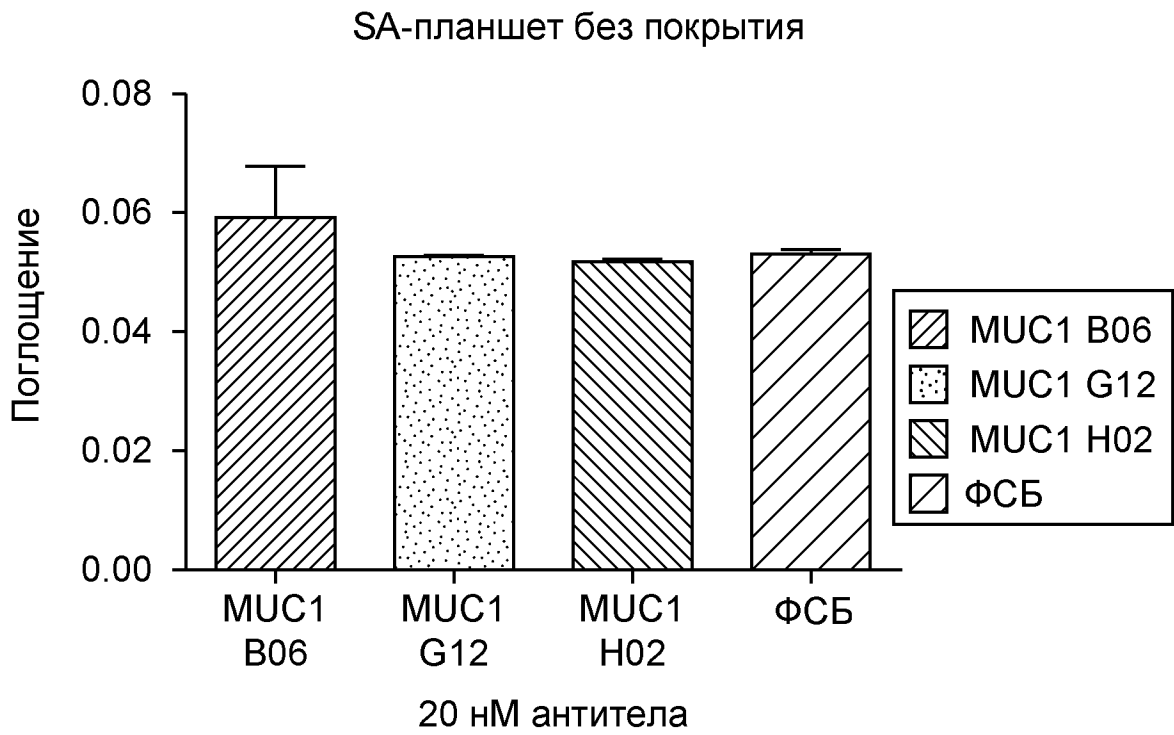
ФИГ. 2А



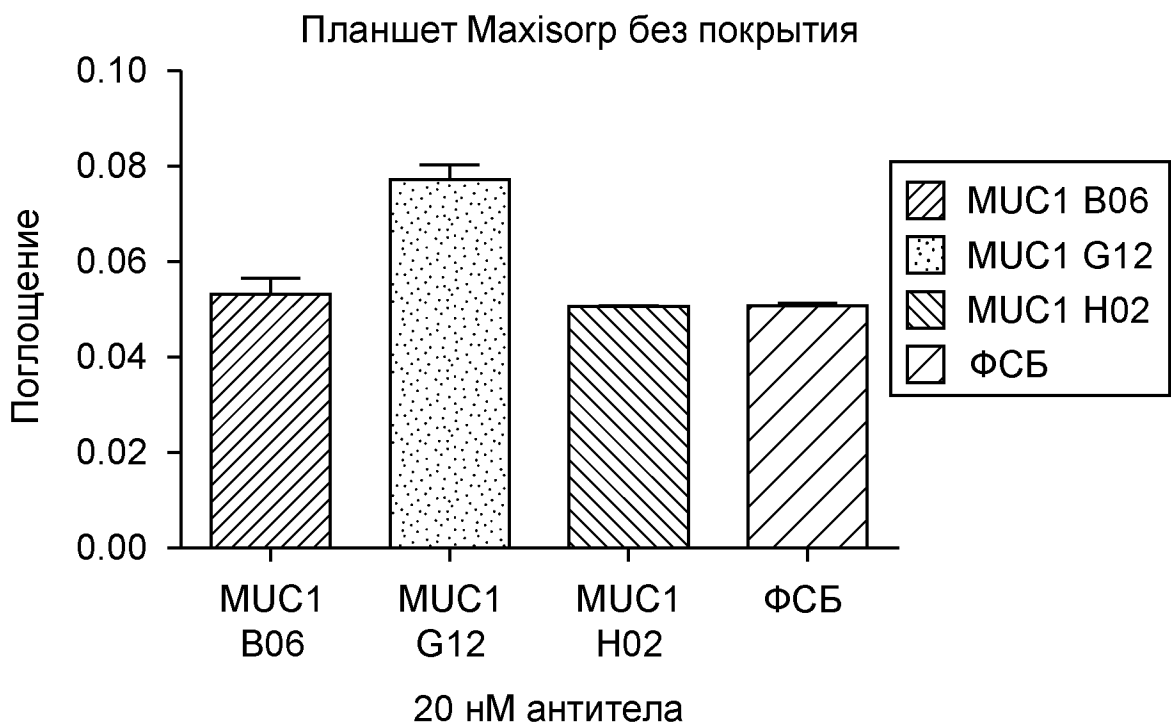
ФИГ. 2В



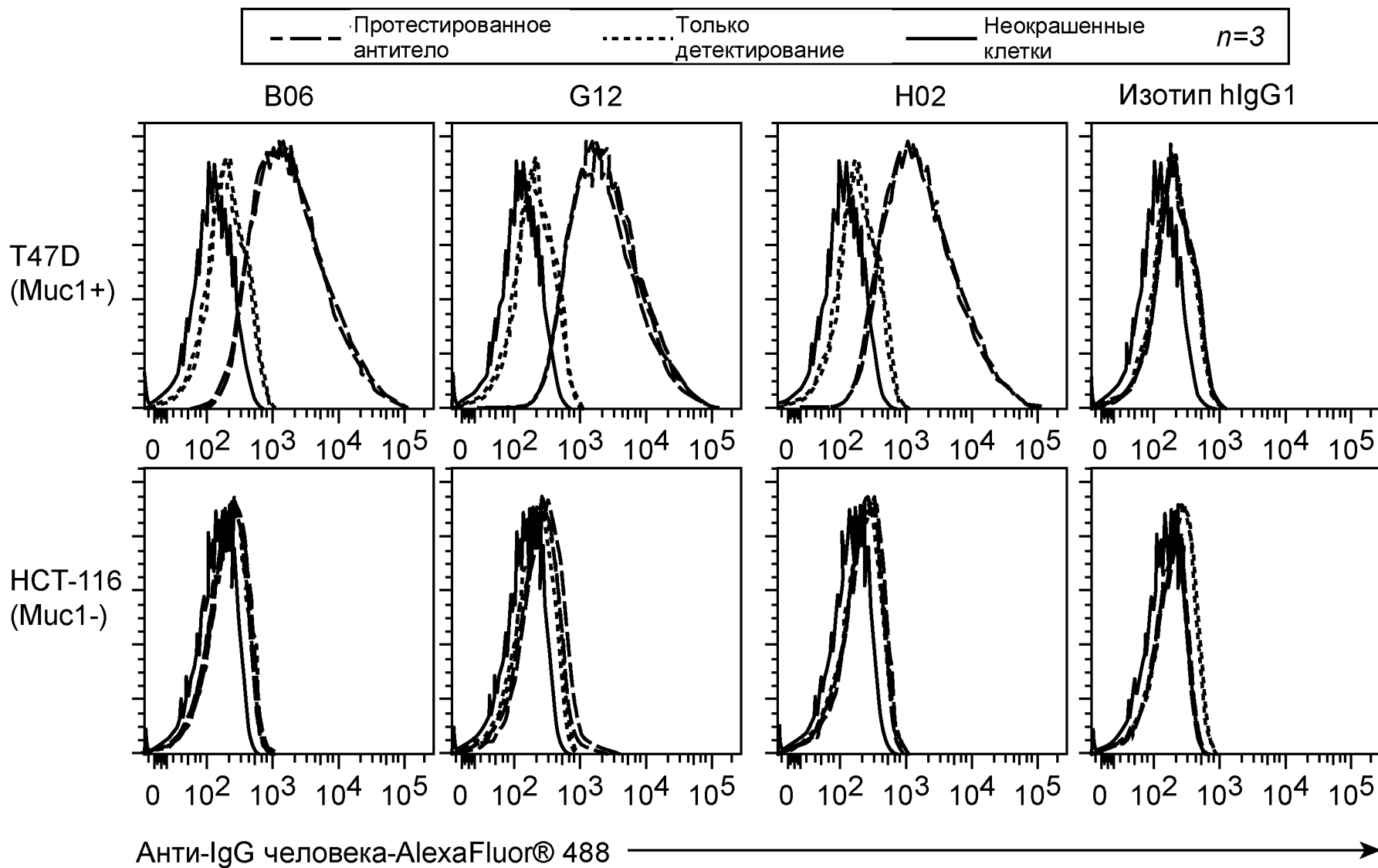
ФИГ. 2С



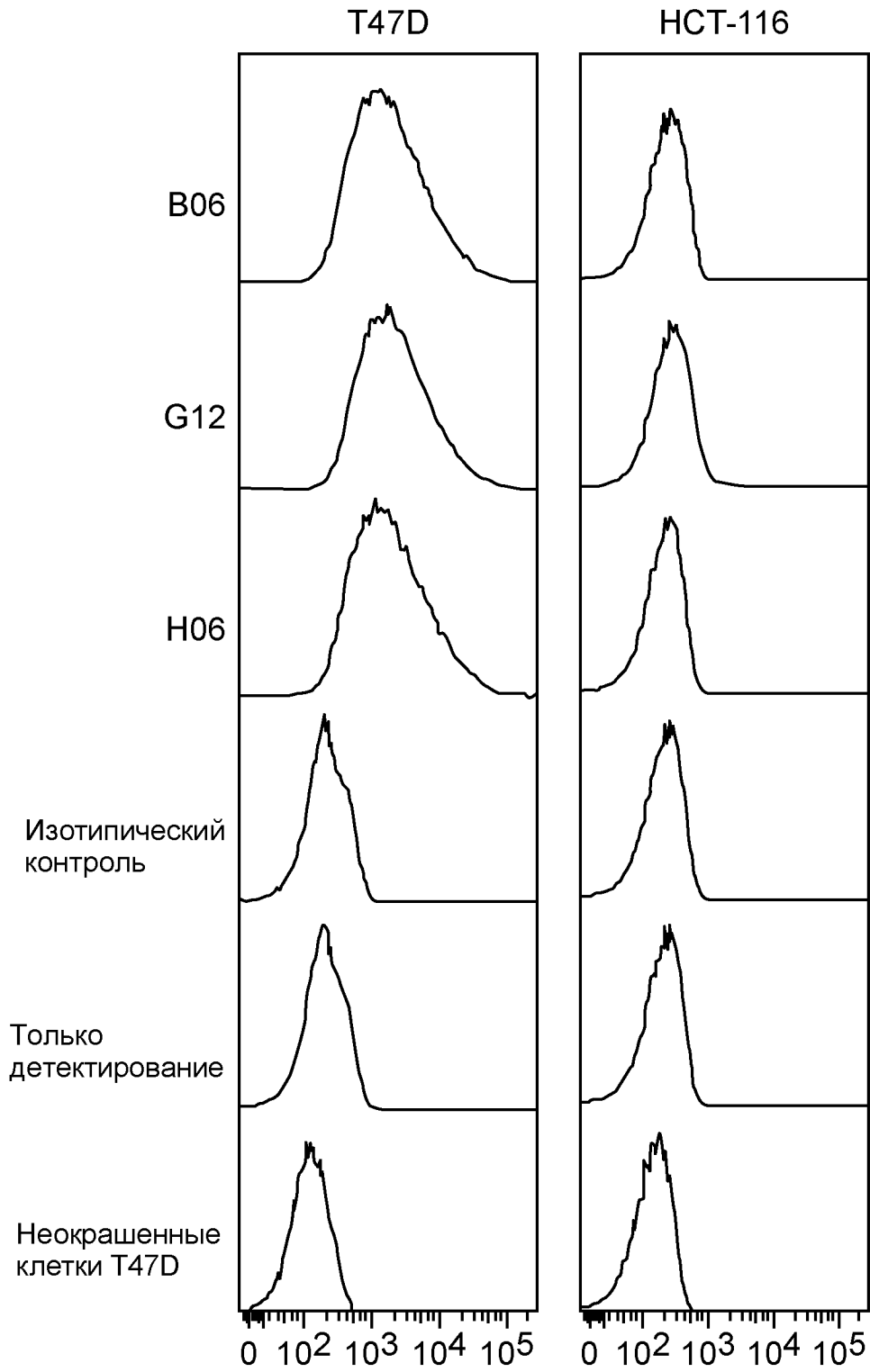
ФИГ. 3А



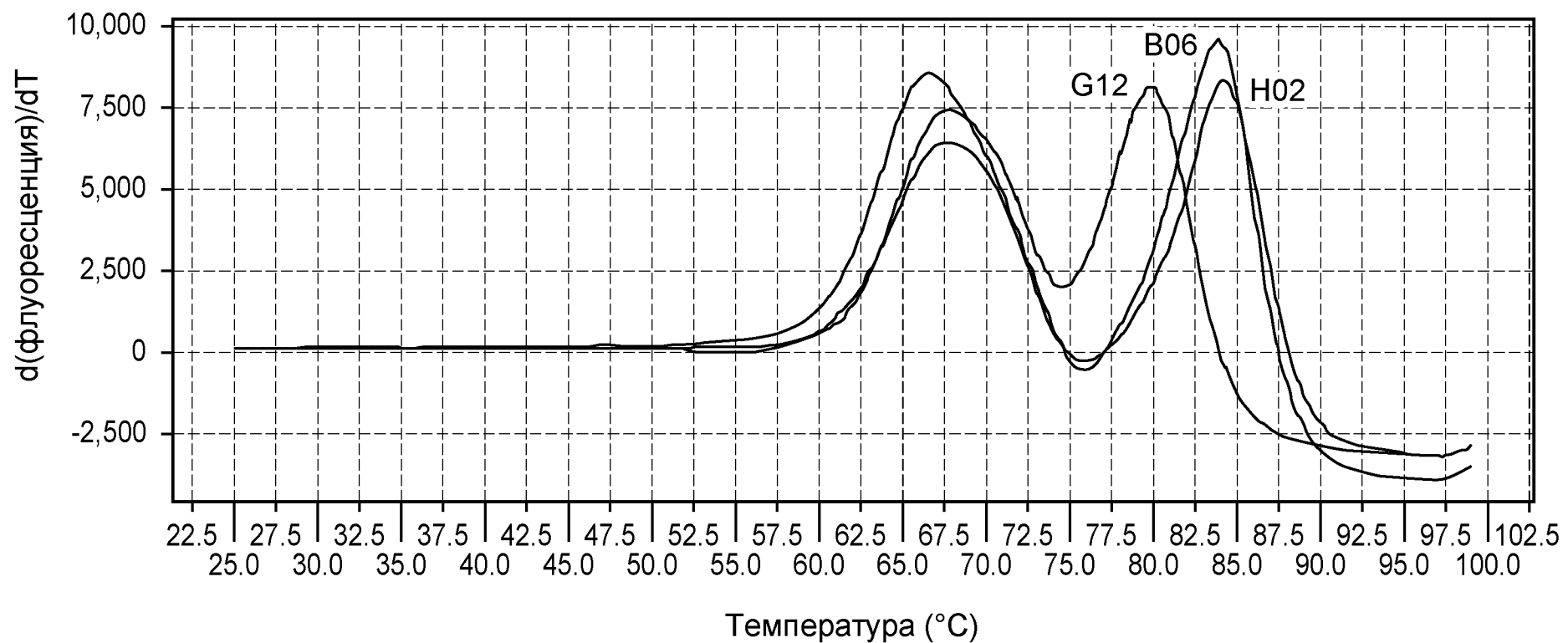
ФИГ. 3В



ФИГ. 4



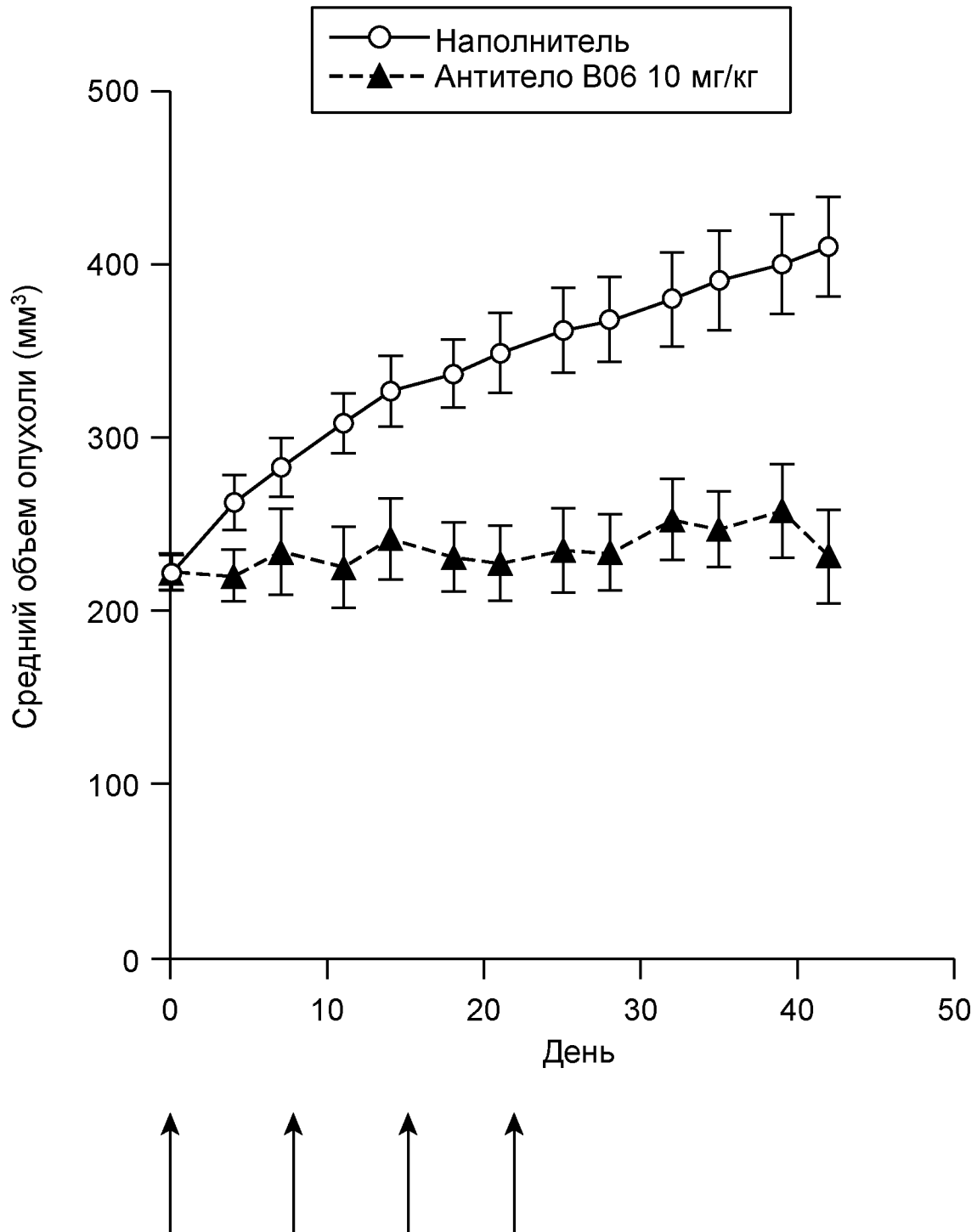
ФИГ. 5



6/7

Антитела	CH2 Tm	Fab Tm
B06	66.50	83.84
G12	67.70	79.86
H02	67.70	84.16

ФИГ. 6



ФИГ. 7