

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391608 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.03

(22) Дата подачи заявки
2021.11.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/33* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРОТИВОРАКОВАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, СПОСОБСТВУЮЩАЯ СВЕРХОСТРОМУ ОТТОРЖЕНИЮ

(31) 63/119,359

(32) 2020.11.30

(33) US

(86) PCT/US2021/061180

(87) WO 2022/115775 2022.06.02

(88) 2022.07.07

(71) Заявитель:

КОРНЕЛЛ ИЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:

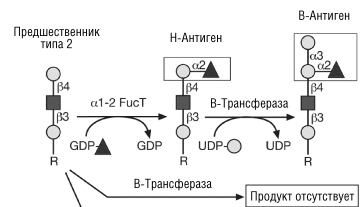
Бандер Нил Х. (US), Леконет Вильхем (NL), Го Мин, Лю Хе, Лоренц Иво, Хан Абдул Г. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, включающему нацеливающий компонент, который нацелен на ассоциированный с опухолью антиген, и фермент, который, при его доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата. Этот фермент связан с нацеливающим компонентом. Также описан способ лечения рака, включающий введение бифункционального терапевтического средства.

Строгая специфичность гликозилтрансфераз к акцепторному субстрату



A1

202391608

202391608

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578288EA/085

ПРОТИВОРАКОВАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, СПОСОБСТВУЮЩАЯ СВЕРХОСТРОМУ ОТТОРЖЕНИЮ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/119359, поданной 30 ноября 2020 г., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Область изобретения

[0002] Настоящее изобретение относится к противораковой иммунотерапии для стимуляции сверхострого отторжения.

Предпосылки создания изобретения

[0003] Комбинированная терапия является общепринятым подходом к лечению практически всех типов рака и представляет собой стандартный терапевтический подход, применяемый в течение нескольких десятилетий. Основанием для применения комбинированной терапии послужил ранний опыт химиотерапии, когда было установлено, что высокая уровень мутаций при раке способствует быстрому развитию резистентных линий опухолевых клеток при использовании только одного агента. Целью комбинированной терапии является повышение эффективности и минимизация развития резистентности опухоли или «ускользания» от иммунного ответа. Обычно, это достигается за счет использования 2 или более противораковых агентов, каждый из которых имеет свой механизм действия, что делает развитие резистентных опухолевых клеток более трудным и менее вероятным. Аддитивные или синергические эффекты комбинирования двух или более агентов могут быть различными при успешном и безуспешном лечении пациента.

[0001] Многие схемы комбинированного лечения хорошо известны специалистам в области онкологии. Так, например, MOPP (аббревиатура, означающая мехлоретамин, винкристин, прокарбазин, преднизон) является схемой лечения болезни Ходжкина. Несколько различных комбинированных схем (все они включают цисплатин, винбластин и блеомицин) были апробированы для лечения рака яичек, который является излечимым в 98% диагностированных случаев. Всего было использовано более 300 различных комбинированных схем.

[0002] Основным недостатком комбинированной терапии часто является то, что она также приводит к увеличению токсичности. Так, например, эффективность большинства форм нехирургического лечения рака, таких как внешнее облучение и химиотерапия, ограничена из-за токсических побочных действий на нормальные ткани и клетки, а также из-за ограниченной специфичности этих методов лечения раковых опухолей. Это ограничение также важно в том случае, когда противораковые антитела используются для нацеливания токсических агентов, таких как изотопы, лекарственные средства и токсины, на очаги рака, поскольку в качестве системных агентов они также циркулируют в чувствительных клеточных компартментах, таких как костный мозг. При остром лучевом поражении, деструкция лимфоидного и кроветворного отделов является основным

фактором развития септицемии и последующего летального исхода. Таким образом, в настоящее время крайне необходимы методы снижения токсических эффектов противораковой терапии при сохранении или даже повышении эффективности.

[0003] В качестве альтернативы комбинированной терапии, последние достижения в области иммунотерапии ясно указывают на то, что иммунная система может быть вовлечена в ответ на рак и что эти ответы могут быть достаточно эффективными и устойчивыми. Уже имеющийся опыт ингибирования иммунных контрольных точек позволяет предположить, что наибольшая польза такого ингибирования заключается в его применении для лечения рака, который несет относительно высокую мутационную нагрузку. Но даже в этих случаях, ответ наблюдается лишь у незначительного числа пациентов. Некоторые виды рака, такие как рак предстательной железы, не имеют иммунных клеток в микроокружении опухоли. Такое отсутствие иммунных клеток, иногда называемое «холодной» средой или иммунологической «пустыней», серьезно ограничивает способность активировать иммунную систему. Т-клетки, содержащие химерный антигенный рецептор (CAR-T) и биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE) используют нацеливание антител на опухолеассоциированный антиген, чтобы направить литический механизм Т-клеток на лизис раковых клеток. Но до сих пор, противоопухолевая активность CAR-T и BiTE была ограничена гематогенным раком, а не значительно более распространенными солидными опухолями. Очевидно, что потребность в разработке дополнительных методов лечения различных видов рака остается актуальной.

[0004] Целью настоящего изобретения является преодоление этих и других недостатков в данной области.

Сущность изобретения

[0005] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, которое включает нацеливающий компонент, который нацеливается на антиген, ассоциированный с опухолью, и фермент, который, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно превращает фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата. Этот фермент связан с нацеливающим компонентом.

[0006] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения рака. Этот способ включает выбор индивидуума, страдающего раком; получение бифункционального терапевтического средства согласно настоящему изобретению; и введение выбранному индивидууму бифункционального терапевтического средства в условиях, эффективных для лечения рака.

[0007] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, включающему нацеливающий компонент, который нацелен на рецептор специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA)/фолатгидролазы 1 (FOLH1), и гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим

компонентом, ферментативно превращает фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

[0008] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, включающему нацеливающий компонент, который нацелен на член семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека (HER), и гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно превращает фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

[0009] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, включающему нацеливающий компонент, который нацелен на CD19, и гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно превращает фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

[0010] В настоящем изобретении представлен новый иммунотерапевтический подход, при котором нацеленная на опухоль гликозилтрансфераза изменяет гликофенотип опухоли и/или ее кровеносных сосудов посредством добавления неаутологичного антигена гистологической группы крови (HBGA) или гликтопа альфа-gal. Это способствует эффективному превращению опухоли в несовместимый с HBGA аллотрансплантат или ксенотрансплантат. Репрезентативный вариант этого многофункционального агента может быть нацелен на PSMA/FOLH1 для преобразования новообразованной сосудистой сети опухоли в несоответствующий HBGA или ксенотрансплантат, и тем самым инициации сверхострого отторжения. Полувековой опыт трансплантации подтверждает, что аллотрансплантат, несовместимый с HBGA, или ксенотрансплантат, экспрессирующий альфа-gal, стимулирует устойчивый процесс иммунного отторжения.

[0011] Как описано в настоящей заявке, для стимуляции экспрессии ксено- или аллоантигена опухолью, ксеногенные или аллогенные гликозилтрансферазы, например, альфа-gal-трансфераза (альфа-galT) или аллогенные гликозилтрансферазы А и/или В, то есть, все ферменты, обычно находящиеся в аппарате Гольджи, доставляются на поверхность опухолевой клетки, то есть, по механизму гетеротопического алло/ксенотрансплантата молекулярного масштаба. Альтернативно, альфа-galT, ферменты А и/или В могут быть нацелены на антигены, специфичные для опухолевых неоваскулярных эндотелиальных мишеней, таких как фолатгидролаза 1 (FOLH1) (также известная как специфичный для предстательной железы мембранный антиген (PSMA)), или рецептор-2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2), или на другие мишени, известные специалистам в данной области. В дополнение к нацеливанию гликозилтрансферазы (альфа-galT, ферментов гликозилтрансферазы А и/или В), доставляется соответствующий донор сахаров-нуклеотидов (UDP-gal или UDP-NAcGal). В присутствии

гликозилтрансферазы в опухоли, сахар (gal или NAcGal) добавляют к уже существующим гликопротеинам и гликолипидам, включая продукты, секретируемые клетками-мишенями, для продуцирования алло- или ксеноантигенов, и тем самым для запуска интенсивного иммунного ответа. Преобразованные алло/ксено-белки, секретируемые в микроокружение, связывают большое количество природных антител, запускающих активацию комплемента, иммунный ответ, антителозависимую цитотоксичность (ADCC), и служат для преобразования «холодного» микроокружения в «горячее».

[0012] Ферменты гликозилтрансферазы А и В отличаются только по 4 из 353 аминокислотных остатков (публикации Nakomori, «Antigen Structure and Genetic Basis of Histo-Blood Groups A, B and O: Their Changes Associated With Human Cancer», *Biochimica et Biophysica Acta* 1473:247-266 (1999); Seto et al., «Sequential Interchange of Four Amino Acids From Blood Group B to Blood Group A Glycosyltransferase Boosts Catalytic Activity and Progressively Modifies Substrate Recognition in Human Recombinant Enzymes», *J. Biol. Chem.* 272:14133-14138 (1997), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки), что делает маловероятным их иммуногенность. Исследования сывороток пациентов подтвердили, что эти ферменты, как и предсказывалось, не являются иммуногенными. Действительно, хотя их углеводные продукты НВГА обладают высокой иммуногенностью, однако, ферменты трансферазы А и В, как сообщалось, никогда не были иммуногенными. Нацеленная на опухоль доставка неиммуногенного фермента трансферазы А или В, таким образом, обеспечивает средство для изменения иммунофенотипа опухоли или новой сосудистой сети на фенотип, который экспрессирует высокоиммуногенный неаутологичный НВГА, что способствует установлению фенотипа несовместимого аллотрансплантата и инициации стойкой реакции отторжения у хозяина.

[0013] Как описано в настоящей заявке, для подтверждения концепции, подход был подтвержден с помощью GTA или GTB, взятых у человека. Альтернативно, можно использовать ксеногенную альфа-галактозилтрансферазу (альфа-1,3-галактозилтрансферазу; альфа-galT), то есть, фермент, который является мутированным/нефункциональным у человека и ответственен за отторжение ксенотрансплантированных органов у других млекопитающих. Применение фермента альфа-galT может потребовать гуманизации или деиммунизации альфа-galT, и для достижения этой цели, специалистам в данной области известны способы, включающие, но не ограничивающиеся ими, использование последовательностей гомологичных областей других гликозилтрансфераз, которые не являются иммуногенными для человека. Такие способы гуманизации или деиммунизации широко и успешно применялись для гуманизации или деиммунизации антител чужеродного происхождения перед их использованием в качестве терапевтических средств для лечения человека. Однако, исследования сывороток пациентов показали, что эти ферменты не являются иммуногенными.

[0014] Настоящее изобретение относится к новому иммунотерапевтическому подходу, в котором нацеленная на опухоль гликозилтрансфераза изменяет экспрессию

антигена гистогруппы крови опухоли и/или ее кровоснабжение. Это способствует эффективному преобразованию опухоли в аллотрансплантат, несовместимый с НВГА. Этот многофункциональный агент может быть использован для нацеливания PSMA/FOLH1 в целях преобразования новообразованной сосудистой сети опухоли в несоответствующий НВГА, и тем самым инициации сверхострого отторжения.

[0015] Как описано в настоящей заявке, комплементарный ортогональный иммунотерапевтический подход был смоделирован на основе устойчивого иммунного ответа на ксено- или аллотрансплантат и понимания процесса отторжения, который наблюдается за последние полвека. Для достижения этой цели, в качестве модели была выбрана наиболее экстремальная форма реакции «хозяин против трансплантата», то есть, сверхострое отторжение (HAR).

[0016] HAR возникает в результате наследственных мутаций в любом из 2 высокородственных генов: альфа-1,3 галактозилтрансферазы (альфа-1,3-GalT) в случае ксенотрансплантатов (публикация Collins, et al., «Cardiac Xenografts Between Primate Species Provide Evidence for the Importance of the Alpha-Galactosyl Determinant in Hyperacute Rejection», *J. Immunol.* 154:5500-5510 (1995), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки) и хорошо известного локуса антигена гистогруппы крови (НВГА) в случае аллотрансплантатов (публикация Milland et al., «ABO Blood Group and Related Antigens, Natural Antibodies and Transplantation», *Tissue Antigens* 68:459-466 (2006), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Эти два в высокой степени родственных гена обнаружены в одной хромосоме (9q34), имеют 45% гомологию и, вероятно, происходят от одного и того же гена-предшественника (публикации Yamamoto et al., «Molecular Genetic Basis of the Histo-Blood Group ABO System», *Nature* 345:229-233 (1990); Yamamoto et al., «Sugar-Nucleotide Donor Specificity of Histo-Blood Group A and B Transferases is Based on Amino Acid Substitutions», *J. Biol. Chem.* 265:19257-19262 (1990); Yamamoto et al., «Genomic Organization of Human Histo-Blood Group ABO Genes», *Glycobiology* 5:51-58 (1995), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки). Эти аллели кодируют гликозилтрансферазы, которые посттрансляционно добавляют концевую сахарную часть к углеводной цепи (CHO), присутствующей в формирующихся белках и липидах, предназначенных для экспрессии или секреции клеточной мембраной. Из-за мутации, фермент альфа-GalT был инактивирован у человека и у мартышек, но не у других млекопитающих, приблизительно 28 миллионов лет назад (публикация Macher et al., «The Gal Alpha1,3Gal Beta1,4GlcNAc-R (Alpha-Gal) Epitope: a Carbohydrate of Unique Evolution and Clinical Relevance», *Biochim. Biophys.* 1780:75-88 (2008), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). В результате этого, ксенотрансплантированные органы и ткани, происходящие от млекопитающих, не являющихся приматами, экспрессируют эпитоп альфа-gal, который является чужеродным для человека. В случае локуса НВГА, небольшое количество мутаций приводило к образованию аллелей, классически известных как А, В и О. Аллель В кодирует

гликозилтрансферазу В (ГТВ), которая, как и ее гомолог альфа-1,3-GalT, добавляет концевую Gal к цепи СНО, с единственным отличием, заключающимся в том, что трансфераза В добавляет Gal, только если на соседней Gal присутствует 1,2-фукоза. Трансфераза А функционально отличается от трансферазы В только тем, что она добавляет концевую Gal, которая является N-ацетилированной (NAcGal). Продукт гена О не является активным из-за мутации со сдвигом рамки считывания (фиг. 1).

[0017] Эпитопы альфа-Gal, НВГА А и НВГА В, генерируемые этими тремя активными ферментами, широко экспрессируются в природе, включая бактерии, которые населяют кишечник человека (публикация Springer et al., «Blood Group Isoantibody Stimulation in Man by Feeding Blood Group-Active Bacteria», *J. Clin. Invest.* 48:1280-1291 (1969), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). В результате, люди, у которых отсутствуют аллели aGalT и А и/или В, постоянно иммунизируются этими эпитопами бактериального происхождения. Это приводит к продуцированию очень высоких уровней природных антител (Abs) к этим неаутологичным эпитопам, которые составляют более 1% иммуноглобулина плазмы (Ig) (см. публикации Galili et al., «One Percent of Human Circulating B Lymphocytes are Capable of Producing the Natural Anti-Gal Antibody», *Blood* 82:2485-2493 (1993); Galili et al., «A Unique Natural Human IgG Antibody With Anti-Alpha-Galactosyl Specificity», *J. Exp. Med.* 160:1519-1531 (1984), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки). С учетом разнообразия репертуара Ab, оцениваемого как миллиарды различных специфичностей, можно сказать, что существует огромная доля эндогенной активности Ig. Эти Ab состоят из IgM и IgG, которые активируют каскад реакций комплемента, который, в свою очередь, может инициировать сосудистый тромбоз (см. публикации Subramaniam et al., «Distinct Contributions of Complement Factors to Platelet Activation and Fibrin Formation in Venous Thrombus Development», *Blood* 129(16):2291-2302 (2017); Foley et al., «Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation» *Circ. Res.* 118:1392-1408 (2016); и Conway EM, «Reincarnation of Ancient Links Between Coagulation and Complement», *J. Thromb. Haemost.* 13(Suppl. 1):S121-S32 (2015), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки). Другие классы иммуноглобулинов, такие как IgA и IgE, также могут быть нацелены на эти гликолевые эпитопы. По своей сути, эволюционные мутации в этих двух генах создают иммунологическое состояние, балансирующее на переломном этапе, праймированное и готовое быстро, агрессивно и негативно реагировать на появление любого из этих неаутологичных эпитопов. Иммунологические эффекты этих мутаций препятствовали успешной ксенотрансплантации у человека, и это объясняет, почему соответствие НВГА является единственным наиболее важным совпадением при трансплантации твердых органов с тех пор, как такое важное открытие было впервые сделано Starzl, *Experience In Renal Transplantation* (публикация WB Saunders Company, Philadelphia, PA, chapter 6 (1964), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), в первые дни получения почечных аллотрансплантатов в 1960-х годах. С тех пор, катастрофические последствия несоответствия НВГА при трансплантации

твердых органов наблюдаются только в тех очень редких случаях, когда возникают ятрогенные ошибки (см. публикацию Altman, Doctors Discuss Transplant Mistake. *New York Times*, Feb 22, 2003, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Этот фоновый уровень позволил индуцировать экспрессию одного из этих неаутологичных эпителиальных раковыми клетками хозяина и/или сосудистыми эндотелиальными клетками, которые снабжают кровью опухоль.

Краткое описание чертежей

[0018] На фиг. 1 показана строгая акцепторная субстратная специфичность гликозилтрансфераз. В (или А)-трансфераза будет добавлять свой соответствующий сахар только к сайтам гликозилирования, которые экспрессируют Н-антиген. К счастью, отсутствие этого необходимого Н-антигена во многих нормальных тканях предотвращает нецелевое превращение в НВГА А или В. Альтернативно, в случае, если желательно нацелиться на нормальные клетки или раковые клетки, в которых естественным образом отсутствует Н-антиген, это может быть достигнуто способом, аналогичным способу, описанному для добавления А или В, также путем нацеливания альфа-1-2-фукозилтрансферазы и получения GDP-фукозы в качестве донора фукозы. Добавление фукозы/Н-антигена может быть выполнено одновременно с нацеливанием трансферазы А или В, или добавления могут быть выполнены поэтапно (например, сначала добавляют фукозу, а затем добавляют А или В).

[0019] На фиг. 2А-2В показано, что химерный белок Ab-GTB поддерживает иммунореактивность и ферментативную активность. На фиг. 2А представлен график, показывающий, что химерный белок J591-GTB сохраняет сопоставимую иммунореактивность связывания с PSMA по сравнению с исходным антителом J591, как было оценено с помощью ELISA. На фиг. 2В представлена гистограмма, показывающая, что химерный белок также сохраняет ферментативную активность, продемонстрированную по его способности катализировать перенос ^{14}C -галактозы из UDP- ^{14}C -галактозы, донора нуклеотидов, в 2'-фукозиллактозу (2-FL). Это включение происходит на высоком уровне только тогда, когда присутствуют слитый белок J591-GTB и его акцепторный субстрат, 2-FL. Аналогичные результаты были получены для антитела против 4D5 (her2)-GTB.

[0020] На фиг. 3 показан график, указывающий, что активность GTB может модулироваться удлинением С-концов. Активность J591-GTB (% от контроля) показана как функция удлинения С-концевой аминокислоты и оценена путем включения ^{14}C -gal из UDP- ^{14}C -gal в 2'-фукозиллактозу (2-FL).

[0021] На фиг. 4 показаны изображения, указывающие, что J591-GTB специфически преобразует позитивные по антигену опухолевые клетки. Срезы ткани из ксенотрансплантата CWR22Rv1 (гетерогенный PSMA+/НВГА О) инкубировали с J591-GTB+UDP-gal и иммуногистохимически окрашивали на экспрессию НВГА В (левая панель). Негативные контрольные срезы, включающие второе конъюгированное с пероксидазой антитело против мышинового Ig, но не содержащее мышинового антитела против НВГА В (средняя панель) или J591-GTB (правая панель), соответственно, не окрашивались.

[0022] На фиг. 5 показаны изображения, указывающие на влияние J591-GTB на клетки LNCaP и PC3. Клетки LNCaP (PSMA+/HBGA O; левая панель) преобразуются под действием J591-GTB в HBGA B; клетки PC3 (PSMA-/HBGA O; правая панель) не подвергаются превращению под действием J591-GTB.

[0023] На фиг. 6A-6D показаны изображения, указывающие, что клетки PC3, трансфицированные PSMA, затем были обработаны J591-GTB. На фиг. 6A показаны изображения с фазовым контрастом. На фиг. 6B показаны клетки, экспрессирующие PSMA. На фиг. 6C показана экспрессия антигена HBGA B. Фиг. 6D представляет собой слияние фиг. 6B и 6C. Только те клетки, которые экспрессировали PSMA, были превращены в клетки, экспрессирующие HBGA B. Клетки, негативные по PSMA, показанные в основном в левом центре и в верхнем центре, остаются негативными по HBGA B.

[0024] На фиг. 7 показаны изображения, иллюстрирующие, что клетки LNCaP были помещены в суспензию эритроцитов типа O и инкубированы с J591 (верхний ряд); J591-GTB (средний ряд) или с J591-GTB, удлинённым на 54 аминокислоты (нижний ряд). В левом столбце показано фазово-контрастное изображение. В среднем столбце показано окрашивание ядра DAPI. В правом столбце показано мышинное антитело против HBGA B+козьё антитело против мышинных IgM, конъюгированное с alexa488. В то время как позитивные по PSMA клетки LNCaP превращаются в клетки, позитивные по HBGA B под действием J591-GTB, с удлинением C-конца, связанного с их плазматической мембраной или без него, эритроциты, негативные по PSMA, не подвергаются такому превращению.

[0025] На фиг. 8A-8D показаны изображения, указывающие на опосредованный компонентом лизис *in vitro*. Клетки LNCaP инкубировали либо с нативным mAb J591, либо со слитым белком mAb J591-GTB. Все лунки также имели UDP-gal. Впоследствии была добавлена сыворотка, взятая у пациента типа A в качестве источника природного анти-B Ab и компонента. Комбинация J591-GTB плюс сыворотка типа A (фиг. 8A) давали полный лизис LNCaP. Слитый белок J591-GTB не индуцировал лизис в отсутствие сыворотки типа A (фиг. 8B). В отсутствие слитого белка, лизис не был обнаружен независимо от присутствия (фиг. 8C) или отсутствия сыворотки типа A (фиг. 8D).

[0026] На фиг. 9 показаны изображения, указывающие на опосредованную компонентом цитотоксичность нескольких клеточных линий. Показана опосредованная компонентом цитотоксичность нескольких клеточных линий, наблюдаемая при исключении трипанового синего. Верхнюю панель обрабатывали J591-GTB+ UDP-gal+сывороткой человека типа O. Клетки на нижней панели обрабатывали той же сывороткой O, но без J591-GTB+UDP-gal. Доля погибших клеток указана под каждой фотографией в соответствии с определением методом FACS (фиг. 10). Для FACS, сыворотка типа O, без J591-GTB+UDP-gal, служила в качестве негативного контроля, тогда как обработка 0,1% тритоном обеспечивала полный лизис, который служил в качестве контроля.

[0027] На фиг. 10A-10H показаны изображения, указывающие на *in vivo* превращение раковых клеток предстательной железы и молочной железы в клетки HBGA

В. На фиг. 10А-10D показаны серийные срезы после ксенотрансплантации LNCaP у мыши SCID через 24 часа после введения PBS+ UDP-gal (фиг. 10А), b) J591+ UDP-gal (фиг. 10В) и J591-GTB+UDP-gal (фиг. 10С). На фиг. 10А-10С показано иммуногистохимическое окрашивание на НВГА В (все 10х). На фиг. 10D показан серийный срез того же образца, окрашенного на PSMA. См. также фиг. 12А-12Е, где показано достижение более высокой мощности и присутствие дополнительных линий ксенотрансплантата. На фиг. 10Е-10Н показан ксенотрансплантат рака молочной железы MD-MB361 (HER2⁺) после обработки PBS+UDP-gal (фиг. 10Е), 4D5+UDP-gal (фиг. 10F), 4D5-GTB+UDP-gal (фиг. 10G и 10H). Срезы иммуногистохимически окрашивали на экспрессию НВГА В. Наблюдалось явное дискретное окрашивание плазматической мембраны. На фиг. 10С и 10Н соседняя соединительная ткань не преобразовывалась, что указывает на то, что специфичность иммуно-фенотипической конверсии ограничена опухолью-мишенью.

[0028] На фиг. 11А-11В показана столбчатая диаграмма (фиг. 11А) и гистограммы (фиг. 11В), на которых проиллюстрирован лизис В-преобразованных клеточных линий сывороткой типа О, как было определено по поглощению иодида пропидия, оцененному с помощью FACS и по исключению трипанового синего (см. фиг. 9). О-сыворотка в отсутствие В-превращения не вызывает лизиса. После обработки PSMA-позитивных клеток препаратом J591-GTB+UDP-gal, сыворотка типа О полностью лизировала все клеточные линии, преобразованные в PSMA-позитивные клетки/В; а РС3, которые представляют собой клетки, позитивные по НВГА О/негативные по PSMA, не превращались в НВГА В и не подвергались лизису.

[0029] На фиг. 12А-12Е показаны изображения, иллюстрирующие превращение ксенотрансплантатов LNCaP, C4-2 и CWR22Rv1 *in vivo* с помощью J591-GTB. На фиг. 12А-12В показан ксенотрансплантат LNCaP, обработанный *in vivo*: J591 [без GTB] (фиг. 12А) или J591-GTB (фиг. 12В), оба с UDP-gal, и иммуногистохимически окрашенный мышинным антителом против НВГА В; показано с большим увеличением. На фиг. 12С показан рак предстательной железы C4-2, обработанный *in vivo* J591-GTB плюс UDP-gal, и иммуногистохимически окрашенный мышинным анти-НВГА В; показано с большим увеличением. На фиг. 12D-12Е показан рак предстательной железы CWR22Rv1, гетерогенный и слабо позитивный по PSMA и обработанный *in vivo* J591-GTB плюс UDP-gal. Прилегающая соединительная ткань не превращалась в НВГА В.

[0030] На фиг. 13А-13В представлены график (фиг. 13А) и изображения мышей *in vivo* (фиг. 13В), иллюстрирующие превращение НВГА *in vivo* и обработку. Мышам внутрибрюшинно имплантировали 10×10^6 клеток C4-2-luc, суспендированных в Матригеле. Через несколько дней оценивали биолюминесценцию, и 10 мышей с подтвержденной жизнеспособной опухолью произвольно распределяли в одну из 2 групп обработки. Все мыши с опухолью получали однократную дозу J591-GTB+UDP-gal+сыворотки человека типа О; и у половины мышей сыворотку подвергали термоинактивации перед инъекцией. У тех мышей, которые были обработаны активной сывороткой типа О, средний поток фотонов прогрессивно снижался в течение

последующих 13 дней, в то время как у мышей с инактивированной сывороткой наблюдалось среднее прогрессирующее опухоль. В конце эксперимента на 13-й день, разница в биолюминесценции между группами была значимой ($p < 0,0032$). Повторный эксперимент дал соответствующие результаты.

[0031] На фиг. 14А-14В представлены изображения *in vivo* и график, показывающий результаты эксперимента №2, в котором клетки С4-2-luc внутрибрюшинно имплантировали с последующей однократной обработкой J591-GTB+UDP-gal+сывороткой человека типа О (верхние ряды) (фиг. 14А). На фиг. 14А показаны изображения мышей, получавших активную сыворотку типа О или сыворотку типа О, которая была ранее термоинактивирована. Мыши, получавшие термоинактивированную сыворотку, демонстрировали прогрессирующее опухоль (см. график потока фотонов; фиг. 14В), тогда как у тех мышей, которые получали активную сыворотку, наблюдалась регрессия опухоли; результаты эксперимента 1 показаны на фиг. 13А-13В.

[0032] На фиг. 15 представлена гистограмма FACS, показывающая экспрессию CD19, CD20 и CD38 в клетках MM1-S. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что клеточная линия множественной миеломы MM1-S является CD38-позитивной, CD19-позитивной и CD20-негативной.

[0033] На фиг. 16А-16В представлены FACS-гистограммы, указывающие на экспрессию ABO клеток MM1-S. На фиг. 16А показана линия клеток множественной миеломы MM1-S, которая является A/B-негативной. На фиг. 16В показана линия клеток множественной миеломы MM1-S, которая является O-позитивной.

[0034] На фиг. 17 представлена FACS-гистограмма, указывающая, что CD19⁺/O⁻-клетки миеломы MM1-S могут быть преобразованы в B⁺-клетки с помощью GTB+UDP-gal. GTB может быть нацелен на клетки миеломы посредством антитела против CD19, против CD38 или против BCMA.

[0035] На фиг. 18 представлены изображения, демонстрирующие использование ACUPA, низкомолекулярного лиганда, который связывается с PSMA, конъюгированным с GTB (ACUPA-GTB), для прямого превращения LNCaP из HBGA O в HBGA B. Это указывает на то, что помимо антитела (или производных антитела), низкомолекулярный лиганд или пептид, который связывается с антигеном-мишенью на опухолевой клетке или на неоваскулярном эндотелии, также может быть использован для нацеливания фермента. На левой панели показаны клетки, обработанные ACUPA-PEG-1500-GTB. На правой панели показаны клетки, обработанные только GTB.

[0036] На фиг. 19 представлены изображения, указывающие на специфичность превращения из HBGA O в HBGA B. Клетки рака молочной железы SK-BR5 (PSMA⁻/O⁺) совместно культивировали с клетками рака предстательной железы LNCaP (PSMA⁺/O⁺). Два типа клеток можно отличить по морфологии: SK-BR5 являются круглыми, тогда как клетки LNCaP имеют эллиптическую/веретенообразную форму. Кроме того, клетки LNCaP помечены белком, флуоресцирующим в зеленом диапазоне спектра (GFP). Инкубирование с J591-GTB и UDP-gal преобразует только PSMA⁺-клетки LNCaP, но не соседние клетки, в

которых отсутствует мишень PSMA. На панелях показаны изображения DAPI (левая панель), GFP (средняя панель) и антитело против В (Cy5) (правая панель).

[0037] На фиг. 20 представлены изображения, указывающие на специфичность преобразования из HBGA O в HBGA B. Как показано на этом чертеже, только PSMA⁺-клетки преобразуются в В⁺-клетки посредством J591-GTB/UDP-gal.

[0038] На Фиг. 21А-21В представлены FACS-гистограммы, указывающие на специфичность преобразования из HBGA O в HBGA B. Специфичность конверсии определяли количественно с использованием FACS путем сравнения концентрации J591 (антитела против PSMA)-GTB, необходимой для конверсии LNCaP (PSMA⁺) в HBGA B (фиг. 21А) по сравнению с клетками SK-BR5 (негативными по PSMA) (фиг. 21В). Обе клеточные линии представляют собой O⁺-линии. Показаны также FACS-гистограммы. Превращение SK-BR5 в В не происходит даже при концентрациях J591-GTB до 100 мкг/мл. Для сравнения, концентрации всего лишь 0,012 мкг/мл индуцируют превращение PSMA-позитивных клеток LNCaP.

[0039] На фиг. 22 представлена таблица и график, указывающие на специфичность преобразования из HBGA O в HBGA B. Показана таблица (левая панель) и гистограмма MFI с фиг. 21А-21В (правая панель). Индекс специфичности превышает 8000:1.

[0040] На фиг. 23 представлена таблица и график, указывающие, что как клеточная поверхность, так и секретируемые гликопротеины гликозилируются способом согласно изобретению. Показаны график количества клеток (верхняя панель) и таблица (нижняя панель).

[0041] На фиг. 24А-24В представлены графики, иллюстрирующие тестирование на антитела против α 1,3GalT в образцах сыворотки. На фиг. 24В показан расширенный вид фиг. 24А, где показаны более низкие оптические плотности.

[0042] На фиг. 25 представлен ДСН-ПААГ-гель, показывающий экспрессию и очистку рекомбинантных белков.

[0043] На фиг. 26А-26В представлены графики, показывающие связывание scfv-CD19- α Gal с CD19⁻-клетками MM1.S (фиг. 26А) и CD19⁺-клетками Raji (фиг. 26В).

[0044] На фиг. 27 представлен график, иллюстрирующий анализ переноса галактозы на смеси CD19⁺- и CD19⁻-клеток.

[0045] На фиг. 28 представлены гистограммы, иллюстрирующие анализ переноса галактозы на CD19⁺-клетках.

[0046] На фиг. 29 представлены диаграммы рассеяния, иллюстрирующие тестирование на связывание с В-клетками человека и перенос α Gal scfv- α GT в В-клетки человека.

[0047] На фиг. 30 представлен точечный график, иллюстрирующий анализ на лизис, опосредованный сывороткой, на CD19⁺-клетках.

[0048] На фиг. 31А-31В представлены графики, иллюстрирующие анализ на лизис В-клеток, в которые была перенесена α Gal. На фиг. 31А представлен график, указывающий на % лизиса. На фиг. 31В представлен график, где показаны уровни IgG (MFI) и IgM.

[0049] На фиг. 32А-32С показан анализ с использованием scFv-CD19- α GT в шахматном порядке *in vitro* и UDP-Gal. На фиг. 32А показан анализ на связывание, на фиг. 32В показана оценка уровня экспрессии альфа-gal, а на фиг. 32С показана оценка лизиса под действием человеческих МКПК.

[0050] На фиг. 33 представлена гистограмма, иллюстрирующая % оставшихся В-клеток на исходном уровне и через 1 час, 4 часа, 1 день, 7 дней, 14 дней, 30 дней и 60 дней после введения слитого белка, содержащего анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазу и UDP-gal. Количество В-клеток определяли путем оценки интенсивности флуоресценции CD20⁺/CD3⁻. CD20 использовали для того, чтобы избежать искажения количества В-клеток в присутствии анти-CD19 scFv.

Подробное описание изобретения

[0051] В настоящем изобретении описано бифункциональное терапевтическое средство для лечения рака, включающее нацеливающий компонент, который нацелен на ассоциированный с опухолью антиген, и фермент, который при его доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата. Этот фермент связан с нацеливающим компонентом.

[0052] Нацеливающим компонентом может быть производное антитела (интактное антитело, одновалентное одноцепочечное антитело, Fab'2, Fab, scFv или другие антитела) или пептид. Нацеливающие и ферментные фрагменты могут быть связаны посредством образования слитого гена/белка или посредством биохимического конъюгирования.

[0053] Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака. Этот способ включает выбор индивидуума, страдающего раком, и получение бифункционального терапевтического средства согласно изобретению. Выбранному индивидууму вводят бифункциональное терапевтическое средство в условиях, эффективных для лечения рака.

[0054] Используемый здесь термин «лечить» относится к применению или введению бифункционального терапевтического средства согласно изобретению индивидууму, например, пациенту. Лечение может включать удаление, терапию, модификацию, ослабление, облегчение, изменение, смягчение, уничтожение раковой опухоли или воздействие на раковую опухоль, симптомы рака или предрасположенность к раку.

[0055] Используемый здесь термин «индивидуум» относится к человеку и к животным, не являющимся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не-млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.п.

[0056] Используемый здесь термин «рак» включает все типы раковых образований или онкогенных процессов, метастатические ткани или злокачественно трансформированные клетки, ткани или органы, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности.

[0057] Используемый здесь термин «несовместимый аллотрансплантат» относится к ткани или опухоли, которые индуцируют сверхострое, острое и/или хроническое иммунное

отторжение. Сверхострое отторжение возникает за период времени от нескольких минут до нескольких часов после трансплантации органа или, как описано в настоящей заявке, после преобразования опухоли или ткани при доставке бифункционального терапевтического средства. Это быстрое отторжение характеризуется тромбозом сосуда, приводящим к некрозу трансплантата/опухоли. Сверхострое отторжение вызвано наличием антидонорских антител, присутствующих у реципиента до трансплантации/конверсии.

[0058] Используемый здесь «нацеливающий компонент» представляет собой компонент, который способен связываться с опухолевым антигеном или иным образом ассоциироваться с ним. Такими ассоциированными с опухолью антигенами являются, но не ограничиваются ими, следующие антигены, а также их пептидные фрагменты: FOLH1/PSMA, VEGFR, CD19, CD20, CD25, CD30, CD33, CD38, CD52, антиген созревания В-клеток (BCMA), CD79, рецептор соматостатина, 5T4, gp100, карциноэмбриональный антиген (CEA), маммоглобин А, мелан А/MART-1, MAGE, NY-ESO-1, PSA, тирозиназа, HER-2/neu, HER-3, EGFR, hTERT, мезотелин, нектин-4, TROP-2, тканевый фактор, MUC-1, CA-125, и их пептидные фрагменты, белок MZ2-E, полиморфный эпителиальный муцин, фолат-связывающий белок, белки раковой опухоли яичек MAGE-1 или MAGE-3 или NY-ESO-1, хорионический гонадотропин человека (HCG), альфа-фетопротеин (AFP), панкреатический онкофетальный антиген, CA-15-3, 19-9, 549, 195, антиген плоскоклеточной карциномы (SCCA), антиген рака яичника (OCA), антиген, ассоциированный с раком поджелудочной железы (PaA), мутантные белки K-ras, мутантный p53, немутантный p53, усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), химерный белок p210BCR-ABL, теломераза, сурвивин, белок WT1, белок LMP2, белок HPV E6 E7, идиотипический белок и белок PAP. В предыдущем списке указаны антигены, ассоциированные с опухолью, и дополнительные антигены, ассоциированные с опухолью, известны специалистам в данной области.

[0059] Антигеном может быть антиген или эпитоп, присутствующий, например, на опухолевой клетке, расположенной в легких, молочной железе, пищеводе, кишечнике, желудке, прямой кишке, почечно-мочевой системе, предстательной железе, мочевом пузыре, головном мозге, щитовидной железе, печени, поджелудочной железе, селезенке, коже, соединительной ткани, сердце, в кровеносной системе или в сосудистой системе. Антиген-мишень может представлять собой антиген или эпитоп, присутствующий на клеточной мембране, секретируемом белке или на белке, не связанном с мембраной. Примеры секретируемых белков включают, но не ограничиваются ими, гормоны, ферменты, токсины и антимикробные пептиды.

[0060] Нацеливающий компонент может быть локализованным или он может находиться в конкретном участке-мишени, например, в опухоли, в очаге заболевания, в ткани, в органе, в клетках различных типов, в инфицирующей бактерии или в вирусе и т.п.

[0061] Так, например, предполагаемые нацеливающие компоненты включают пептид, полипептид, белок, гликопротеин, аптамер, углевод или липид. Нацеливающим компонентом может быть встречающийся в природе или синтетический лиганд для

рецептора клеточной поверхности, например, фактор роста, гормон, ЛПНП, трансферрин и т.п. Нацеливающим компонентом может быть антитело, и термин «антитело» включает фрагменты антител и его производные, специфические часты антител, одноцепочечные нацеливающие фрагменты, которые могут быть идентифицированы, например, с применением таких процедур, как фаговое представление. Нацеливающими компонентами также могут быть нацеливающий пептид, нацеливающий пептидомиметик или небольшая молекула, встречающаяся в природе или искусственно созданная (например, путем химического синтеза).

[0062] В одном варианте осуществления изобретения, нацеливающий компонент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, белка, пептида и аптамера, а также небольшой молекулы.

[0063] Специалистам известны антитела против антигенов, ассоциированных с опухолью. Так, например, антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с маркерами, продуцируемыми опухолями или ассоциированными с ними, были описаны, среди прочих, в патенте США No. 3927193 Hansen и в патентах США No. 4331647, 4348376, 4361544, 4468457, 4444744, 4818709 и 4624846 Goldenberg, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. В частности, предпочтительно использовать антитела против антигена, связанного с опухолью, например, с опухолью желудочно-кишечного тракта, легких, молочной железы, предстательной железы, яичников, яичек, головного мозга или с лимфатической или гематогенной опухолью, саркомой или меланомой. Антитела против антигенов, ассоциированных с опухолью, хорошо известны специалистам в данной области.

[0064] Антитела согласно изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, внутриклеточные антитела («внутриклеточные тельца»), фрагменты антител (например, Fv, Fab и F(ab)₂), полуантитела, гибридные производные, а также одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела и деиммунизованные или гуманизованные антитела (см. публикации Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Houston et al., «Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an anti-Digoxin single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); Bird et al., «Single-Chain Antigen-Binding Proteins, *Science* 242:423-426 (1988), каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0065] Антитела согласно изобретению также могут быть получены с применением технологии рекомбинантных ДНК, например, такими антителами являются антитело или его фрагмент, экспрессируемый бактериофагом. Альтернативно, синтетическое антитело получают путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей и экспрессирующей антитело согласно изобретению или синтеза аминокислотной последовательности, определяющей антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которые являются

доступными и хорошо известны специалистам в данной области.

[0066] Способы получения моноклональных антител могут быть осуществлены с применением методик, описанных в настоящей заявке, или хорошо известных специалистам в данной области (см. публикацию *Monoclonal Antibodies - Production, Engineering and Clinical Applications* (Mary A. Ritter and Heather M. Ladyman eds., 1995), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Обычно, такой способ включает получение иммунных клеток (лимфоцитов) из селезенки млекопитающего, которая ранее была иммунизирована представляющим интерес антигеном либо *in vivo*, либо *in vitro*.

[0067] Альтернативно, моноклональные антитела могут быть получены с применением методов рекомбинантных ДНК, как описано в патенте США № 4816567, выданном Cabilly et al., который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют из зрелых В-клеток или клеток гибридомы, например, методом ОТ-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, которые специфически амплифицируют гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем клонируют в подходящие экспрессионные векторы, которые при трансфекции в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, COS-клетки обезьян, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые иным образом не продуцируют белок иммуноглобулина, генерируют моноклональные антитела клетками-хозяевами. Кроме того, рекомбинантные моноклональные антитела или их фрагменты нужных видов могут быть выделены из библиотек фагового представления (см. публикацию McCafferty et al., «Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains», *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson et al., «Making Antibody Fragments using Phage Display Libraries», *Nature* 352:624-628 (1991); and Marks et al., «By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage», *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0068] Полинуклеотид(ы), кодирующий(е) моноклональное антитело, может (могут) быть дополнительно модифицирован(ы) с применением технологии рекомбинантных ДНК для получения альтернативных антител или их производных. Так, например, константные домены легкой и тяжелой цепей мышинового моноклонального антитела могут быть заменены этими областями, полученными из человеческого антитела, для продуцирования химерного антитела. Альтернативно, константные домены легкой и/или тяжелой цепей моноклонального антитела могут быть заменены неиммуноглобулиновым полипептидом для получения слитого антитела. В других вариантах осуществления изобретения, константные области подвергают усечению или удаляют для получения желаемого фрагмента моноклонального антитела. Кроме того, сайт-направленный мутагенез варибельной области или мутагенез высокой плотности может быть применен для оптимизации специфичности и аффинности моноклонального антитела.

[0069] Моноклональное антитело согласно изобретению может представлять собой гуманизованное антитело. Гуманизованные антитела представляют собой антитела, которые содержат минимальные последовательности не-человеческих (например, мышинных) антител в пределах вариабельных областей. Такие антитела используются в терапии для снижения антигенности и гуморальных ответов в виде вырабатывания человеческих антимышиных антител при введении индивидууму-человеку. На практике, гуманизованные антитела обычно представляют собой человеческие антитела с минимальными или вообще отсутствующими нечеловеческими последовательностями. Человеческое антитело представляет собой антитело, продуцируемое человеком, или антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком.

[0070] В дополнение к полноразмерным антителам, настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие части таких антител. Такие связывающие части включают одновалентные Fab-фрагменты, Fv-фрагменты (например, одноцепочечное антитело, scFv) и одноцепочечные вариабельные домены V_H и V_L , а также $F(ab')_2$ -фрагменты, бис-scFv, диантитела, триантитела, минительца и т.п. Эти фрагменты антител могут быть получены с применением обычных процедур, таких как процедуры протеолитической фрагментации, как описано в публикациях James Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE 98-118 (Academic Press, 1983) and Ed Harlow and David Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки, или другие методы, известные специалистам в данной области.

[0071] Также может оказаться желательным, особенно в случае фрагментов антитела, модифицировать антитело для увеличения периода его полужизни в сыворотке. Это может быть достигнуто, например, путем включения эпитопа, связывающегося с рецептором «спасения», во фрагмент антитела путем мутации соответствующей области во фрагменте антитела или путем включения эпитопа в пептидную метку, которая затем связывается с фрагментом антитела на любом конце или в середине (например, посредством синтеза ДНК или пептида).

[0072] Антитела-миметики могут быть также использованы в соответствии с настоящим изобретением. Специалистам в данной области известен ряд антител-миметиков, включая, но не ограничиваясь ими, антитела, известные как моноантитела, которые были получены из десятого домена человеческого фибронектина типа III ($^{10}Fn3$) (см. публикации Koide et al., «The Fibronectin Type III Domain as a Scaffold for Novel Binding Proteins», *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151 (1998); Koide et al., «Probing Protein Conformational Changes in Living Cells by Using Designer Binding Proteins: Application to the Estrogen Receptor», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1253-1258 (2002), каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки); и антитела, известные как аффинные антитела, которые были получены из стабильного альфа-спирального домена Z бактериального рецептора стафилококкового белка A (см. публикацию Nord et al., «Binding

Proteins Selected from Combinatorial Libraries of an alpha-helical Bacterial Receptor Domain», *Nature Biotechnol.* 15(8):772-777 (1997), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0073] В определенных вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент нацелен на рецептор мембранного антигена, специфичного для предстательной железы (PSMA).

[0074] Используемый здесь термин «PSMA» или «белок мембранного антигена», специфичного для предстательной железы, относится к PSMA млекопитающих, а предпочтительно к белку PSMA человека. PSMA иногда называют фолатгидролазой 1 (FOLH1), поскольку PSMA кодируется геном FOLH1. Длинный транскрипт PSMA кодирует белковый продукт с молекулярной массой приблизительно 100-120 кДа, характеризующийся как трансмембранный рецептор типа II, имеющий гомологию последовательности с рецептором трансферрина и обладающий NAALADазной активностью (см. публикации Carter et al., «Prostate-Specific Membrane Antigen is a Hydrolase With Substrate and Pharmacologic Characteristics of a Neuropeptidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:749-753 (1996); Israeli et al., «Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-Specific Membrane Antigen», *Cancer Research* 53:227-230 (1993), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки).

[0075] Моноклональные антитела против PSMA могут быть использованы в качестве нацеливающего компонента в бифункциональной терапии согласно изобретению. Предпочтительно, моноклональные антитела связываются с внеклеточным доменом PSMA (то есть, с эпитопом PSMA, расположенным вне клетки, таким как последовательность приблизительно из 44-750 аминокислот человеческого PSMA, аминокислотные остатки которого соответствуют последовательности человеческого PSMA, раскрытой в патенте США № 5538866, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки). Примерами мышинных моноклональных антител против PSMA человека являются, но не ограничиваются ими, E99, J415, J533 и J591, которые продуцируются гибридными клеточными линиями, имеющими номер доступа ATCC HB-12101, HB-12109, HB-12127 и HB-12126, соответственно, и все эти гибридные клеточные линии описаны в патенте США № 6107090 и в патенте США № 6136311, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Наиболее предпочтительно, мышинным моноклональным антителом является J591, продуцируемое HB-12126, или деиммунизованное антитело J591, описанное в патентах США № 7045605 и 7514078, Bander et al., которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0076] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент нацелен на член семейства рецепторов HER. Репрезентативным нацеливающим компонентом члена семейства рецепторов HER является моноклональное антитело 4D5.

[0077] В некоторых вариантах настоящего изобретения, нацеливающим компонентом является пептид, который связывается с ассоциированным с опухолью антигеном. Репрезентативными пептидами являются, но не ограничиваются ими,

производные глутамата-мочевины-лизина, такие как 2-(3-99S)-5-амино-1-карбокситетрагидропентандиоевая кислота (ACUPA), которая связывается с FOLH1/PSMA, производные соматостатина, которые связываются с SSTR2, и пептид Arg-Gly-Asp (RGD), который связывается с альфа-v/бета-3-интегрином.

[0078] Пептиды, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены в соответствии с известными протоколами выделения и очистки из природных источников, могут быть синтезированы стандартными методами твердофазного или жидкофазного пептидного синтеза с применением известной пептидной последовательностью, или они могут быть получены из коммерчески доступных препаратов или пептидных библиотек. В настоящее изобретение включены пептиды, которые обладают биологическими связывающими свойствами нативного пептида и сохраняют специфические свойства связывания нативного пептида. Производные и аналоги пептида, используемые в настоящей заявке, включают модификации в составе, идентичность и деривитизацию отдельных аминокислот пептида при условии, что этот пептид сохраняет специфические связывающие свойства нативного пептида. Примерами таких модификаций являются модификация любой из аминокислот для включения D-стереоизомера, замена в ароматической боковой цепи ароматической аминокислоты, деривитизация амино- или карбоксильных групп в боковых цепях аминокислоты, содержащей такую группу в боковой цепи, замены в амино- или карбоксильном конце пептида, связывание пептида со вторым пептидом или с биологически активной частью и циклизация пептида (см. публикацию G. Van Binst and D. Tourwe, «Backbone Modifications in Somatostatin Analogues: Relation Between Conformation and Activity», *Peptide Research* 5:8-13 (1992), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0079] Используемые здесь «небольшие молекулы» обычно представляют собой органические, пептидные или непептидные молекулы, имеющие молекулярную массу менее 10000 Да, предпочтительно менее 5000 Да, более предпочтительно менее 1000 Да, а наиболее предпочтительно менее 500 Да. Этот класс модуляторов включает химически синтезированные молекулы, например, соединения, происходящие из комбинаторных химических библиотек.

[0080] В определенных вариантах осуществления изобретения, нацеливающим компонентом является аптамер. Аптамеры представляют собой небольшие одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, которые специфически связываются со своими молекулами-мишенями (например, антигеном, ассоциированным с опухолью) с высокой аффинностью и специфичностью. Аптамеры получают посредством процесса отбора *in vitro*, называемого систематизированной эволюцией лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX), которая описана в публикациях Ellington et al., «*In vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands», *Nature* 346:818-822 (1990) и Jayasena, «Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics», *Clin. Chem.* 45:1628-1650 (1999), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Было разработано несколько аптамеров, способных нацеливаться на

ассоциированные с опухолью антигены, включая, но не ограничиваясь ими, MUC1, HER2, HER3, EpCAM, NF- κ B, PSMA, CD44, PD-1, CD137, CD134, PDGF, VEGF и NCL (см. публикацию Jayasena, «Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics», *Clin. Chem.* 45:1628-1650 (1999), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0081] Используемый здесь термин «фермент» охватывает любой фермент, белок или пептид, который, при их доставке в опухоль или ткань с помощью нацеливающего компонента, катализирует превращение опухоли или ткани в несовместимый аллотрансплантат.

[0082] В одном варианте осуществления изобретения, фермент представляет собой фермент, участвующий в посттрансляционной модификации, и выбран из группы, состоящей из трансферазы и гликозилтрансферазы.

[0083] Трансфераза представляет собой любой из класса ферментов, которые осуществляют перенос специфических функциональных групп (например, метильной или гликозильной группы) с одной молекулы (называемой донором) на другую (называемую акцептором).

[0084] Репрезентативные группы трансфераз включают, но не ограничиваются ими, гликозилтрансферазы. Гликозилтрансферазы катализируют поэтапное добавление активированных сахаров (донорных NDP-сахаров) к белку, гликопротеину, липиду или гликолипиду или к невосстанавливаемому концу растущего олигосахарида (см. публикацию Lairson et al., «Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms», *Annu. Rev. Biochem.* 77:521-55 (2008), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Гликозилтрансферазы хорошо известны специалистам в данной области.

[0085] У млекопитающих присутствуют 9 сахаро-нуклеотидов доноров для гликозилтрансфераз: UDP-глюкоза, UDP-галактоза, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-ксилоза, UDP-глюкуроновая кислота, GDP-манноза, GDP-фукоза и CMP-сиаловая кислота.

[0086] Для ферментативного синтеза сахаридов, который включает гликозилтрансферазные реакции, гликозилтрансферазу можно клонировать или выделить из любого источника. Известны многие клонированные гликозилтрансферазы, равно как и их полинуклеотидные последовательности (см., например, публикацию «The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases», Taniguchi et al., 2002, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, Springer, Токио, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Аминокислотные последовательности гликозилтрансферазы и нуклеотидные последовательности, кодирующие гликозилтрансферазы, из которых могут быть выведены аминокислотные последовательности, также хорошо известны специалистам в данной области.

[0087] Гликозилтрансферазы, которые могут быть использованы в способах согласно изобретению, включают, но не ограничиваются ими, галактозилтрансферазы, фукозилтрансферазы, глюкозилтрансферазы, N-ацетилгалактозаминилтрансферазы, N-

ацетилглюкозаминилтрансферазы, глюкуронилтрансферазы, сиалилтрансферазы, маннозилтрансферазы, трансферазы глюкуроновой кислоты, трансферазы галактуроновой кислоты и олигогликозилтрансферазы. Подходящие гликозилтрансферазы включают трансферазы, которые были получены из эукариот, а также из прокариот.

[0088] Гликозилтрансферазы имеют решающее значение для генеза системы антигенов группы крови АВО. Как описано выше, система группы крови АВО является первичной антигенной системой, играющей важную роль при переливании крови и при трансплантации твердых органов. Эта система гисто-антигенов группы крови (НВГА) регулируется активностью гликозилтрансфераз GТA и/или GТB, которые присоединяют остатки сахара (N-ацетилгалактозамина или галактозы) к общему субстрату (H-антигену). Фермент имеет несколько фенотипических вариантов, которые либо модифицируют присоединенный углевод (N-ацетилгалактозамин (A) или галактозу (B)), либо вызывают потерю функции фермента, а поэтому H-антиген не модифицируется (O). Вариант A, A2, имеет пониженный уровень активности N-ацетилгалактозамина и добавления NAc-gal. В настоящее время, эти варианты различают с помощью серологического анализа и анализа на связывание с лектином (см. определение A1 и A2). Серологический анализ может либо обнаруживать модификацию H-антигена, либо он может обнаруживать присутствие встречающихся в природе антител против A и/или B (например, у человека с B-паттерном гликозилирования будут присутствовать антитела против A).

[0089] У человека, локус гликозилтрансферазы, называемый здесь локусом АВО или локусом гликозилтрансферазы АВО, расположен на хромосоме 9 и содержит семь экзонов, которые охватывают интервал более, чем 18 т.п.о. геномной ДНК. Экзон 7 является самым большим и содержит большую часть кодирующей последовательности. Локус АВО имеет три основные аллельные формы: А, В и О. «Аллель» А (также называемый А1 или А2) кодирует гликозилтрансферазу, которая ферментативно добавляет N-ацетилгалактозамин к D-галактозному концу H-антигена, продуцируя так называемый А-антиген. Аллель В кодирует гликозилтрансферазу, которая ферментативно добавляет D-галактозу к D-галактозному концу H-антигена, создавая таким образом так называемый В-антиген. Аллель О кодирует нефункциональную форму гликозилтрансферазы, в результате чего образуется немодифицированный H-антиген, создающий так называемый фенотип О-антигена.

[0090] На геномном уровне, ген гликозилтрансферазы АВО имеет множество аллелей (~300). Эти встречающиеся в природе аллельные варианты описаны в публикациях Yip, «Sequence Variation at the Human ABO Locus», *Ann. Hum. Genet.* 66:1-27 (2002); Nakomori «Antigen Structure and Genetic Basis of Histo-Blood Group A, B, and O: Their Changes Associated with Human Cancer» *Biochimica et Biophysica Acta* 1473:247-266 (1999); Seto et al., «Sequential Interchange of Four Amino Acids from Blood Group B to Blood Group A Glycosyltransferase Boosts Catalytic Activity and Progressively Modifies Substrate Recognition in Human Recombinant Enzymes», *J. Biol. Chem.* 272:14133-14138 (1997), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки, и рассматривается их

использование в бифункциональной терапии согласно изобретению. Последовательность, кодирующая каталитический сайт фермента, находится в экзоне 7 гена; ключевые аминокислотные остатки 176, 235, 266 и 268 регулируют специфичность этого активного центра. Кроме того, обычная делеция нуклеотида в экзоне 6 создает стоп-кодон, который отменяет синтез полноразмерной гликозилтрансферазы и сообщает фенотип О или нулевой фенотип.

[0091] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазу выбирают из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминлитрансферазы), гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-галактозилтрансферазы), альфа-gal-трансферазы и гликозилтрансферазы А (Gly268Ala). Также рассматриваются аллельные варианты, описанные выше.

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансфераза, используемая в способе согласно изобретению, является фукозилтрансферазой. Фукозилтрансферазы известны специалистам в данной области. Примерами фукозилтрансфераз являются ферменты, которые переносят L-фукозу из GDP-фукозы в гидроксильное положение акцепторного сахара. Фукозилтрансферазы, которые переносят нуклеотидные сахара к акцептору, также могут быть использованы в настоящем изобретении.

[0093] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансфераза представляет собой гуманизованную или деиммунизированную гликозилтрансферазу. Способы гуманизации и/или деиммунизации белков известны специалистам в данной области.

[0094] Соответственно, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к изменению экспрессии антигена группы крови в опухоли и/или кровоснабжения опухоли посредством гликозилтрансферазы, нацеленной на опухоль. Как описано выше, это способствует эффективному преобразованию фенотипа опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, и тем самым инициации сверхострого отторжения.

[0095] Описанное здесь бифункциональное терапевтическое средство может быть получено таким образом, что нацеливающим компонентом является белок или пептид, связанный с ферментом посредством пептидной связи.

[0096] В некоторых вариантах осуществления изобретения, белковый или пептидный нацеливающий компонент, связанный с ферментом посредством пептидной связи, может упоминаться здесь как химерный или слитый белок. Используемый здесь термин «химерный белок» или «слитый белок» охватывает полипептид, имеющий единственную непрерывную полипептидную цепь, то есть, ряд смежных аминокислот, соединенных пептидными связями, или ряд полипептидных цепей, ковалентно или нековалентно связанных друг с другом (то есть, полипептидный комплекс), которые включает по меньшей мере часть полноразмерной последовательности первой полипептидной последовательности и по меньшей мере часть полноразмерной

последовательности второй полипептидной последовательности, где первый и второй полипептиды являются разными полипептидами. Химерный полипептид также охватывает полипептиды, которые включают две или более несмежных частей, полученных из одного и того же полипептида. Химерный полипептид или белок также включает полипептиды, имеющие по меньшей мере одну замену, причем, химерный полипептид включает первую полипептидную последовательность, в которой часть первой полипептидной последовательности была заменена частью второй полипептидной последовательности. Ряд полипептидных цепей может быть ковалентно связан посредством подходящего биохимического линкера или дисульфидной связи.

[0097] Связывание нацеливающего компонента и фермента также может быть достигнуто посредством химического связывания (см. публикацию Brennan et al., «Preparation of Bispecific Antibodies by Chemical Recombination of Monoclonal Immunoglobulin G1 Fragments», *Science* 229:81-3 (1985), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки) или химического сочетания (см. публикацию Shalaby et al., «Development of Humanized Bispecific Antibodies Reactive With Cytotoxic Lymphocytes and Tumor Cells Overexpressing the HER2 Protooncogene», *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0098] В других вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент и фермент могут быть связаны посредством нековалентных связей, включая, но не ограничиваясь ими, водородные связи, ионные связи, ван-дер-ваальсовы силы и гидрофобные взаимодействия.

[0099] Таким образом, слияние или связывание между нацеливающим компонентом (например, антителом) и ферментом может быть достигнуто посредством обычных ковалентных или ионных связей, слияниями белков с помощью генной инженерии или с использованием гетеробифункциональных сшивающих агентов, например, карбодиимида, глутаральдегида и т.п. При этом, могут быть также использованы обычные инертные линкерные последовательности (например, пептидные линкеры), которые просто обеспечивают желаемое пространство между нацеливающим компонентом и ферментом. Конструкция таких линкеров хорошо известна специалистам в данной области и описана, например, в патентах США № 8580922; 5525491; и 6165476, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Для ковалентного конъюгирования белков могут быть использованы различные связывающие агенты. Примерами сшивающих агентов являются белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, публикации Karpovsky et al., «Production of Target-Specific Effector Cells Using Hetero-Cross-Linked Aggregates Containing Anti-Target Cell and Anti-Fc Gamma Receptor Antibodies», *J. Exp. Med.* 160(6):1686-701 (1984); Liu et al., «Heteroantibody Duplexes Target Cells for Lysis by Cytotoxic T Lymphocytes», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(24):8648-52 (1985), которые в полном объеме

включены в настоящее описание посредством ссылки). Другие способы включают способы, которые описаны в публикациях Paulus, *Behring Ins Mitt* No 78, 1 18-132 (1985); Brennan et al., «Preparation of Bispecific Antibodies by Chemical Recombination of Monoclonal Immunoglobulin G1 Fragments», *Science* 229:81-83 (1985); Glennie et al., «Preparation and Performance of Bispecific F(ab' gamma)2 Antibody Containing Thioether-Linked Fab' Gamma Fragments» *J. Immunol.* 139:2367-2375 (1987), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки).

[00100] Ряд других линкеров может быть использован для связывания нацеливающего компонента с ферментом. Так, например, может быть использована дисульфидная связь, как описано в публикации Saito et al., *Adv. Drug Delivery Reviews* 55:199-215 (2003), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Также могут быть использованы линкеры, чувствительные к более низкому значению pH в эндосомах или в опухолевой среде, включая гидразоны, кетали и/или аконитовые кислоты. Также может быть использован гибридный линкер, например, линкер с двумя или более потенциальными сайтами расщепления, например, дисульфид и гидразон. Также могут быть использованы чувствительные к пептидазе линкеры, например, специфичные для опухоли пептидазы, например, линкеры, чувствительные к расщеплению PSA. Также могут быть использованы ПЭГ-линкеры (см. публикацию Wiest et al., *Oncogene* 21:4257-4265 (2002), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Репрезентативные линкеры включают гидразоновые и дисульфидные гибридные линкеры (см. публикацию Hamann et al., *Bioconjugate Chem.* 13:47-58 (2002); Hamann et al., *Bioconjug Chem.* 13(1):40-6 (2002), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки); SPP (Immunogen); и множество линкеров, доступных от Pierce Biotechnology, Inc. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкером является SSP (дисульфидный линкер, поставляемый Immunogen), и соотношение линкера к антителу может варьироваться, например, от 7:1 до 4:1. Различные последовательности спейсеров и линкеров известны специалистам в данной области и описаны в публикации Chen et al., «Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality», *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(10):1357-69 (2013), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[00101] Термин «пептидный линкер» или «спейсер» относится к короткому пептидному фрагменту, который соединяет или связывает в пары нацеливающий компонент и ферментные фрагменты полипептида бифункционального терапевтического средства. Линкер предпочтительно состоит из аминокислот, соединенных вместе пептидными связями. Так, например, пептидный линкер может содержать небольшие аминокислотные остатки или гидрофильные аминокислотные остатки (например, глицин, серин, треонин, пролин, аспарагиновую кислоту, аспарагин и т.п.). Так, например, пептидные линкеры представляют собой пептиды с аминокислотной последовательностью длиной по меньшей мере в 5 аминокислот, или длиной приблизительно от 5 до приблизительно 100 аминокислот, или длиной приблизительно от 10 до 50 аминокислот,

или длиной приблизительно от 10 до 15 аминокислот.

[00102] В одном примере, линкер состоит из большинства аминокислот, которые являются стерически незатрудненными, такие как глицин и аланин. Таким образом, в другом примере, линкерами являются полиглицины, полиаланины или полисерины.

[0100] Специалисту в данной области будет очевидно, что многие обычно используемые пептидные линкеры могут быть использованы в вариантах осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, короткие пептидные линкеры могут содержать повторяющиеся звенья для увеличения длины линкера. Так, например, может быть использован двойной, тройной или четырехкратно повторяющийся линкер. В одном примере, линкер имеет формулу (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO:1) или формулу (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n Ser (SEQ ID NO:2), где n представляет собой число от 3 до 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер представляет собой линкер (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67).

[0101] Также могут быть использованы непептидные линкеры или спейсеры. Так, например, могут быть использованы алкильные линкеры, такие как -NH-(CH₂)_s-C(O)-, где s=2-20. Эти алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой стерически незатрудненной группой, такой как низший алкил (например, C1-C6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂, фенил. Примерами непептидного линкера являются ПЭГ-линкер или спейсер, имеющий молекулярную массу от 100 до 5000 кД, предпочтительно от 1000 до 2000 кД и более предпочтительно 1500 кД.

[0102] Бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению может включать N-конец, соединенный с C-концом. N-конец и C-конец используются здесь для обозначения N-концевой области или части и C-концевой области или части, соответственно, бифункционального терапевтического белка согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, C-концевая часть и N-концевая часть бифункционального терапевтического средства согласно изобретению присоединены друг к другу. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, C-концевая часть и N-концевая часть бифункционального терапевтического средства согласно изобретению соединены промежуточным спейсером. В одном варианте осуществления изобретения, спейсер может представлять собой полипептидную последовательность из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, C-концевая часть и/или N-концевая часть бифункционального терапевтического средства согласно изобретению может включать дополнительную(ые) часть(части), связанную(ые) с C-концевым остатком и/или N-концевым остатком химерного белка согласно изобретению, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, дополнительная(ые) часть(части) может(могут) быть полипептидной последовательностью из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, N-концевая часть и/или C-концевая часть, имеющие такую(ие) дополнительную(ые) часть(и), будут поддерживать активность соответствующей природной N-концевой части нацеливающего компонента

и/или С-концевой части фермента, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, N-концевая часть и/или С-концевая часть, имеющие такую(такие) дополнительную(ые) часть(и), будут обладать усиленной и/или пролонгированной активностью по сравнению с соответствующей встречающейся в природе N-концевой частью нацеливающего компонента и/или С-концевой частью фермента, соответственно. В других вариантах осуществления изобретения, С-концевая часть и/или N-концевая часть бифункционального терапевтического средства согласно изобретению не включают какую-либо (какие-либо) дополнительную(ые) часть(части), связанную(ые) с С-концевым остатком и/или N-концевым остатком химерного белка согласно изобретению, соответственно.

[0103] В одном варианте осуществления изобретения, N-концевая область содержит нацеливающий компонент. В определенных вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, включающую, но не ограничивающуюся ими, мономерные одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, Fab'2, scFv и другие производные фрагмента антитела, такие как миниантитела, диаантитела и триантитела. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут сохранять или удалять FcRn-связывающий домен.

[0104] В одном варианте осуществления изобретения, N-концевая область содержит тяжелую цепь J591 человека и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 (с регистрационным номером GenBank CCA78124.1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), или ее часть, представленные ниже:

EVQLQSGGPE LVKPGTSVRI SCKTSGYTFT EYTIHWVKQS HGKSLEWIGN
INPNNGGTTY NQKFEDKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCAAGW
NFDYWGQGTTLTVSS

[0105] В другом варианте осуществления изобретения, N-концевая область содержит легкую цепь J591 человека и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 (с регистрационным номером GenBank CCA78125.1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), или ее часть, представленные ниже:

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLAITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA GTKLEIKR

[0106] В другом варианте осуществления изобретения, N-концевая область содержит тяжелую цепь 4D5 человека и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или ее часть, представленные ниже:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADDTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGTLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ

VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK.

[0107] В другом варианте осуществления изобретения, N-концевая область содержит легкую цепь 4D5 человека и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6 или ее часть, представленные ниже:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

[0108] В соответствии с вышеизложенным, в некоторых вариантах осуществления изобретения, C-концевая область содержит фермент.

[0109] В одном варианте осуществления изобретения, C-концевая область содержит каталитический домен гликозилтрансферазы В (GTB) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (с регистрационным номером GenBank AM423112.1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), или ее часть, представленные ниже:

MAEVLRTLGA KPKCHALRPM ILFLIMLVLV LFGYGVLSR SLMPGSLERG
FCMAVREPDH LQRVSLPRMV YPQPKVLTPC RKDVLVVTPW LAPIVWEGTF
NIDILNEQFR LQNTTIGLTV FAIKKYVAFL KLFLATAEKH FMVGHVRVHYY
VFTDQPAAVP RVTLTGTGRQL SVLEVGAYKR WQDVSMRME MISDFCERRF
LSEVDYLVCV DVDMEFRDHV GVEILTPLFG TLHPSFYGSS REAFTYERRP
QSQAYIPKDE GDFYYMGAFF GGSVQEVQRL TRACHQAMMV DQANGIEAVW
HDESHLNKYL LRHKPTKVLSP EYLWDQQLL GWPAVLRKLR FTAVPKNHQA VRNP

[0110] В другом варианте осуществления изобретения, C-концевая область содержит последовательность «цис-А, В», которая генерирует гибридную последовательность GTB и GTA и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 (с регистрационным номером GenBank ABL75287.1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), или ее часть, представленные ниже:

YVAFLKLFLE TAEKHFVGVH RVHYYVFTDQ PAAVPRVTLG TGRQLSVLEV
GAYKRWQDVS MRRMEMISDF CERRFLSEVD YLVCVDVDME FRDHVGVAIL
TPLFGTLHPS FYGSSREAFT YERRPQSQAY IPKDEGDFYY MGGFFGGSVQ
EVQRLTRACH QAMMVDQANG IEAVWHDESH LNKYLLRHKP TKVLSPEYLW
DQQLLGWPAV LRKLRFTAVP KNHQAVRNP

[0111] В другом варианте осуществления изобретения, C-концевая область содержит каталитический домен гликозилтрансферазы А (GTA) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 (с регистрационным номером GenBank AFB74122.1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), или ее часть, представленные ниже:

MAEVLRTLGA KPKCHALRPM ILFLIMLVLV LFGYGVLSR SLMPGSLERG
FCMAVREPDH LQRVSLPRMV YPQPKVLTPC RKDVLVVTPW LAPIVWEGTF

NIDILNEQFR LQNTTIGLTV FAIKKYVAFL KLFLETAEKH LMVGHRVHYY
 VFTDQPAAVP RVTLTGTGRQL SVLEVRAYKR WQDVSMRRME MISDFCERRF
 LSEVDYLVCV DVDMEFRDHV GVEILTPLFG TLHPGFYSS REAFTYERRP
 QSQAYIPKDE GDFYYLGGFF GGSVQEVQRL TRACHQAMMV DQANGIEAVW
 HDESHNLKYL LRHKPTKVLV PEYLWDQQLL GWPAVLRKLR FTAVPKNHQA VRNP

[0112] В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль, имеющая ассоциированный с опухолью антиген, экспрессирует Н-антиген. Используемый здесь термин «Н-антиген» относится к олигосахаридной цепи, имеющей концевой дисахарид фукозу-галактозу, где фукоза имеет альфа-(1-2)-связь. Н-антиген продуцируется фукозилтрансферазой и является структурным элементом для продуцирования антигенов А или В в системе группы крови АВО.

[0113] Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения рака. Этот способ включает выбор индивидуума, страдающего раком, и получение бифункционального терапевтического средства согласно изобретению. Бифункциональное терапевтическое средство вводят выбранному индивидууму в условиях, эффективных для лечения рака.

[0114] С использованием описанного здесь бифункционального средства можно лечить практически любую опухоль, экспрессирующую Н-антиген, включая, но не ограничиваясь ими, опухоли предстательной железы, карциному коры надпочечников, опухоли заднего прохода, опухоли аппендикса, астроцитому (детскую мозжечковую или церебральную), базальноклеточную карциному, опухоли желчных протоков, опухоли мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркому/злокачественные фиброзные гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, эпендимомы, медуллобластомы, опухоли молочной железы, бронхиальные аденомы/карциноиды, лимфомы Беркитта, карциноидные опухоли, опухоли шейки матки, детские опухоли, хондросаркомы, опухоли толстой кишки, кожные Т-клеточные лимфомы, десмопластические мелкоклеточные круглоклеточные опухоли, опухоли эндометрия, опухоли пищевода, саркомы Юинга, ретинобластомы, опухоли желчного пузыря, опухоли желудка (кишечника), желудочно-кишечные стромальные опухоли, опухоли зародышевых клеток, трофобластические опухоли при беременности, опухоли головы и шеи, опухоли сердца, гепатоцеллюлярные опухоли (печени), лимфомы Ходжкина, гипофарингеальные опухоли, карциномы островковых клеток (эндокринные опухоли поджелудочной железы), саркомы Капоши, опухоли почек, опухоли гортани, опухоли губ и полости рта, немелкоклеточные опухоли легких, мелкоклеточные опухоли легких, лимфомы, меланомы, опухоли клеток Меркеля, мезотелиомы, множественную эндокринную неоплазию, множественные миеломы, опухоли носоглотки, нейробластомы, олигодендроглиомы, опухоли полости рта, опухоли ротоглотки, опухоли яичников, опухоли поджелудочной железы, плевропульмональные опухоли, первичные лимфомы центральной нервной системы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, опухоли слюнных желез, саркомы мягких тканей, саркомы матки, опухоли кожи (не-меланомы), опухоли тонкой кишки, плоскоклеточные карциномы,

опухоли желудка, опухоли яичек, опухоли горла, тимому и карциномы вилочковой железы, опухоли щитовидной железы, трофобластные опухоли и опухоли мочеиспускательного канала.

[0115] Некоторые виды рака, включая, но не ограничиваясь ими, гематопоэтический или лимфоидный рак, рак мезодермального происхождения, саркомы, нейроэктодермальный рак и т.п., могут не экспрессировать Н-антиген. Это может быть легко определено с помощью проточной цитометрии или иммуногистохимии образца опухоли посредством связывания Ulex с лектином для выявления присутствия или отсутствия Н. Если Н отсутствует, то лечение в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнено двумя способами, то есть, можно использовать целевую фукозилтрансферазу для добавления Н-антигена до или во время введения целевой гликозилтрансферазы, как было описано ранее. Альтернативно, может быть добавлен фермент альфа-galT, который может присоединять конечную галактозу и не требует присутствия 1,2-фукозы (Н-антигена).

[0116] В одном варианте осуществления изобретения, нацеливающий компонент бифункционального терапевтического средства нацелен на рецептор PSMA на эндотелии сосудов опухоли. Уже сообщалось об экспрессии PSMA в новообразованной сосудистой сети различных опухолей, но такая экспрессия отсутствует в сосудистой сети нормальной ткани. Типичные типы тканей, которые имеют PSMA-положительный сосудистый эндотелий, включают, но не ограничиваются ими, ткани почек, легких, толстой кишки, желудка, молочной железы, головного мозга, поджелудочной железы, печени, мочевого пузыря, пищевода, надпочечника, головы и шеи, меланомы и опухоли головного мозга. Другие варианты осуществления изобретения включают нацеливание на PSMA, экспрессирующийся на поверхности клеток рака предстательной железы, нацеливание на HER2 при раке молочной железы и других HER2-позитивных раковых заболеваниях, нацеливание на CD19 при раке В-клеточной линии и нацеливание на CEA при колоректальном раке. Другие применимые мишени описаны выше.

[0117] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к бифункциональному терапевтическому средству, которое включает нацеливающий компонент, содержащий аминокислотную последовательность из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести CDR, как представлено здесь в Таблицах 1 и 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит модифицированную аминокислотную последовательность, где модифицированная аминокислотная последовательность имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности любой одной, двух, трех, четырех, пяти или шести CDR, представленной в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. CDR-последовательности с тяжелой цепью подходящих антител с нацеливающим компонентом

Название клона	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательно	SEQ	Последовательно	SE	Последовательно	SE

mAb/Fab	сть	ID NO:	сть	Q ID NO:	ть	Q ID NO:
J591*	GYTFTEYTIH	10	NINPNNGGTTYN QKFED	1 3	GWNFDY	16
4D5**	GFNIKDTYIH	11	RIYPTNGYTRYA DSVKG	1 4	WGGDGFYAMDY W	17
обекселимаб *** (XmAb5871)	SYVMH	12	YINPYNDGTKY NEKFQG	1 5	GTYYYYGTRVFDY	18

*См. публикацию заявки на патент США № 2006/0088539, фиг. 2А-2В, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки; **см. патент США № 5821337, фиг. 1А-1В, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки; ***см. EP2059536; PCT/US2007/075932, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Таблица 2. Последовательности CDR легкой цепи подходящих антител с нацеливающим компонентом

Название клона mAb/Fab	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
J591*	KASQDVGTAVD	19	WASTRHT	22	QQYNSYPLT	25
4D5**	RASQDVNTAVA W	20	SASFLYS	23	QQHYTTPP	26
Обекселимаб *** (XmAb5871)	RSSKSLQNVNGN TYLY	21	RMSNLNS	24	MQHLEYPIT	27

*См. публикацию заявки на патент США № 2006/0088539, фиг. 2А-2В, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки; **см. патент США № 5821337, фиг. 1А-1В, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки; ***см. EP2059536; PCT/US2007/075932, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0118] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь переменные области тяжелой цепи и/или легкой цепи молекулы на основе антител дополнительно содержат каркасные области тяжелой цепи и/или легкой цепи человеческого иммуноглобулина или гуманизованного иммуноглобулина, соответственно.

[0119] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нацеливающий компонент содержит одну или две из последовательностей, представленных здесь в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит модифицированную аминокислотную последовательность, где модифицированная аминокислотная последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой одной или двум последовательностям, представленным в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности переменной области тяжелой (V_H) и легкой цепи (V_L) антитела

Название клона mAb/Fab	Область	Последовательность[†]	SEQ ID NO:
J591*	V _H	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIH WVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK ATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDNAVYYCAAGW NFDYWGQGTLTIVSS	28
J591*	V _L	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVD WYQQKPGSPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKV DIK	29
Трастузумаб (4D5)**	V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDNAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTIVTVSS	30
Трастузумаб (4D5)**	V _L	DIQMTQSPSSLASVSGDRVITICRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIKRT	31
Обекселимаб** * (XmAb5871)	V _H	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVM HWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKQG RVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGTY YYGTRVFDYWGQGTIVTVSS	32

Обекселимаб ^{**} * (XmAb5871)	V _L	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGN TYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSG SGSGTEFTLTISILEPEDFAVYYCMQHLEYPITFG AGTKLEIK	33
--	----------------	--	----

† Комплементарность-определяющие области выделены жирным шрифтом.

*См. публикацию заявки на патент США. № 2006/0088539, фиг. 2A-2B, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки; **см. патент США № 5821337, фиг. 1A-1B, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки; ***см. EP2059536; PCT/US2007/075932, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0120] Подходящие аминокислотные модификации последовательностей CDR тяжелой цепи и/или последовательностей CDR легкой цепи нацеливающего домена согласно изобретению, включают, например, консервативные замены или функционально эквивалентные замены аминокислотных остатков, которые приводят к образованию вариантов последовательностей CDR, имеющих сходные или улучшенные свойства связывания по сравнению с описанными здесь последовательностями CDR, как описано выше. Настоящее изобретение охватывает CDR из Таблиц 1 и 2, содержащие 1, 2, 3, 4, 5, или более аминокислотных замен (в зависимости от длины CDR), которые поддерживают или усиливают связывание антитела с его мишенью (например, с PSMA, CD14, HER2). Полученные модифицированные CDR по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% сходны с последовательностями CDR из Таблиц 1 и 2. Подходящие аминокислотные модификации последовательностей CDR тяжелой цепи из Таблицы 1 и/или последовательностей CDR легкой цепи из Таблиц 1 и 2 включают, например, консервативные замены или функционально эквивалентные замены аминокислотных остатков, которые приводят к получению вариантов последовательностей CDR, имеющих сходные или улучшенные свойства связывания по сравнению с последовательностями CDR из Таблицы 1 и Таблицы 2. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят внутри семейства аминокислот, которые имеют родственные боковые цепи. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства: (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); и (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда совместно классифицируются как ароматические аминокислоты. Альтернативно, набор аминокислот может быть сгруппирован как (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин), (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем, серин и треонин необязательно группируются отдельно как алифатические с гидроксильной группой; (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); (5)

амидные (аспарагин, глутамин); и (6) серусодержащие (цистеин и метионин) (см. публикацию Stryer (ed.), *Biochemistry*, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Неконсервативные замены также могут быть сделаны в последовательностях CDR тяжелой цепи Таблицы 1 и в последовательностях CDR легкой цепи Таблицы 2. Неконсервативные замены включают замену одного или более аминокислотных остатков CDR одним или более аминокислотными остатками из другого класса аминокислот для улучшения или усиления связывающих свойств CDR. Аминокислотные последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи Таблицы 1 и/или CDR варибельной области легкой цепи Таблицы 2 могут дополнительно содержать одну или более внутренних нейтральных аминокислотных инсерций или делеций, которые поддерживают или усиливают связывание с мишенью (например, с PSMA, CD19, HER2).

[0121] В некоторых вариантах осуществления изобретения, цепь V_H нацеливающего домена содержит любую одну из аминокислотных последовательностей V_H , представленных выше в Таблице 3, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей V_H , перечисленных в Таблице 3. Так, например, описанный здесь нацеливающий домен может содержать: (i) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:30; (ii) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:32; или (iii) варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:34.

[0122] В некоторых вариантах осуществления изобретения, цепь V_L нацеливающего домена содержит любую одну из аминокислотных последовательностей V_L , представленных выше в Таблице 3, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентична любой из аминокислотных последовательностей V_L , перечисленных в Таблице 3. Так, например, описанный здесь нацеливающий домен может содержать: (i) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29; (ii) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:31; или (iii) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:33.

[0123] В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытый здесь нацеливающий домен содержит: (i) варибельную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29; (ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:32, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:31; или (iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 32.

[0124] Нацеливающие домены согласно изобретению могут быть описаны или конкретно определены по их аффинности связывания. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающие домены согласно изобретению включают домены с константой диссоциации или K_D менее, чем 1 мкМ, 500 нМ, 250 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ.

[0125] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, которое включает нацеливающий компонент, нацеленный на рецептор специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA)/фолатгидролазы 1 (FOLH1), и гликозилтрансферазу, которые при их доставке в опухоль под действием указанного нацеливающего компонента, ферментативно преобразуют фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, причем, указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом. Этот аспект настоящего изобретения может оказаться полезным при лечении индивидуума с раком предстательной железы.

[0126] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:10; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:13; и комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:16. Последовательности CDR тяжелой цепи представлены выше в Таблице 1.

[0127] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:28 (Таблица 3 выше).

[0128] Нацеливающий компонент может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, где указанная переменная область легкой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:19; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 22; и комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:25. Последовательности CDR легкой цепи приведены выше в Таблице 2.

[0129] В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29 (таблица 3 выше).

[0130] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 10, CDR-H2 SEQ ID NO: 13, и CDR-H3 SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 19, CDR-L2 SEQ ID NO: 22 и CDR-L3 SEQ ID NO: 25.

[0131] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29 (Таблица 3).

[0132] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент дополнительно включает сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 из SEQ ID NO:34.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазу выбирают из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы) и гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-галактозилтрансферазы).

[0134] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансфераза представляет собой гликозилтрансферазу А («GTA») и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64 или ее часть, представленные ниже:

EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLLVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRL
QNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVGHVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQ
LSVLEVRAVKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHVGVVEILTP
LFGTLHPGFYSSREAFTYERRPQSQA YIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQ
AMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVL SPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFT
AVPKNHQAVRNP.

[0135] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансфераза представляет собой гликозилтрансферазу В («GTB») и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65 или ее часть, представленные ниже:

EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLLVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRL
QNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVGHVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQ
LSVLEVGAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHVGVVEILTP
LFGTLHPSFYSSREAFTYERRPQSQA YIPKDEGDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQ
AMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVL SPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFT
AVPKNHQAVRN.

[0136] Подходящие дополнительные гликозилазы описаны *ниже*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазой является галактозилтрансфераза α -1,3 (аминокислоты 90-376) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или ее часть, представленные ниже:

ELRLWDWFPKRRPEVMTVTQWKAPVWVWEGTYNKAILENYYAKQKITVGLTV
FAIGRYIEHYLEEFVTSANRYFMVGHKVIFYVMVDDVSKAPFIELGPLRSFKVFEVKPEK
RWQDISMMRMKTIGENILAHIQHEVDLFCMDVDQVFQDHFVETLQGSVAQLQAWW
YKADPDDFTYERRKESAA YIPFGQDFYYHAAIFGGTPIQVLNITQECFKGILLDKKNDIE
AEWHDESHLNKYFLLNKPSKILSPEYCWYHIGLPSDIKTVKLSWQTKEYNLVRKNVG
GGS.

[0137] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает: (i) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; (ii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; (iii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41 и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; (iv) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO:44, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; (v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; (vi) аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 47; (vii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или (viii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (Таблица 4).

Таблица 4. Последовательности бифункционального терапевтического белка J591

Посл-ть белка	Последовательность	SEQ ID NO:
Последовательности белков huJ591-GTB и huJ591-GTA		
Сигнальный пептид-Н-цепь huJ591-GTB	<p><i>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS</i> <i>GYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK</i> ATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQ GTLLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLVTDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG KggggsgggsggggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDV LVVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKK YVAFLKLFLETAEKHFVGHVHRVHYVFTDQPAAVPRVTL GTGRQLSVLEVGA YKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSE VDYLVCVDVDMEFRDHVGVEILTPFLGTLHPSFYGSSREA FTYERRPQSQA YIPKDEGDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRA CHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSP EYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана курсивом; последовательность Н-цепи huJ591 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTB выделена жирным шрифтом)</p>	34
Сигнальный пептид-Н-цепь huJ591-GTA	<p><i>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS</i> <i>GYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK</i> ATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQ GTLLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</p>	35

	<p><u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSE</u> <u>LYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> <u>KggggsgggsggggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDV</u> <u>LVVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKK</u> <u>YVAFLKLFLETAEKHFMVGHVHYYVFTDQPAAVPRVTL</u> <u>GTGRQLSVLEVRAVKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSE</u> <u>VDYLCVDVDMEFRDHVGVVEILTPLFGTLHPGFYGSREA</u> <u>FTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRA</u> <u>CHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSP</u> <u>EYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP</u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность Н-цепи huJ591 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом)</p>	
Сигнальный пептид- huJ591-LC-his-метка	<p><u>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKA</u> <u>SQDVGTAVDWYQOKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGS</u> <u>GTDFTLTISSLOPEDFADYYCQOYNSYPLTFGPGTKVDIKRTV</u> <u>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN</u> <u>ALOSGNSQESVTEODSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u><u>HHHHHH</u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность L-цепи huJ591 подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки показана <i>курсивом</i> и жирным шрифтом)</p>	36
Последовательности белков huJ591Fab-GTB и huJ591Fab-GTA		
Сигнальный пептид- huJ591Fab-GTB-Myc-his-метка	<p><u>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS</u> <u>GYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK</u> <u>ATLTVDKSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQ</u> <u>GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT</u></p>	37

	<p><u>QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTEPDHLQRVSLP</u> <u>RMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTWPWLAPIVWEGTFNIDILNE</u> <u>QFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVVGHRV</u> <u>HYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVAYKRWQDVS</u> <u>MRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHVGV</u> <u>LTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYY</u> <u>MGAFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQANGIEAVWHDE</u> <u>SHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFT</u> <u>AVPKNHQAVRNP</u><u><i>AAAEQKLISEEDLNGAVEHHHHHH</i></u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность Fab huJ591 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTB выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки показана курсивом и жирным шрифтом)</p>	
<p>Сигнальный пептид- huJ591Fab- GTA-Мус-his- метка</p>	<p><u>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS</u> <u>GYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK</u> <u>ATLTVDKSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQ</u> <u>GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTEPDHLQRVSLP</u> <u>RMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTWPWLAPIVWEGTFNIDILNE</u> <u>QFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVVGHRV</u> <u>HYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVRAVKRWQDVS</u> <u>MRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHVGV</u> <u>LTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYY</u> <u>LGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQANGIEAVWHDE</u> <u>SHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFT</u> <u>AVPKNHQAVRNP</u><u><i>AAAEQKLISEEDLNGAVEHHHHHH</i></u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность Fab huJ591 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки показана курсивом и жирным шрифтом)</p>	38

<p>Сигнальный пептид- huJ591-LC</p>	<p><u>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKA</u> <u>SQDVGTAVDWYQOKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGS</u> <u>GTDFTLTISSLOPEDEFADYYCQOYNSYPLTFGPGTKVDIKRTV</u> <u>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN</u> <u>ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана курсивом; последовательность LC huJ591 подчеркнута двойной чертой)</p>	39
<p>Последовательности белков huJ591-HC67-GTB и huJ591-HC67-GTA</p>		
<p>huJ591-HC67- GTB</p>	<p><u>EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPG</u> <u>KGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDТАYMELS</u> <u>SLRSEDТАVYYCAAGWNFDYWGOQTLLTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGТАALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT</u> <u>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSCDKTHTVPPVPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY</u> <u>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTKPPSRDELTKNQVSLSCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTTVPVLDSDGSERLASYLTVDKSRWQOQN</u> <u>VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>ggggsgggsggggs<u>EPDHL</u> QRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPLAPIVWEGTF NIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLEТАEKHF MVGHRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVGAУK RWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRD HVGVEILTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQSQAУPKD EGDFYУMGAFFGGSVQEVRQLTRACHQAMMVDQANGIE AVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPEYLWDQQLLGWPAV LRKLRFTAУPKNHQAVRNP</p> <p>(Последовательность huJ591-HC67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTB выделена жирным шрифтом). Аминокислоты варианта HC67 (n=8) показаны жирным шрифтом и подчеркнуты двойной чертой.</p>	40
<p>huJ591-HC67- GTA</p>	<p><u>EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPG</u> <u>KGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDТАYMELS</u></p>	41

	<p><u>SLRSED</u><u>TAVYYCAAGWNFDYWGOGTLLTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><u>GVHT</u> <u>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSCDKTHTVPPVPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY</u> <u>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTKPPSRDELTKNOVSLSCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGOPENNYKTTVPVLDSDGSFRLASYLTVDKSRWQOQN</u> <u>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>ggggsgggsggggs<u>EPDHL</u> <u>QRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWEGTF</u> <u>NIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHF</u> <u>MVGHRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVRAYKR</u> <u>WQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDH</u> <u>VGVEILTPLFGTLHPGFYGSREAFYERRPQSQAAYIPKDE</u> <u>GDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQANGIEA</u> <u>VWHDESHLNKYLRLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLLWPAVL</u> <u>RKLRFTA</u><u>VPKNHQAVRNP</u></p> <p>(Последовательность huJ591-HC67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом). Аминокислоты варианта HC67 (n=8) показаны жирным шрифтом и подчеркнуты двойной чертой.</p>	
huJ591-LC-his tag	<p><u>DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGP</u> <u>SPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFLTISSLOPEDEADY</u> <u>YCQQYNSYPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD</u> <u>STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u> <u><i>СНННННН</i></u></p> <p>(Последовательность huJ591 LC подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и курсивом)</p>	42
Последовательности белков huJ591-HC67-GTB-54aa и huJ591-HC67-GTA-54aa		
huJ591 HC67-GTB-54aa	<p><u>MNFGRLRILFLVLT</u><u>TKGVQCEVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTS</u> <u>GYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDK</u> <u>ATLTVDKSTD</u><u>TAYMELSSLRSED</u><u>TAVYYCAAGWNFDYWGQ</u></p>	43

	<p><u>RLASYLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GKggggsgggsggggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKD</u> <u>VLVVTPLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIK</u> <u>KYVAFLKLFLETAEKHFVMGHRVHYVFTDQPAAVPRVT</u> <u>LGTGRQLSVLEVRAVKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLS</u> <u>EVDYLVCDVDMEFRDHVGVEILTPLFGTLHPGFYGSRE</u> <u>AFTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYLLGGFFGGSVQEVQRLTR</u> <u>ACHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLS</u> <u>PEYLWDQQLLWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNPEFEQK</u> <u>LISEEDLNSADIIHHTGARSSAHLELTADYKDHDGDYKDHDIDYKD</u> <u>DDDK</u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность Н-цепи huJ591 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность 54 а.к. показана курсивом и подчеркнута двойной чертой). Аминокислоты варианта HC67 (n=8) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты двойной чертой.</p>	
huJ591-LC- his-метка	<p><u>DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQOKPGP</u> <u>SPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFADY</u> <u>YCQOYNSYPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD</u> <u>STYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u> <u>CNNNNNN</u></p> <p>(Последовательность huJ591 LC подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом).</p>	45
Последовательности белков huJ591scFv-Fc67-GTB и huJ591scFv-Fc67-GTA		
huJ591scFv- Fc67-GTB-his- метка	<p><u>DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQOKPGP</u> <u>SPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFADY</u> <u>YCQOYNSYPLTFGPGTKVDIKEVOLVQSGPEVKKPGATVKIS</u> <u>CKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQK</u> <u>FEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDY</u> <u>WGQGTLTVSSEPKSCDKTHTVPPVPAPELLGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u></p>	46

	<p><u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSRDELTKNQVSLVCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNGOPENNYKTTVPVLDSDGSFRLASYLTVDK</u> <u>SRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>ggggsggggsg gggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLA PIWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLF LETAEKHFMVGHRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSV LEVGAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVD VDMEFRDHVGVEILTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQS QAYIPKDEGDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMV DQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQL LGWPAVLRKLRFTAVPKNHQAVRNPHHHHHH</p> <p>(Последовательность huJ591scFv-Fc67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTV выделена жирным шрифтом; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом). Аминокислоты варианта HC67 (n=8) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты двойной чертой.</p>	
h591scFv-Fc67-GTA-his-метка	<p><u>DIQMTQSPSSLSSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQOKPGP</u> <u>SPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFADY</u> <u>YCQQYNSYPLTFGPGTKVDIKEVQLVQSGPEVKKPGATVKIS</u> <u>CKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQK</u> <u>FEDKATLTVDKSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDY</u> <u>WGQGTLTIVSSEPKSCDKTHTVPPVPAPELLGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSRDELTKNQVSLVCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNGOPENNYKTTVPVLDSDGSFRLASYLTVDK</u> <u>SRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>ggggsggggsg gggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLA PIWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLF LETAEKHFMVGHRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSV LEVRAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVD VDMEFRDHVGVEILTPLFGTLHPGFYGGSSREAFTYERRPQ SQAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMV</p>	47

<p><u>DRVITICKASQDVGTAVDWYQOKPGKAPKLLIYWASTRHTG</u> <u>VPDRFTGSGSGTDFTLTISSLOPEDFADYFCQOQYNSYPLTFGG</u> <u>GTKLEIK</u><i>ggggsgggsggggs</i>EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTP CRKDVLVVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLT VFAIKKYVAFLKLFLETAEKHF MVGHRVHYYVFTDQPAA VPRVTLGTGRQLSVLEV RAYKRWQDVSMRRMEMISDFCE RRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHVGV EILTPLFGTLHPGFY GSSREAF TYERRPQSQAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEV QRLTRACHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKP TKVLSPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP <u>AAAEOKLISEEDLNGAVE</u>HHHHHH</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность huJ591scFv подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки показана курсивом и жирным шрифтом)</p>

[0138] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-770 SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO:35, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-233 SEQ ID NO:36.

[0139] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-540 SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO:38, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-233 SEQ ID NO:39, где, но необязательно, бифункциональное терапевтическое средство содержит первую часть, содержащую аминокислотную последовательность положений 20-558 SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO:38.

[0140] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO:41, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 1-214 SEQ ID NO: 42.

[0141] В некоторых вариантах изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-831 SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 и второй белок, включающий аминокислотную последовательность положений 1-214 SEQ ID NO: 45.

[0142] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает аминокислотную последовательность положений 1-767 SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 47.

[0143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает аминокислотную последовательность положений 20-591 SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO:49, где, но необязательно, бифункциональное терапевтическое средство включает последовательность положений 20-597 SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

[0144] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, которое включает нацеливающий компонент, нацеленный на член семейства рецепторов человеческого эпидермального фактора роста (HER), и гликозилтрансферазу, которые, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразуют фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, причем, указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом. Этот аспект настоящего изобретения может оказаться полезным при лечении индивидуума с раком молочной железы или любым раком, экспрессирующим HER2.

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:11; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 14; комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 17. Последовательности CDR тяжелой цепи представлены выше в Таблице 1.

[0146] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:30 (Таблица 3 выше).

[0147] Нацеливающий компонент может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область легкой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или модифицированную аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 20, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:20; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 23; и комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 26. Последовательности CDR легкой цепи приведены выше в Таблице 2.

[0148] В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:31 (Таблица 3 выше).

[0149] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 11, CDR-H2 SEQ ID NO: 14 и CDR-H3 SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 20, CDR-L2 SEQ ID NO: 23 и CDR-L3 SEQ ID NO: 26.

[0150] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:31 (Таблица 3).

[0151] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент дополнительно включает сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 50.

[0152] Подходящие гликозилтрансферазы подробно описаны *ниже*.

[0153] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазу выбирают из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы) и гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-галактозилтрансферазы).

[0154] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает: (i) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; (ii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54 и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; (iii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; (iv)

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; (v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; (vi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; или (vii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (Таблица 5).

Таблица 5. Последовательности бифункционального терапевтического белка 4D5

Последовательность белка	Последовательность	SEQ ID NO:
Последовательность белков 4D5-GTB и 4D5-GTA		
Сигнальный пептид-Н-цепь 4D5- GTB	<p><i>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCA</i> <u>ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLOMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG</u> <u>FYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>ggggsgggsggggsEPDHLQRVS LPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWEGTFNIDI LNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFMV GHRVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVGAYKR WQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLVCDVDMEFR DHVGVEILTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQSQAYIP KDEGDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQA NGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPEYLWDQQLLG WPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность Н-цепи 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTB выделена жирным шрифтом)</p>	50
Сигнальный	<i>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCA</i>	

пептид-Н-цепь 4D5- GTA	<p><u>ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLOMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG</u> <u>FYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>OPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u><i>ggggsgggsggggs</i>EPDHLQRVS LPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWEGTFNIDI LNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFMV GHRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVRAYKR WQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFR DHVGVEILTPLFGTLHPGFYGSREAFYERRPQSQAQYIP KDEGDFYLLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQAN GIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLL WPAVLRKLRFTAVPKNHQAVRNP</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность Н-цепи 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTA выделена жирным шрифтом)</p>	51
Сигнальный пептид- 4D5- LC-his-метка	<p><i>MGWSCIIIFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR</i> <u>ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS</u> <u>RSQTDFTLTISSLOPEDEATYYCQOHYTPPTFGQGTKVEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u>HHHHHH</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность L-цепи 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана <i>курсивом</i>)</p>	52
Последовательности белков 4D5Fab-GTB и 4D5Fab-GTA		
Сигнальный	<i>MGWSCIIIFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCA</i>	

<p>пептид-4D5Fab- GTB-Мyc-his- метка</p>	<p><u>ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDG</u> <u>FYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLA</u> PIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKL FLETAEKHFMVGHRVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQ LSVLEVGAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYL VCVDVDMEFRDHVGVEILTPLFGTLHPSFYGSSREAFTY ERRPQSQAYIPKDEGDFYMGAFFGGSVQEVQRLTRAC HQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSP EYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP<u>AAAE</u> <u>OKLISEEDLNGAVEHHHHHH</u></p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i>; последовательность Fab 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTB выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом).</p>	53
<p>Сигнальный пептид-4D5Fab- GTA-Мyc-his- метка</p>	<p><i>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA</i> <u>ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDG</u> <u>FYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLA</u> PIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKL FLETAEKHFMVGHRVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQ LSVLEVRAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYL VCVDVDMEFRDHVGVEILTPLFGTLHPGFYGSSREAFTY ERRPQSQAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRAC HQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSP EYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP<u>AAAE</u> <u>OKLISEEDLNGAVEHHHHHH</u></p>	54

	(Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i> ; последовательность Fab 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом).	
Сигнальный пептид- 4D5-LC	<u>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR</u> <u>ASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS</u> <u>RSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOHYTTPPTFGOGTKVEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLISKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u> (Последовательность сигнального пептида показана <i>курсивом</i> ; последовательность LC 4D5 подчеркнута двойной чертой).	55
Последовательности белков 4D5HC67-GTB и 4D5HC67-GTA		
4D5HC67-GTB	<u>EVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL</u> <u>QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS</u> <u>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> <u>ggggsgggsggggs</u> EPD HLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWE GTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETA EKHFMVGHVRVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLE VGAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVD VDMEFRDHVGV EILTPLFGTLHPSFYGSSREAFYERRP QSQAYIPKDEGDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQA MMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSP EYL WDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP (Последовательность 4D5H67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTB выделена жирным шрифтом)	56
4D5HC67-GTA	<u>EVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL</u> <u>QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS</u>	57

	<p><u>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u>ggggsgggsggggsEPD HLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTWLAPIVWE GTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETA EKHFMVGHHRVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLE VRAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVD VDMEFRDHVGVVEILTPLFGTLHPGFYGSSREAFTYERRP QSQAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAM MVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPEYLW DQQLGWPAVLRKLRFTAVPKNHQAVRNP</p> <p>(последовательность 4D5H67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом).</p>	
4D5-LC-his- метка	<p><u>DIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQOKP</u> <u>GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLOPEDF</u> <u>ATYYCQOHYTPPTFGOGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</u> <u>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u><i>HHHHHH</i></p> <p>(последовательность LC 4D5 подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом)</p>	58
Последовательности белков 4D5scFv-Fc67-GTB и 4D5scFv-Fc67-GTA		
4D5scFv-Fc67- GTB-his-метка	<p><u>EVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL</u> <u>QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGOGTLVTVS</u> <u>SGGGGSGGGGSGGGGSDIOMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA</u> <u>SQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR</u> <u>SGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOHYTPPTFGOGTKVEIK</u>gg ggsgggsggggsEPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVL VVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKK YVAFLKLFLETAEKHFMVGHHRVHYYVFTDQPAAVPRVT LGTGRQLSVLEVGAYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRF LSEVDYLCVDVDMEFRDHVGVVEILTPLFGTLHPSFYGS</p>	59

	<p>SREAFTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYYMGAFFGGSVQEV QRLTRACHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRH KPTKVLSP EYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQA VRNPHHHHHH</p> <p>(последовательность 4D5scFv-Fc67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTB выделена жирным шрифтом; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана <i>курсивом</i>)</p>	
4D5scFv-Fc67-GTA-his-метка tag	<p><u>EVQLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL</u> <u>OMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS</u> <u>SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRA</u> <u>SQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR</u> <u>SGTDFTLTISSLOPEDEFATYYCQOHYTPPTFGQGTKVEIK</u><i>gg</i> <i>ggsgggsggggs</i>EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDV VVTPWLAPIVWEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKK YVAFLKLFLETAEKHFVGHVHYYVFTDQPAAVPRVT LGTGRQLSVLEVRAVKRWQDVSMRRMEMISDFCERRF LSEVDYLVCDVDMEFRDHVGV EILTPLFGTLHPGFYGS SREAFTYERRPQSQAAYIPKDEGDFYYLGGFFGGSVQEVQ RLTRACHQAMMVDQANGIEAVWHDESHLNKYLLRHKP TKVLSPEYLWDQQLLGWPAVLRKLRFTA VPKNHQA VR NRHHHHHH</p> <p>(последовательность 4D5scFv-Fc67 подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана <i>курсивом</i>)</p>	60
Последовательности белков 4D5scFv-GTB и 4D5scFv-GTA		
4D5scFv-GTB-Myc-His-метка	<p><i>METDTLLLWVLLWVPGSTG</i><u>EVQLVESGGGLVOPGGSLRLSC</u> <u>AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD</u> <u>SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCSRWGGD</u> <u>GFYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ</u> <u>SPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKL</u></p>	61

	<p><u>LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQ</u> <u>QHYYTPPTFGQGTKVEIK</u>ggggsgggsggggsEPDHLQRVSLPR MVYYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWEGTFNIDILNE QFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVGH RVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVGAYKRWQ DVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHV GVEILTPLFGTLHPSFYGSSREAFTYERRPQSQAAYIPKDE GDFYYMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQANGIE AVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLLWPA VLRKLRFTA VPKNHQAVRNP <u>AAAEQKLISEEDLNGAVE</u>HH HHHH</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана курсивом; последовательность 4D5scFv подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTB выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом).</p>	
4D5scFv-GTA- Мус-His-метка	<p><u>METDTLLLWVLLWVPGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC</u> <u>AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD</u> <u>SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD</u> <u>GFYAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ</u> <u>SPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKL</u> <u>LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQ</u> <u>QHYYTPPTFGQGTKVEIK</u>ggggsgggsggggsEPDHLQRVSLPR MVYYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIVWEGTFNIDILNE QFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETAEKHFVGH RVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVRAVKRWQ DVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDMEFRDHV GVEILTPLFGTLHPGFYSSREAFTYERRPQSQAAYIPKDE GDFYYLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQANGIE AVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPPEYLWDQQLLWPA VLRKLRFTA VPKNHQAVRNP <u>AAAEQKLISEEDLNGAVE</u>HH HHHH</p> <p>(Последовательность сигнального пептида показана курсивом;</p>	62

	<p>последовательность 4D5scFv подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; последовательность GTA выделена жирным шрифтом; последовательность Мус показана курсивом и подчеркнута двойной чертой; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана курсивом).</p>	
--	--	--

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-774 SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-233 SEQ ID NO: 52.

[0156] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-563 SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 20-233 SEQ ID NO: 55, где, но необязательно, бифункциональное терапевтическое средство содержит первую часть, включающую аминокислотную последовательность положений 20-569 SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

[0157] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 1-214 SEQ ID NO: 58.

[0158] В некоторых вариантах изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает белок, содержащий аминокислотную последовательность положений 1-555 SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

[0159] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает аминокислотную последовательность положений 20-593 SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62, где, но необязательно, бифункциональное терапевтическое средство включает последовательность положений 20-599 SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62.

[0160] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к бифункциональному терапевтическому средству для лечения рака, включающему нацеливающий компонент, который нацелен на CD19 и гликозилтрансферазу, которые, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразуют фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, причем, указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом. Этот аспект настоящего изобретения может быть полезным при лечении индивидуума при необходимости элиминации В-клеток или активности В-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот аспект настоящего изобретения может быть полезным

для лечения лимфомы (*например*, В-клеточной лимфомы), В-клеточного лейкоза и/или аутоиммунных заболеваний.

[0161] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 12; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 15; комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 18. Последовательности CDR тяжелой цепи представлены выше в Таблице 1.

[0162] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:32 (Таблица 3 выше).

[0163] Нацеливающий компонент может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, где указанная переменная область легкой цепи включает: комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 21; комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 24; и комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 27. Последовательности CDR легкой цепи приведены выше в Таблице 2.

[0164] В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:32 (Таблица 3 выше).

[0165] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 12, CDR-H2 SEQ ID NO: 15 и CDR-H3 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 21, CDR-L2 SEQ ID NO: 24 и CDR-L3 SEQ ID NO: 27.

[0166] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 33 (Таблица 3).

[0167] В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий компонент дополнительно включает сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 63.

[0168] Подходящие гликозилтрансферазы подробно описаны *ниже*.

[0169] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазу выбирают из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы) и гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-галактозилтрансферазы).

[0170] В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликозилтрансферазой является α -1,3-галактозилтрансфераза (аминокислоты 90-376) игрунок, имеющая последовательность SEQ ID NO: 66.

[0171] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (Таблица 6).

Таблица 6. Последовательности бифункционального терапевтического белка обекселимаба

Посл-ть белка	Последовательность	SEQ ID NO:
Сигнальный пептид IL2 человека-обекселимаб- scFv- α -1,3-галактозил-трансфераза игрунок (а.к.90-376)-his-метка	<u>MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLS</u> <u>CAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT</u> <u>KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCA</u> <u>RGTYYYGTRVFDYWGQGLVTVSS</u> ggggsgggsgggsgggsggg gs <u>DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYL</u> <u>YWFQOKPGOSPOLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEF</u> <u>TLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK</u> gggggs ggggsggggsELRLWDWVFNPKRPEVMTVTQWKAPVV WEGTYNKAILENYAKQKITVGLTVFAIGRYIEHYL	63

	<p>EEFVTSANRYFMVGHKVFYVMVDDVSKAPFIELGP LRSFKVFEVKPEKRWQDISMMRMKTIGEHILAHIQH EVDFLFCMDVDQVFQDHFVETLGQSV AQLQAWW YKADPDDFTYERRKESAAYIPFGQGDFYYHAAIFGG TPIQVLNITQECFKGILLDKKNDIEAEWHDESHLNKY FLLNKPSKILSPEYCW DYNHIGLPSDIKTVKLSWQTKE YNLVRKNVGGGSHHHHHH</p> <p>(последовательность сигнального пептида человеческого IL2 показана <i>курсивом</i>; последовательность обекселимаба подчеркнута двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; scFv показан <i>курсивом</i>, жирным шрифтом и подчеркнут двойной чертой; линкерная последовательность показана строчными буквами; α-1,3-галактозил-трансфераза игрунок (а.к. 90-376) выделена жирным шрифтом; последовательность his-метки выделена жирным шрифтом и показана <i>курсивом</i>).</p>	
--	--	--

[0172] В некоторых вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство включает аминокислотную последовательность положений 20-584 SEQ ID NO: 63, аминокислотную последовательность положений 20-578 SEQ ID NO: 63, аминокислотную последовательность положений 20-287 SEQ ID NO: 63, аминокислотную последовательность положений 20-272 SEQ ID NO: 63, аминокислотную последовательность положений 20-160 SEQ ID NO: 63 или аминокислотную последовательность положений 20-140 SEQ ID NO: 63.

[0173] Следует отметить, что точная дозировка бифункционального терапевтического средства согласно изобретению назначается врачом с учетом особенностей пациента, подлежащего лечению. Обычно, дозы и введение корректируются таким образом, чтобы обеспечить эффективное количество средства пациенту, проходящему лечение. Используемый здесь термин «эффективное количество» бифункционального терапевтического средства относится к количеству, необходимому для достижения желаемого биологического ответа. Как будет очевидно для специалиста в этой области, эффективное количество бифункционального терапевтического средства согласно изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, вводимое лекарственное средство, ткань-мишень, способ введения и т.п. Так, например, эффективным количеством бифункционального терапевтического средства может быть такое количество, которое приводит к уменьшению размера опухоли на желаемую величину в течение желаемого периода времени.

Дополнительные факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают: тяжесть заболевания; возраст, массу и пол пациента, проходящего лечение; диету, время и частоту приема; комбинации лекарственных средств; чувствительность к реакциям; и переносимость терапии/ответ на терапию.

[0174] «Эффективное количество» также может представлять собой «профилактически эффективное количество», которое относится к количеству описанного здесь бифункционального терапевтического средства, где указанное количество является эффективным при однократном или многократном введении дозы индивидууму для профилактики или отсрочки возникновения или рецидива расстройства, например, рака, или лечения его симптомов.

[0175] В основном, дозы могут составлять от приблизительно 25% до приблизительно 100% от максимально переносимой дозы (MTD) бифункционального терапевтического средства при введении в виде одного средства. В зависимости от состава, доза может быть доставлена один раз, непрерывно, например, с помощью насоса непрерывного действия, или с периодическими интервалами. Доза может быть скорректирована соответствующим образом для достижения желаемых уровней лекарственного средства, локально или системно. В случае, если ответ у индивидуума является недостаточным при таких дозах, то могут быть использованы даже более высокие дозы (или более эффективные высокие дозы, вводимые другим, более локализованным способом доставки) в той степени, в какой позволяет их переносимость пациентом. Также рассматривается непрерывное внутривенное введение в течение, например, 24 часов или введение многократных доз в день для достижения соответствующих системных уровней соединений. В качестве примера, схема введения доз может быть изменена так, чтобы бифункциональное терапевтическое средство могло быть введено один, два, три или более раз в неделю в течение любого количества недель, или бифункциональное терапевтическое средство могло быть введено более одного раза (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать два или двадцать четыре раза), например, один раз в неделю, один раз каждые два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять недель. Так, например, бифункциональное терапевтическое средство может быть введено по меньшей мере два, три или четыре раза при уровне дозировки, указанном выше, при этом, введение может быть осуществлено один раз в каждые четыре-восемь недель. Если у индивидуума не наблюдается побочной реакции на бифункциональное терапевтическое средство и/или один или более симптомов рака устраняются или остаются прежними, то может быть введена дополнительная доза или дополнительные дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по мере увеличения периода между введением доз, количество бифункционального терапевтического средства может быть увеличено.

[0176] Биораспределение и фармакокинетика бифункционального терапевтического средства могут отличаться для разных нацеливающих компонентов. Так, например,

высокомолекулярное бифункциональное терапевтическое средство, состоящее из полноразмерного интактного антитела, будет иметь более длительное время полужизни в плазме и во всем организме и будет иметь тенденцию оставаться в кровотоке. Такие бифункциональные терапевтические средства также с большей вероятностью будут выводиться через печень и с меньшей вероятностью будут проникать в нормальные ткани. И наоборот, небольшое бифункциональное терапевтическое средство, состоящее из нацеливающего пептида или низкомолекулярного лиганда, например, будет иметь тенденцию к более короткому времени полужизни, будет выводиться через почки/мочевыводящие пути и будет легче проникать в нормальные ткани и опухоли.

[0177] При осуществлении способов согласно изобретению, стадию введения осуществляют для лечения рака у индивидуума. В одном варианте осуществления изобретения, индивидуума, страдающего раком, отбирают до стадии введения. Такое введение может осуществляться системно или путем прямого или местного введения в участок опухоли. Так, например, подходящими способами системного введения являются, но не ограничиваются ими, пероральное, местное, трансдермальное, парентеральное, интрадермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное или интраназальное введение, введение путем внутрисполостного или внутрипузырного закапывания, внутриглазное введение, внутриартериальное введение, введение в участок поражения, или нанесение на слизистые оболочки. Подходящими способами местного введения являются, но не ограничиваются ими, катетеризация, имплантация, прямая инъекция, дермальное/трансдермальное нанесение или введение в воротную вену в соответствующие ткани или введение любыми другими способами, методами или процедурами местного введения, хорошо известными специалистам в данной области. Способ воздействия путем доставки бифункционального терапевтического средства будет варьироваться в зависимости от типа бифункционального терапевтического средства (например, имеющего антитело с нацеливающим компонентом, или пептид с нацеливающим компонентом) и заболевания, подлежащего лечению.

[0178] Бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению может быть введено перорально, например, вместе с инертным разбавителем или с легко усвояемым пищевым носителем, или оно может быть заключено в капсулы с твердой или мягкой оболочкой, либо оно может быть спрессовано в таблетки, или включено непосредственно в пищу. Бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению также может быть введено способом замедленного высвобождения, с помощью таких устройств, как капсулы замедленного высвобождения или нанотрубки. Такие устройства обеспечивают гибкость в отношении времени и дозировки. Для перорального терапевтического введения, средства согласно изобретению могут быть включены в состав наполнителей и могут быть использованы в форме таблеток, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов и т.п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% средства, хотя более низкие концентрации могут быть эффективными и действительно оптимальными. Процентное содержание средства в этих композициях

может, конечно, варьироваться и обычно составляет от приблизительно 2% до приблизительно 60% по массе унифицированной дозы. Количество бифункционального терапевтического средства согласно изобретению в таких терапевтически ценных композициях должно быть таким, чтобы можно было получить подходящую дозу.

[0179] Если бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению вводят парентерально, то растворы или суспензии такого средства могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и в их смесях в маслах. Репрезентативными маслами являются масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло или минеральное масло. В основном, вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и родственного сахара, а также гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для приготовления растворов для инъекций. В обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

[0180] Фармацевтические составы, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях, лекарственная форма должна быть стерильной и должна быть текучей настолько, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Этот препарат должен быть стабильным в условиях его приготовления и хранения и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их подходящие смеси и растительные масла.

[0181] Если желательно доставлять бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению системно, то оно может быть приготовлено для парентерального введения путем инъекции, например, путем инъекции ударной дозы или непрерывной инфузии. Составы для инъекций могут быть приготовлены в виде унифицированной лекарственной формы, например, в ампулах или в контейнерах с множеством доз, с добавлением консерванта. Композиции могут быть получены в таких формах, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать фармацевтические агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0182] Внутривенное или интратекальное введение бифункционального терапевтического средства согласно изобретению также может быть достигнуто с использованием устройств для инфузионных насосов. Такие устройства обеспечивают непрерывную инфузию желаемых соединений, что позволяет избежать многократных инъекций и многочисленных манипуляций.

[0183] В дополнение к препаратам, описанным ранее, бифункциональное терапевтическое средство также может быть приготовлено в виде депо-препарата. Такие препараты длительного действия могут быть приготовлены с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол, или в виде слаборастворимых производных, например, в виде слаборастворимой соли.

[0184] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0185] Бифункциональные терапевтические средства описаны выше.

[0186] Фармацевтические композиции, содержащие бифункциональное терапевтическое средство для использования в способах согласно изобретению, могут включать фармацевтически приемлемый носитель, как описано *ниже*, один или более активных агентов и подходящий носитель для доставки. Подходящими носителями для доставки являются, но не ограничиваются ими, вирусы, бактерии, биоразлагаемые микросферы, микрочастицы, наночастицы, липосомы, коллагеновые минигранулы и кохлеаты.

[0187] В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическую композицию или состав инкапсулируют в липидную композицию с образованием частицы нуклеиновой кислоты-липиды, как описано в публикации Semple et al., «Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery», *Nature Biotech.* 28:172-176 (2010), в WO2011/034798 Bumcrot et al., в WO2009/111658 Bumcrot et al., и в WO2010/105209 Bumcrot et al., которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0188] В другом варианте осуществления изобретения, носителем для доставки является наночастица. Специалистам в данной области известен ряд носителей для доставки наночастиц, которые являются подходящими для доставки бифункционального терапевтического средства согласно изобретению (см., например, публикацию van Vlerken et al., «Multi-functional Polymeric Nanoparticles for Tumour-Targeted Drug Delivery», *Expert Opin. Drug Deliv.* 3(2):205-216 (2006), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Подходящими наночастицами являются, но не ограничиваются ими, полимеры сложных эфиров бета-аминокислот (см. публикацию Sawicki et al., «Nanoparticle Delivery of Suicide DNA for Epithelial Ovarian Cancer Cell Therapy», *Adv. Exp. Med. Biol.* 622:209-219 (2008), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), сополимеры полиэтиленимина-*alt*-полиэтиленгликоля (см. публикации Park et al., «Degradable Polyethylenimine-*alt*-Poly(ethylene glycol) Copolymers As Novel Gene Carriers», *J. Control Release* 105(3):367-80 (2005) and Park et al., «Intratumoral Administration of Anti-KITENIN shRNA-Loaded PEI-*alt*-PEG Nanoparticles Suppressed Colon Carcinoma Established Subcutaneously in Mice», *J Nanosci. Nanotechnology* 10(5):3280-3 (2010), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки), и наночастицы на основе кРНК, заключенные

в липосому (см. публикацию Kenny et al., «Novel Multifunctional Nanoparticle Mediates siRNA Tumor Delivery, Visualization and Therapeutic Tumor Reduction *In Vivo*», *J. Control Release* 149(2): 111-116 (2011), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Другие средства для доставки наночастиц, подходящие для их использования в настоящем изобретении, включают устройства с микрокапсулами из нанотрубок, раскрытые в публикации патента США № 2010/0215724 Prakash et al., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[0189] В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержится в носителе для доставки липосом. Термин «липосома» означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, расположенных в сферическом бислое или бислоях. Липосомы представляют собой однослойные или мультислойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного вещества, и водной внутренней части. Водная часть содержит композицию для доставки. Катионные липосомы обладают преимуществом, заключающимся в способности соединяться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не способны эффективно соединяться с клеточной стенкой, поглощаются макрофагами *in vivo*.

[0190] Несколько преимуществ липосом включают: их биосовместимость и способность к биологическому разложению, возможность включения широкого спектра водорастворимых и жирорастворимых лекарственных средств; и способность обеспечивать защиту инкапсулированных лекарственных средств от метаболизма и разложения. Важными факторами при приготовлении липосомных композиций являются заряд липидной поверхности, размер везикул и водный объем липосом.

[0191] Липосомы являются подходящими для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Поскольку липосомная мембрана по своей структуре подобна биологическим мембранам, то если липосомы наносят на ткань, эти липосомы начинают сливаться с клеточными мембранами, и по мере того, как происходит это слияние липосомы и клетки, содержимое липосом включается в клетку, где может действовать активный агент.

[0192] Способы получения липосом для использования в настоящем изобретении включают способы, описанные в публикации Bangham et al., «Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids», *J. Mol. Biol.* 13:238-52 (1965); в патенте США No. 5653996, Hsu; в патенте США No. 5643599, Lee et al.; в патенте США No. 5885613, Holland et al.; в патенте США U.S. No. 5631237, Dzau & Kaneda, и в патенте США No. 5059421, Loughrey et al., которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0193] В другом варианте осуществления изобретения, носителем для доставки является вирусный вектор. Вирусные векторы являются особенно подходящими для доставки молекул нуклеиновых кислот, но они также могут быть использованы для доставки молекул, кодирующих бифункциональное терапевтическое средство. Подходящие векторы для генотерапии включают, но не ограничиваются ими,

аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и векторы, содержащие вирус герпеса.

[0194] Носители для доставки аденовирусных векторов могут быть легко получены и использованы, как описано в публикациях Berkner, «Development of Adenovirus Vectors for the Expression of Heterologous Genes», *Biotechniques* 6:616-627 (1988), Rosenfeld et al., «Adenovirus-Mediated Transfer of a Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene to the Lung Epithelium In Vivo», *Science* 252:431-434 (1991), в WO 93/07283, Curiel et al., в WO 93/06223, Perricaudet et al., и в WO 93/07282, Curiel et al., которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Аденоассоциированные вирусные носители для доставки могут быть сконструированы и использованы для доставки бифункционального терапевтического средства согласно изобретению в клетки, как описано в публикациях Shi et al., «Therapeutic Expression of an Anti-Death Receptor-5 Single-Chain Fixed Variable Region Prevents Tumor Growth in Mice», *Cancer Res.* 66:11946-53 (2006); Fukuchi et al., «Anti-A β Single-Chain Antibody Delivery via Adeno-Associated Virus for Treatment of Alzheimer's Disease», *Neurobiol. Dis.* 23:502-511 (2006); Chatterjee et al., «Dual-Target Inhibition of HIV-1 In Vitro by Means of an Adeno-Associated Virus Antisense Vector», *Science* 258:1485-1488 (1992); Ponnazhagan et al., «Suppression of Human Alpha-Globin Gene Expression Mediated by the Recombinant Adeno-Associated Virus 2-Based Antisense Vectors», *J. Exp. Med.* 179:733-738 (1994); и Zhou et al., «Adeno-associated Virus 2-Mediated Transduction and Erythroid Cell-Specific Expression of a Human Beta-Globin Gene», *Gene Ther.* 3:223-229 (1996), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. *In vivo* использование этих носителей описано в публикациях Flotte et al., «Stable in Vivo Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator With an Adeno-Associated Virus Vector», *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 90:10613-10617 (1993) и Kaplitt et al., «Long-Term Gene Expression and Phenotypic Correction Using Adeno-Associated Virus Vectors in the Mammalian Brain», *Nature Genet.* 8:148-153 (1994), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные типы аденовирусных векторов описаны в патенте США No. 6057155, Wickham et al.; в патенте США No. 6033908, Bout et al.; в патенте США No. 6001557, Wilson et al.; в патенте США No. 5994132, Chamberlain et al.; в патенте США No. 5981225, Kochanek et al.; в патенте США No. 5885808, Spooner et al.; и в патенте США No. 5871727, Curiel, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0195] Ретровирусные векторы, которые были модифицированы для образования систем инфекционной трансформации, также могут быть использованы для доставки молекулы нуклеиновой кислоты в клетку-мишень. Один такой тип ретровирусного вектора раскрыт в патенте США № 5849586 Kriegler et al., который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Другие средства доставки нуклеиновых кислот, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают средства, раскрытые в публикации патента США № 20070219118 Lu et al., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[0196] Независимо от типа используемой системы инфекционной трансформации, она должна быть нацелена на доставку нуклеиновой кислоты в клетки желаемого типа. Так, например, для доставки в скопление клеток (например, в раковые клетки), высокий титр системы инфекционной трансформации может быть введен непосредственно в область расположения этих клеток, чтобы повысить вероятность клеточной инфекции. Затем инфицированные клетки будут экспрессировать молекулу нуклеиновой кислоты, нацеленную на ассоциированный с опухолью антиген. Экспрессионная система может дополнительно содержать промотор для контроля или регуляции силы и специфичности экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в ткани или клетке-мишени.

[0197] Как описано *выше*, эффективные дозы композиций согласно изобретению для лечения метастазирующего заболевания варьируются в зависимости от множества различных факторов, включая тип и стадию рака, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, другие вводимые лекарственные или терапевтические средства и физическое состояние пациента относительно других осложнений заболевания. Дозы для лечения необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности.

[0198] Фармацевтические композиции согласно изобретению могут включать «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» бифункционального лекарственного средства согласно изобретению. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество бифункционального терапевтического средства может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность бифункционального терапевтического средства вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством также является такое количество, при котором терапевтически полезные эффекты бифункционального терапевтического средства превосходят любые токсические или вредные эффекты. «Терапевтически эффективная доза» предпочтительно ингибирует оцениваемый параметр, например, скорость роста опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% по сравнению с индивидуумами, не прошедшими лечение. Способность соединения ингибировать оцениваемый параметр, *например*, рак, может быть оценена на животных-моделях прогнозирования эффективности при наличии опухолей человека. Альтернативно, это свойство композиции может быть оценено путем исследования способности соединения к ингибированию *in vitro* с помощью анализов, известных квалифицированным специалистам.

[0199] Термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для

достижения желаемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическая доза вводится индивидуумам до развития заболевания или на более ранней стадии заболевания, то профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

[0200] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадия введения дополнительно включает введение нуклеотид=сахар-уридиндифосфат-галактозы (UDP-gal), уридиндифосфат-N-ацетилгалактозамина (UDP-NAcGal) и/или гуанозиндифосфат-фукозы (GDP-фукозы).

[0201] UDP-gal, UDP-NAcGal и/или GDP-фукоза могут быть введены любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенное, подкожное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное, пероральное, ректальное введение или введение любым другим способом, известным специалистам в данной области. Кроме того, UDP-gal, UDP-NAcGal и/или GDP-фукоза могут быть введены одновременно с бифункциональным нацелевающим ферментом или после него. В последнем случае, то есть, при последующем введении, интервал между нацелевающим ферментом и нуклеотидным сахаром может составлять от 1 минуты до 1 недели. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, интервал составляет от 1 минуты до 48 часов.

[0202] Описанное здесь двухфункциональное терапевтическое средство может быть использовано в комбинации с другими видами терапии. Используемый здесь термин «вводимый в комбинации», означает, что индивидууму назначаются два (или более) различных лечения заболевания у индивидуума, страдающего таким заболеванием, например, два или более типов лечения назначаются после того, как у индивидуума было диагностировано это заболевание, и до того, как заболевание было излечено или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, назначение одного лечения все еще происходит, когда начинается второе лечение, а поэтому происходит перекрытие по введению. Это упоминается здесь как «одновременная» или «параллельная доставка». В других вариантах осуществления изобретения, проведение одного лечения заканчивается до начала проведения другого лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Так, например, второе лечение является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе при втором лечении, или второе лечение уменьшает симптомы в большей степени, чем это могло бы наблюдаться в случае, если бы второе лечение проводилось в отсутствие первого лечения, или аналогичная ситуация наблюдается при первом лечении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доставку осуществляют таким образом, чтобы ослабление симптома или уменьшение другого параметра, связанного с заболеванием, было более эффективным, чем это могло наблюдаться при одном лечении, проводимом в отсутствие другого. Эффект лечения двух типов может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышать аддитивный эффект. Доставка может быть такой, что эффект от первого лечения все еще обнаруживается при проведении второго лечения.

[0203] Примерами терапевтических средств являются таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, майтанзиноиды, например, майтанзинол (см. патент США No. 5208020, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки), СС-1065 (см. патенты США No. 5475092, 5585499, 5846545, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки) и их аналоги или гомологи. Терапевтическими средствами являются, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, хлорамбуцил тиотепа, СС-1065, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиаминплатина (II) (DDP-цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (прежнее название дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)), и антимитотические агенты (например, винкристин, винбластин, таксол и майтанзиноиды).

[0204] В других вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство вводят в комбинации с другими методами терапевтического лечения, включая хирургическое вмешательство, облучение, криохирургию и/или термотерапию. При такой комбинированной терапии могут быть преимущественно использованы более низкие дозы вводимых терапевтических средств, что позволяет избежать возможной токсичности или осложнений, связанных с различными монотерапиями.

[0205] В других вариантах осуществления изобретения, бифункциональное терапевтическое средство вводят в комбинации с иммуномодулирующим агентом, например, IL-1, IL-24, IL-6 или IL-12, или с интерфероном-альфа или -гамма.

[0206] В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, к полинуклеотиду), кодирующей бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению. Полинуклеотид может представлять собой, например, ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинации, либо одноцепочечные и/или двухцепочечные, либо нативные или стабилизированные формы полинуклеотидов, такие как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и такой полинуклеотид может содержать, а может и не содержать, интроны при условии, что он будет кодировать бифункциональное терапевтическое средство. Очевидно, что только те пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, соединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, способному экспрессировать бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению. Было разработано

множество методов для связывания полинуклеотидов, особенно ДНК, с векторами, например, с помощью комплементарных «липких» концов. Так, например, комплементарные гомополимерные участки могут быть добавлены к сегменту ДНК, подлежащему встраиванию в векторную ДНК. Вектор и сегмент ДНК затем соединяются водородной связью между комплементарными гомополимерными хвостами с образованием рекомбинантных молекул ДНК.

[0207] Синтетические линкеры, содержащие один или более рестрикционных сайтов, обеспечивают альтернативный метод присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие множество сайтов рестрикции эндонуклеазой, являются коммерчески доступными и поставляются от ряда источников, включая International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, USA. Желательный способ модификации ДНК, кодирующей бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению, включает проведение полимеразной цепной реакции, как описано в публикации Higuchi et al., «A General Method of In Vitro Preparation and Specific Mutagenesis of DNA Fragments: Study of Protein and DNA Interactions», *Nucleic Acids Res.* 16(15):7351-67 (1988), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Этот способ может быть применен для введения ДНК в подходящий вектор, например, путем создания подходящих рестрикционных сайтов, либо он может быть применен для модификации ДНК другими подходящими способами, известными специалистам в данной области.

[0208] Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть выбраны по наличию кодонов, которые являются предпочтительными или непривлекательными для конкретной системы экспрессии. В качестве примера, нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, в которой по меньшей мере один кодон, предпочтительно по меньшей мере 10% или 20% кодонов, были изменены таким образом, чтобы последовательность была оптимизирована для экспрессии в клетках *E. coli.*, в дрожжах, в клетках человека, насекомых, NS0 или CHO.

[0209] Обычно, полинуклеотид, который кодирует бифункциональное терапевтическое средство, помещают под контроль промотора, который функционирует в желаемой клетке-хозяине. Большое разнообразие промоторов хорошо известно и может быть использовано в экспрессионных векторах согласно изобретению, в зависимости от конкретной ситуации. Обычно, выбранный промотор зависит от клетки, в которой этот промотор должен быть активным. Также могут быть включены, но необязательно, другие последовательности регуляции экспрессии, такие как сайты связывания с рибосомой, сайты терминации транскрипции и т.п. Конструкции, которые включают одну или несколько из этих регуляторных последовательностей, называются «экспрессионными векторами». Соответственно, настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам, в которые включены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие бифункциональные терапевтические средства, для обеспечения высокого уровня экспрессии в желаемой клетке-хозяине.

[0210] Последовательности регуляции экспрессии, которые являются подходящими для использования в конкретной клетке-хозяине, часто получают путем клонирования гена, который экспрессируется в этой клетке. Обычно используемые прокариотические регуляторные последовательности, которые определены здесь как последовательности, включающие промоторы для инициации транскрипции, необязательно вместе с оператором, наряду с последовательностями сайта связывания с рибосомой, включают такие обычно используемые промоторы, как промоторные системы бета-лактамазы (пенициллиназы) и лактазы (*lac*) (см. публикацию Change et al., *Nature* 198:1056 (1977), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), промоторная система триптофана (*trp*) (см. публикацию Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), промотор *tac* (см. публикацию DeBoer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25 (1983), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки); и промотор P_L лямбда и сайт связывания с рибосомой N-гена (см. публикацию Shimatake et al., *Nature* 292:128 (1981), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Однако, можно использовать любой доступный промотор, который функционирует у прокариот.

[0211] Для экспрессии бифункционального терапевтического средства в прокариотических клетках, отличающихся от *E. coli*, требуется промотор, который функционирует у прокариот конкретных видов. Такие промоторы могут быть получены из генов, которые были клонированы у данного вида, или могут быть использованы гетерологичные промоторы. Так, например, гибридный промотор *trp-lac* функционирует в *Bacillus* помимо *E. coli*.

[0212] Сайт связывания с рибосомой (RBS) обычно включают в экспрессионные кластеры согласно изобретению. RBS в *E. coli*, например, состоит из нуклеотидной последовательности длиной 3-9 нуклеотидов, расположенных на 3-11 нуклеотидов выше от иницирующего кодона (см. публикации Shine and Dalgarno, «Determinant of Cistron Specificity in Bacterial Ribosomes», *Nature* 254:34-38 (1975); Steitz, *In Biological regulation and development: Gene expression* (ed. R. F. Goldberger), vol. 1, p. 349, 1979, Plenum Publishing, New York) которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки).

[0213] Для клеток млекопитающих, регуляторные последовательности будут включать промотор, а предпочтительно энхансер, полученный из генов иммуноглобулинов, SV40, цитомегаловируса и т.п., и последовательность полиаденилирования, и могут включать донорные и акцепторные последовательности сплайсинга.

[0214] В настоящем изобретении могут быть использованы либо конститутивные, либо регулируемые промоторы. Регулируемые промоторы могут быть предпочтительными, поскольку клетки-хозяева могут быть выращены до высокой плотности до того, как будет индуцирована экспрессия бифункционального терапевтического средства. Высокий уровень экспрессии гетерологичных белков в некоторых ситуациях замедляет рост клеток. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который регулирует экспрессию

гена, уровень экспрессии которого может изменяться под воздействием факторов окружающей среды или эволюционных факторов, таких как, например, температура, pH, анаэробные или аэробные условия, свет, факторы транскрипции и химические вещества. Такие промоторы упоминаются здесь как «индуцибельные» промоторы, которые позволяют регулировать время экспрессии бифункционального терапевтического средства. Для *E. Coli* и других бактериальных клеток-хозяев, индуцибельные промоторы известны специалистам в данной области. К ним относятся, например, промотор *lac*, промотор бактериофага лямбда P_L, гибридный промотор *trp-lac* (см. публикации Amann et al. *Gene* 25:167 (1983); de Boer et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 80:21 (1983), которые в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), и промотор бактериофага T7 (см. публикацию Studier et al. *J. Mol. Biol.* (1986); Tabor et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 82: 1074-8 (1985), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0215] Селективные маркеры часто включают в экспрессионные векторы, используемые для экспрессии бифункционального терапевтического средства согласно изобретению. Эти гены могут кодировать генный продукт, такой как белок, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращенных в селективной культуральной среде. Клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим селективный ген, не выживают в культуральной среде. Типичные селективные гены кодируют белки, которые сообщают резистентность к антибиотикам или к другим токсинам, таким как ампициллин, неомицин, канамицин, хлорамфеникол или тетрациклин. Альтернативно, селективные маркеры могут кодировать белки, которые восполняют ауксотрофный дефицит или поставляют важные питательные вещества, которые не могут быть доступными из комплексных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу у бацилл. В большинстве случаев, вектор будет иметь один селективный маркер, который функционирует, например, в *E. coli* или в других клетках, в которых вектор реплицируется перед введением в клетку-хозяина. Специалистам в данной области известен ряд селективных маркеров.

[0216] Для конструирования подходящих конструкций нуклеиновых кислот, содержащих один или более из перечисленных выше компонентов, применяют стандартные методы лигирования, как описано в работах, приведенных выше. Выделенные плазмиды или фрагменты ДНК расщепляют, специально адаптируют и повторно лигируют в форме, желаемой для получения требуемых конструкций нуклеиновых кислот (например, плазмид). Для подтверждения правильности последовательностей в сконструированных плаزمиде, эти плазмиды могут быть проанализированы стандартными методами, такими как расщепление эндонуклеазой и/или секвенирование в соответствии с известными способами. Методы молекулярного клонирования для достижения этих целей известны специалистам в данной области. Специалистам хорошо известно большое разнообразие методов клонирования и *амплификации in vitro*, подходящих для конструирования рекомбинантных нуклеиновых кислот. Примеры этих методов и инструкций, достаточных для того, чтобы специалисты в данной области могли квалифицированно осуществлять

процедуры по клонированию, можно найти в публикации Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Volume 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); и в руководстве Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1998 Supplement) (Ausubel), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0217] Специалистам в данной области хорошо известно множество распространенных векторов, подходящих для их использования в качестве исходных материалов для создания конструкций нуклеиновых кислот и экспрессионных векторов согласно изобретению. Для клонирования в бактериях, распространенными векторами являются векторы, полученные из pBR322, такие как pBLUESCRIPT™, и векторы, полученные из λ-фага. У дрожжей, такими векторами являются дрожжевые интегрирующие плазмиды (например, YIp5) и дрожжевые реплицирующиеся плазмиды (плазмиды серии YRp) и pGPD-2. Экспрессия в клетках млекопитающих может быть достигнута с использованием множества общедоступных плазмид, включая PSv2, pBC12BI и p91023, а также литических вирусных векторов (например, вируса коровьей оспы, аденовируса и бакуловируса), эписомных вирусных векторов (например, вируса папилломы крупного рогатого скота) и ретровирусных векторов (например, мышинных ретровирусов).

[0218] Затем нуклеиновая кислота может быть экспрессирована в подходящем хозяине для получения полипептида, содержащего бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению. Таким образом, нуклеиновая кислота, кодирующая бифункциональное терапевтическое средство согласно изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, соответствующим образом модифицированными с учетом представленного здесь описания, для конструирования экспрессионного вектора, который затем используют для трансформации соответствующей клетки-хозяина для экспрессии и продуцирования бифункционального терапевтического средства согласно изобретению. Такие методы описаны *ниже*, а также включают методы, раскрытые, например, в патентах США № 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075, и 4810648, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0219] Способы введения экспрессионных векторов в выбранную клетку-хозяина не играют важной роли, и такие способы известны специалистам в данной области. Так, например, экспрессионные векторы могут быть введены в прокариотические клетки, включая *E. coli*, путем трансформации хлоридом кальция и в эукариотические клетки путем обработки фосфатом кальция или электропорации. Подходящими также являются и другие методы трансформации.

[0220] Бифункциональные терапевтические средства согласно изобретению также могут быть дополнительно связаны с другими бактериальными белками. Такой подход часто приводит к высоким выходам, поскольку обычные регуляторные последовательности прокариот регулируют транскрипцию и трансляцию. В *E. coli*, слияние lacZ часто

используют для экспрессии гетерологичных белков. Подходящие векторы являются легко доступными, такие как серии pUR, pEX и pMR100. Для определенных целей может быть желательным отщеплять неферментные аминокислоты от слитого белка после очистки. Это может быть достигнуто любым из нескольких способов, известных специалистам в данной области, включая расщепление бромцианом, протеазой или фактором X_a (см., например, публикацию Itakura et al., *Science* (1977) 198: 1056; Goeddel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 106; Nagai et al., *Nature* (1984) 309: 810; Sung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83: 561, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Сайты расщепления могут быть встроены в ген для слитого белка в желаемой точке расщепления.

[0221] В одной клетке-хозяине может быть экспрессировано более, чем одно бифункциональное терапевтическое средство путем размещения множества транскрипционных кластеров в одном экспрессионном векторе или путем использования различных селективных маркеров для каждого из экспрессионных векторов, которые используются в стратегии клонирования.

[0222] Бифункциональные терапевтические средства могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами, известными специалистам в данной области, включая осаждение сульфатом аммония, очистку на аффинных колонках, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (в целом, см., публикацию R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York (1982), Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. New York (1990), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительными являются по существу чистые композиции с гомогенностью по меньшей мере приблизительно от 70 до 90%, и наиболее предпочтительной является гомогенность от 98 до 99% или более. В качестве примера, если нацеливающим компонентом бифункционального терапевтического средства является антитело, то может быть проведена хроматография, связывающая антитело, такая как ионообменная хроматография. Ионообменная хроматография может представлять собой анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию или ту и другую. Типы анионообменной хроматографии включают, но не ограничиваются ими, Q Sepharose Fast Flow®, MacroPrep High Q Support®, DEAE Sepharose Fast Flow® и Macro-Prep DEAE®. Типы катионообменной хроматографии включают, но не ограничиваются ими, SP Sepharose Fast Flow®, Source 30S®, CM Sepharose Fast Flow®, Macro-Prep CM Support® и Macro-Prep High S Support®.

[0223] Для облегчения очистки бифункциональных терапевтических средств согласно изобретению, нуклеиновые кислоты, которые кодируют бифункциональные терапевтические средства, могут также включать кодирующую последовательность для эпитопа или «метки», для которых доступен аффинно связывающийся реагент, то есть, метку для очистки. Примерами подходящих эпитопов являются репортерные гены тус и V-5; экспрессионные векторы, подходящие для рекомбинантного получения слитых белков, имеющих эти эпитопа, и эти векторы являются коммерчески доступными

(например, векторы Invitrogen (Carlsbad Calif.) pcDNA3.1/Myc-His и pcDNA3.1/V5-His являются подходящими для их экспрессии в клетках млекопитающих). Дополнительные экспрессионные векторы, подходящие для присоединения метки к бифункциональному терапевтическому средству согласно изобретению, и соответствующие системы детектирования известны специалистам в данной области, и некоторые из них являются коммерчески доступными (например, "FLAG" (Kodak, Rochester N.Y.). Другим примером подходящей метки является полигистидиновая последовательность, которая способна связываться с лигандами, обладающими аффинностью к хелатам металлов. Обычно используются шесть смежных гистидинов, хотя можно использовать больше или меньше шести. Подходящие лиганды, обладающие аффинностью к хелатам металлов, которые могут служить в качестве связывающей части для полигистидиновой метки, включают нитрило-триуксусную кислоту (NTA) (см. публикацию Hochuli, E. (1990) «Purification of recombinant proteins with metal chelating adsorbents» In Genetic Engineering: Principles and Methods, J. K. Setlow, Ed., Plenum Press, New York, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), поставляемую Qiagen (Santa Clarita, Calif.).

[0224] Метки для очистки также включают домены, связывающие мальтозу, и домены, связывающие крахмал. Очистка белков с доменом, связывающимся с мальтозой, известна специалистам в данной области. Домены, связывающие крахмал, описаны в заявке WO 99/15636, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

[0225] Приведенные ниже примеры приводятся для иллюстрации практического осуществления вариантов изобретения, но не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

Материалы и методы

[0226] **Клеточные линии.** Клеточные линии рака предстательной железы человека LNCaP и PC3 были взяты из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). CWR22Rv1 был любезно предоставлен Томасом Претлоу, доктором медицинских наук Университета Case Western Reserve. Клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-361 была любезно предоставлена Кристелем Ларбуре (Института Исследований Рака в Монпелье (Франция)). LNCaP, PC3 и CWR22Rv1 поддерживали в среде RPMI1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, 1% пенициллина-стрептомицина и 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (все они поставлялись от Gemini Bio-products, West Sacramento, CA). MDA-MB-361 поддерживали в среде L-15 (ATCC) с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина и 20% FBS.

[0227] **Антитела.** Моноклональные антитела (mAb) J591 против FOLH1/PSMA, мышинные и деиммунизованные, были получены, как описано в публикации Liu et al., «Monoclonal Antibodies to the Extracellular Domain of Prostate Specific Membrane Antigen Also React With Tumor Vascular Endothelium», *Cancer Res.* 57:3629-3634 (1997), в патенте США No. 7045605, Bander et al., и в патенте США No. 7514078, Bander et al., которые в полном

объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. mAb 3E6 против PSMA, то есть, полимерное конъюгированное и меченное пероксидазой хрена козье антитело против мышинных Ig, и конъюгированное с пероксидазой хрена кроличье антитело против человеческих IgG были приобретены у Dako (Carpinteria, CA). mAb 4D5 было приобретено как герцептин (Genentech/Roche). Антитела mAb против A и B были приобретены у компании Ortho Diagnostic Systems (Raritan, NJ). Лектин *Ulex europaeus*, который распознает альфа-связанные остатки фукозы для обнаружения антигена O/H, был приобретен у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ослиное антитело против человеческого IgG, конъюгированное с пероксидазой хрена ослиное антитело против человеческого IgG, конъюгированное с щелочной фосфатазой ослиное антитело против человеческого IgG, конъюгированное с FITC ослиное антитело против мышинового Ig и FITC-конъюгированное ослиное антитело против человеческого Ig были приобретены у Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Антитело против метки M2 было приобретено у Sigma-Aldrich. Второе козье антимышное антитело, конъюгированное с IRDye 800CW, было приобретено у LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska).

[0228] **ДНК-плазмиды, используемые в этом исследовании.** Серия плазмид может быть сконструирована для любого желаемого нацеливания Ab или конструкции Ab или пептида плюс любой гликозилтрансферазы, включая, но не ограничиваясь ими, GTB, GTA и фукозилтрансферазу (FUT1 или FUT2), как описано в примере ниже.

[0229] ДНК-плазмиды и их белковые продукты, сверхэкспрессируемые в клетках-хозяевах после трансфекции или котрансфекции, перечислены ниже с краткими описаниями. Каждая плазида описывается следующим образом: *Конструирование ДНК-плазмиды (ее белкового продукта)*: краткое описание: *pMG 145 (H-цепь)*: трансфекция этой плазмиды в клетки-хозяева генерирует тяжелую цепь huJ591. *pMG 135 (L-цепь)*: при трансфекции этой плазмиды образуется легкая цепь huJ591 (L). *pMG 145 и pMG 135 (антитело huJ591)*: котрансфекция этих двух плазмид приводит к совместной экспрессии тяжелых и легких цепей и функционального антитела huJ591. *pMG 181 (H-цепь-GTB)*: при трансфекции этой плазмиды образуется слитый белок с тяжелой цепью huJ591 (H) на N-конце и GTB на C-конце (см. ниже). *pMG 181 и pMG 135 (слитое антитело huJ591-GTB)*: при совместной трансфекции этих двух плазмид образуются тяжелые и легкие цепи, включая GTB.

[0230] **Конструирование экспрессионных плазмид для слияния GTB и huJ591 или 4D5 с тяжелой цепью-GTB (H-GTB).** Область альфа-1,3-галактозилтрансферазы (GTB), которая включает каталитический домен (аминокислоты 57-354), была субклонирована методом ПЦР с использованием GTB-кодирующей плазмиды pBBBB в качестве матрицы. Flag- и His-метки могут быть добавлены на 3'-конце, если это необходимо для отслеживания или облегчения очистки слитых белков. Так, например, для конструирования слитого белка антитело-GTB, последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь huJ591 (H), лигировали с последовательностью ДНК каталитического домена GTB, в результате чего получали плазмиду pMG181. Ту же самую процедуру также

проводили для получения 4D5-GTB или любого Ab (или производного Ab или пептида)-GTB (или каталитического домена GTA для антигена A). Или, если это необходимо для синтеза Н-антигена, может быть включен каталитический домен FUT1 или FUT2. Ферменты гликозилтрансферазы предпочтительно лигируют на С-конце либо тяжелой, либо легкой цепи конструкции Ab.

[0231] Между последовательностью Ab и последовательностью фермента была встроена спейсерная последовательность $(G_4S)_3$. Альтернативно, могут быть использованы различные линкеры или спейсеры слитых белков, как описано в публикации Chen et al., “Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality,” *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(10):1357-69 (2013), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[0232] **Трансфекция ДНК и экспрессия слитых белков.** Для получения слитых антител huJ591-GTB (и аналогично для 4D5-GTB), клетки CHO совместно трансфицировали pMG181 (Н-цепью-GTB) и pMG135 (L-цепью) с использованием FreeStyle MAX (ThermoFisher scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Супернатанты, содержащие слитые антитела, собирали через 5 дней после трансфекции и концентрировали с помощью центрифужного фильтра Amicon Ultra 10K (Merck Millipore).

[0233] **Очистка сверхэкспрессированного слитого белка.** huJ591 очищали с использованием протеин-G-сефарозы (GE healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. J591-GTB очищали с использованием аффинного геля ANTI-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, супернатант, содержащий слитый белок, инкубировали с аффинным гелем M2 в течение 2 часов с последующей промывкой, элюированием пептидом 3xFLAG (Sigma-Aldrich) и диализом против PBS.

[0234] **Вестерн-блот-анализы.** Супернатант, содержащий слитый белок или очищенную фракцию, отделяли с помощью электрофореза в 4-20%-ном ПААГ с ДСН (Life Technology) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и переносили на поливинилидендифторидную мембрану (PVDF) (Millipore, Billerica, MA). Мембрану блокировали 5%-ным сухим молоком/PBST на 60 минут. Антитело против flag M2 инкубировали с мембраной в течение 60 минут. После промывки, второе козье антимышиное антитело, конъюгированное с IRDye 800CW, инкубировали с мембраной в течение 60 минут. После промывки, мембрану анализировали с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey (LI-COR Biosciences).

[0235] **Иммунологическое окрашивание.** Клетки (2×10^5 на лунку) культивировали на покровных стеклах в 12-луночных планшетах в течение 24 часов перед экспериментами. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) в PBS с последующими 3 промывками в PBS. Для обнаружения антигенов гистогруппы крови человека добавляли мышиное моноклональное антитело против А или против В в течение 60 минут при КТ. После промывки PBS, клетки инкубировали с FITC-конъюгированным ослиным антителом против мышиных иммуноглобулинов в течение 60 минут и промывали PBS. Экспрессию НВГА О детектировали путем инкубирования клеток с FITC-конъюгированным

агглютинином *Ulex europaeus* в течение 60 минут при КТ с последующей визуализацией под УФ-микроскопом. Для обнаружения PSMA, huJ591 было добавлено на 60 минут при КТ. После промывки PBS, клетки окрашивали FITC-конъюгированным антителом против человеческих Ig в течение 60 минут и промывали PBS. Покровные стекла были смонтированы и исследованы под УФ-микроскопом.

[0236] Для иммунологического окрашивания срезов ткани из опухолей ксенотрансплантата, 3Е6 использовали для выявления экспрессии PSMA в парафиновых срезах и huJ591 для замороженных срезов. Антитела против антигена группы крови были такими же, как указано выше. Парафиновые срезы депарафинизировали путем помещения предметных стекол в Histo-Clear с последующей регидратацией в градиенте спиртов и промывкой в трис-забуференном физиологическом растворе с Tween 20 (TBST). Депарафинизированные и регидратированные срезы помещали в целевой восстанавливающий раствор при pH 9,0 (Dako) и нагревали на водяной бане (95-99°C) в течение 30 минут. Срезы промывали в TBST. Пероксидазный блок добавляли в течение 5 минут. После промывки в TBST, mAb добавляли в течение 60 минут при КТ. Связывание антител детектировали с использованием меченого пероксидазой полимерного козьего антитела против мышиных Ig и 3,3'-диаминобензидинового (DAB) субстрата. Срезы визуализировали после контрастного окрашивания 10%-ным гематоксилином. Замороженные срезы использовали для обнаружения слитых антител J591-GTV, связанных с PSMA на клеточной поверхности *in vivo*. Замороженные срезы фиксировали предварительно охлажденным ацетоном в течение 10 минут, а затем промывали в PBS. Пероксидазный блок добавляли в течение 5 минут. После промывки в PBS, J591-GTV был обнаружен с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена кроличьего антитела против человеческих IgG, с последующим добавлением DAB и контрастным окрашиванием, как описано выше. Срезы, инкубированные непосредственно с huJ591, использовали в качестве позитивного контроля.

[0237] **ELISA на конкурентное связывание.** Планшеты покрывали в течение ночи при 4°C антителом 7E11 (антителом, которое связывает N-концевой/цитоплазматический домен PSMA) в концентрации 15 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,5). Лунки блокировали 2% HSA в PBS на 30 минут при КТ и промывали. Клеточный лизат LNCaP (содержащий PSMA) в разведении 1:8 добавляли в течение 60 минут при КТ. После промывки PBS добавляли серийные разведения мышиного антитела J591 (30 мкл) в течение 60 минут, а затем совместно инкубировали с супернатантами, содержащими J591-GTV или huJ591 (1,6 мкг Ig/мл; 30 мкл) при 4°C в течение ночи. После промывки добавляли ослиное антитело против человеческих IgG, конъюгированное с щелочной фосфатазой (1:1000) в течение 60 минут при КТ. После промывки, планшеты инкубировали с pNPP (Sigma) и считывали на 405 нм.

[0238] **Конверсия антигена группы крови *in vitro*.** Клетки (2×10^5 клеток) выращивали на покровных стеклах в 12-луночных планшетах в течение 24 часов. Покровные стекла промывали PBS и переносили во влажную камеру. Затем клетки

инкубировали со слитым антителом huJ591-GTB (или 4D5-GTB) плюс UDP-галактоза в течение 30 минут при 37°C. После промывки PBS, клетки фиксировали с помощью PFA. Конверсию антигена В на клеточной поверхности обнаруживали методом иммунологического окрашивания, как описано выше.

[0239] **Литическая активность нормальной человеческой сыворотки О или А после превращения раковых клеток в НВГА В *in vitro*.** Клетки LNCaP культивировали на 60-луночных планшетах для микротитрования. Клетки инкубировали либо с нативным белком J591, либо со слитым J591-GTB, либо ни с одним из них; при этом, во все лунки также вводили UDP-gal. Затем сыворотки, взятые у пациентов с фенотипом А или О, были добавлены в качестве источника природных анти-В Ab и комплемента; а в контрольные лунки добавляли J591 без GTB или без сыворотки. Через 3 часа, лунки промывали, фиксировали метанолом и инкубировали с 2%-ным красителем для окрашивания по Гимзе в течение 25 минут перед промыванием и считыванием. Аналогичный метод был применен для тестирования более крупной панели клеточных линий рака предстательной железы и молочной железы в суспензии. Литическую активность оценивали как по исключению трипанового синего, так и по поглощению иодида пропидия, оцененному с помощью FACS.

[0240] **Конверсия антигена группы крови *in vivo*.** В соответствии с протоколом, одобренным Научным Комитетом по уходу за животными и по их содержанию (IUCUC), мышам NOD SCID (Charles River, Wilmington, MA) в возрасте 6-8 недель вводили подкожно 5×10^6 клеток, суспендированных в 200 мкл Матригеля (Corning Life Sciences, Bedford, MD). Клеточные линии LNCaP, CWR22Rv1, PC3 и MDA-MB-361 использовали в экспериментах на животных. Через 14-21 день, образовавшиеся опухоли достигали диаметра 8-10 мм. HuJ591, huJ591-GTB, 4D5 или 4D5-GTB вводили либо внутривенно (IV), либо вовнутрь опухоли. UDP-gal вводили внутривенно, внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SQ). Мышей подвергали эвтаназии на 1, 2 или 3-й день, и извлекали опухоли и другие органы. Половину каждой опухоли приготавливали для получения замороженных срезов с помощью соединения OCT, а другую половину помещали в забуференный фосфатом формалин для приготовления парафиновых срезов. Иммунологическое окрашивание описано выше.

[0241] Также была разработана модель внутрибрюшинного ксенотрансплантата у мышей NOD/SCID с использованием резистентной к кастрату линии человеческих PC-клеток, содержащих C4-2-люциферазу. Для этой модели, человеческую плазму можно вводить внутривенно, чтобы получить природные антитела и комплемент, без какой-либо перегрузки жидкостью при проведении внутривенного введения. Через несколько дней после IP-инъекции 10×10^6 C4-2-luc-клеток, и после подтверждения взятия опухоли с помощью биоломинесцентной визуализации, 2 группы по 5 животных, каждая с сопоставимой медианой/диапазоном потока биоломинесцентных фотонов, получали однократную IP-дозу J591-GTB, UDP-gal и человеческой сыворотки типа О. Для контрольной группы, сыворотку типа О перед инъекцией подвергали термоинактивации. Общий поток для каждого животного оценивали каждые 3-4 дня в течение приблизительно 2 недель.

Пример 1. Синтез слитых белков «антитело-гликозилтрансфераза»

[0242] Сначала был получен химерный белок, который состоял из нацеленного на опухоль Ab и гликозилтрансферазы, прототипической конструкции, которая обеспечивает высокоэффективную модульную систему, обладающую множеством функциональных свойств: (1) специфичность Ab является взаимозаменяемой, что позволяет обеспечивать нацеливание на различные ассоциированные с опухолью антигены. Примерами таких опухолевых антигенов-мишеней являются, но не ограничиваются ими: FOLH1/PSMA, VEGFr, CD19, CD20, CD25, CD30, CD33, CD38, CD52, CD79, антиген созревания B-клеток (BCMA), рецептор соматостатина (например, SSTR1-5), 5T4, gp100, CEA, маммоглобин A, мелан A/MART-1, PSA, тирозиназа, HER-2/neu, EGFr, hTERT, MUC1, мезотелин, нектин-4, TROP-2 и многие другие антигены, известные специалистам в данной области. Нацеливающая часть структуры может варьироваться от интактных (полноразмерных димерных) до мономерных одноцепочечных Ab-структур, Fab, Fab'2, scFv или других производных Ab-фрагмента, таких как миниантитела, диантитела, триантитела и т.п. Они могут поддерживать или удалять домен, связывающийся с FcRn. Альтернативно, нацеливающий фрагмент может представлять собой пептид, который связывается с целевым антигеном; и примерами таких пептидов являются, но не ограничиваются этим, производное глутамата-мочевины-лизина, такое как ACUPA (2-(3-((S)-5-амино-1-карбокспентил)уреидо)пентандиоевая кислота), которое связывается с FOLH1/PSMA; производное соматостатина, которое связывается с SSTR2; пептид Arg-Gly-Asp (RGD), который связывается с альфа-v/бета-3-интегрином, который экспрессируется на пролиферирующих эндотелиальных клетках, и другие нацеливающие пептиды, известные специалистам в данной области. Эти разновидности нацеливающих агентов и их различные физические свойства позволяют адаптировать фармакокинетику и биораспределения различных типов. Так, например, более крупные молекулярные конструкции, такие как полноразмерное интактное Ab, включая сайт связывания с FcRn (рецептором новорожденного), будут иметь более длительный период полужизни в плазме и во всем организме и, обычно, будут сохраняться в кровотоке; будут с большей вероятностью выводиться через печень, а не через почки; с меньшей вероятностью будут проникать в нормальные ткани благодаря промежуточным слоям нормальных клеток и плотных соединений. И наоборот, конструкции меньшего размера, без связывания с FcRn, приготовленные с использованием нацеливающего пептида, но не антитела, будут иметь тенденцию к более короткому периоду полужизни, с большей вероятностью будут выводиться через почки/мочевыводящие пути и будут легче проникать в нормальные ткани и опухоли. В дополнение к специфичности связывания с мишенью, эти различные физические свойства, ФК и биораспределение будут влиять на профиль нежелательных событий сконструированного агента. (2) компонент гликозилтрансферазы может варьироваться исходя из значительного объема информации о встречающихся в природе аллельных вариантах и их соответствующих свойствах, которые могут быть использованы для адаптации его функциональности. Этот компонент также может включать альфа-gal-

трансферазу, которая продуцирует в высокой степени иммуногенный альфа-gal-эпитоп, обычно отсутствующий у человека. Возможно также использование любого фермента, участвующего в посттрансляционной модификации. В дополнение к гликозилированию, другими примерами являются фосфорилирование и липидизация.

[0243] В качестве дополнительной альтернативы получению генетически сконструированного слитого белка можно осуществить связывание нацеливающего агента и посттрансляционного фермента благодаря использованию химической связи 2 отдельных фрагментов. Такие химические связи известны специалистам в данной области.

[0244] Для первоначального подтверждения концепции были отобраны 3 хорошо охарактеризованных, клинически подтвержденных Ab: J591 (антитело против FOLH1/PSMA (фолатгидролазы-1/специфичного для предстательной железы мембранного антигена)), 4D5 (трастузумаб; антитело против her2) и обекселимаб (антитело против CD19); 4 структуры Ab: интактные димерные, интактные мономерные, Fab и scFv и четыре варианта гликозилтрансферазы: α -1,3-галактозилтрансфераза (GTB; AF134414), альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза (GTA; AF134415), α -1,3-галактозилтрансфераза (α -1,3-Gal-T или α -Gal-T; EC 2.4.1.87) и совершенно новая структура, описанная ниже. GTB переносит фрагмент галактозы из UDP-gal-донора нуклеотидов по α -1,3-связи с акцепторным H-антигеном с образованием Gal α (1-3)[Fuc α (1-2)]Gal- β 1,4-GlcNAc-R (HBGA B); при этом, для активности GTB требуется модификация H-антигена, связанного с фукозой по α -1-2-связи, поскольку B-трансфераза не присоединяется к немодифицированному предшественнику типа 2. α -1,3-GalT переносит фрагмент галактозы от донора нуклеотидов UDP-gal по α 1,3-связи в Gal β 1,4-GlcNAc-R; для активности этого фермента не требуется α 1-2-связанная фукозная модификация H-антигена. GTB был выбран потому, что индивидуумы, имеющие фенотип HBGA типа O и A, составляют 85-90% от всего населения (см. публикацию Galili et al., «A Unique Natural Human IgG Antibody With Anti-Alpha-Galactosyl Specificity», *J. Exp. Med.* 160:1519-1531 (1984), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), и как отмечалось ранее, у этих индивидуумов имеются высокие уровни антител против HBGA B. α -1,3-GalT был выбран потому, что он может добавлять концевой Gal к клеткам, которые не образуют H-антиген, таким как клетки, полученные из гемопоэтических или мезенхимальных клеток. Выбор GTB также имеет те преимущества, что GTB является результатом наличия высокого уровня активности поликлональных анти-gal антител (ответственных за сверхострое отторжение ксенотрансплантатов), которые перекрестно реагирует с HBGA B (см. публикацию Macher et al., «The Gal alpha1,3Gal beta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) Epitope: a Carbohydrate of Unique Evolution and Clinical Relevance», *Biochim. Biophys.* 1780:75-88 (2008), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), что обусловлено по существу идентичными структурами. Из последовательности GTB (или GTA, α -GalT или FUT) вырезали короткие цитоплазматические, трансмембранные и стеблевые области, которые не являются необходимыми для ферментативной активности, и эти области заменили соответствующей последовательностью антитела (или его

производного) или пептида, с получением химерного белка, связывание которого с мембраной восстанавливается посредством домена антитела или пептида, связывающего его родственный антиген, расположенный на плазматической мембране. Анализы ELISA химерного белка подтвердили соответствующую специфичность связывания Ab, и такая иммунореактивность оставалась неизменной (фиг. 2А-2В) независимо от того, использовалось ли интактное антитело или его фрагмент. Включение 14С-gal из UDP-14С-gal в синтетический субстрат (фукозиллактозу (FL)) также оценивали, как описано в публикации Yamamoto et al., «Amino Acid Residue at Codon 268 Determines Both Activity and Nucleotide-Sugar Donor Substrate Specificity of Human Histo-Blood Group A and B Transferases. In Vitro Mutagenesis Study», *J. Biol.Chem.* 271:10515-10520 (1996), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки (фиг. 2А-2В), что подтвердило сохранение высокой активности GTB.

[0245] В дополнение к созданию таких слитых белков с помощью генной инженерии, специалист в данной области может химически связать нацеливающий белок, пептид или другое биологическое вещество с эффекторным ферментом (например, с гликозилтрансферазами), который может посттрансляционно модифицировать клеточные белки.

Пример 2. Адаптация функциональности активности гликозилтрансферазы

[0246] Глубокие знания относительно аллелей А, В и О предоставляют широкие возможности для дальнейшего совершенствования функциональности этого компонента. Так, например, среди альтернативных аллельных вариантов, которые могут быть выбраны, существует так называемая последовательность «цис-А, В», в которой 2 наиболее важных аминокислотных остатка (аминокислоты 266 и 268 GTA (Leu и Gly) и GTB (Met и Ala) могут быть взаимозаменяемыми при получении гибридной последовательности (Met и Gly) (см. публикацию Yazer et al., «The Cis-AB Blood Group Phenotype: Fundamental Lessons in Glycobiology», *Transfus. Med. Rev.* 20:207-217 (2006), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Эта последовательность цис-ферментов А, В сообщает обе специфичности НВГА А и В.

[0247] Известны и другие последовательности, которые модулируют активность фермента, что позволяет титровать его эффективность. Так, например, был получен совершенно новый вариант GTB на основе двух встречающихся в природе мутантных аллелей GTA (обозначенных Ae101 и A201). Ae101 имеет единственную инсерцию основания, а A201 имеет единственную делецию основания, и все они приводят к сдвигу рамки считывания. Сдвиги рамки считывания продуцируют трансферазы с удлинением на 37 и 21 аминокислоты, соответственно, на их С-концах. Эти образующиеся трансферазы с такими удлинениями обладают ферментативной активностью, которая снижена в 30-50 раз или более (см. публикацию Yip, «Sequence Variation at the Human ABO Locus», *Annals of Human Genetics* 66:1-27 (2002), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Хотя эти 2 мутантных аллеля были определены с точки зрения GTA, но в случае GTB, такие мутантные аллели описаны не были. Тем не менее, совершенно

новые последовательности были получены путем прямого включения удлинений С-концевой последовательности в GTB путем встраивания множества аминокислотных последовательностей различной длины перед терминирующим кодоном. Если были протестированы 4 варианта GTB, которые включали удлинения из 2, 7, 14 и 54 аминокислот, то активность GTB постепенно снижалась вплоть до 93% (фиг. 3), что обеспечивать механизм, посредством которого можно достичь желаемого уровня активности, а также включить переключатель, как описано выше, путем введения расщепляемой последовательности, которая сбрасывала бы удлинение в присутствии эндопротеаз, ассоциированных с опухолью или тканью, или эндопептидаз, таких как PSA, металлопротеиназы и т.п. Необязательный выбор последовательности для такого удлинения предоставляется на усмотрение специалиста в данной области, однако, его единственными требованиями являются то, чтобы такая последовательность была выбрана для достижения желаемого уровня ферментативной активности, который может быть оценен, как описано ниже, и чтобы она не была иммуногенной. Неиммуногенность может быть достигнута путем использования информации о последовательности нативных неиммуногенных белков (например, альбумина) или она может быть достигнута известными способами получения или определения иммуногенности, например, путем удаления мотивов связывания с Т-клетками.

Пример 3. Индуцированная экспрессия аллоантигена HBGA B *in vitro*

[0248] Чтобы продемонстрировать функциональность конструкций, клеточные линии рака предстательной железы человека LNCaP (с высоким уровнем PSMA), CWR22Rv1 (гетерогенный уровень и низкий уровень PSMA) и PC-3 (PSMA-негативные), каждая из которых в природе имеет фенотип HBGA O, инкубировали с химерным J591 (с антителом против FOLH1/PSMA)-GTB или J591 (без GTB), вместе с UDP-gal, *in vitro* и на срезах ткани ксенотрансплантата, полученных от мыши SCID. Клеточные линии и срезы тканей, инкубированные с химерным J591-GTB+UDP-gal, превращались в HBGA B, тогда как срезы, инкубированные с J591 (без GTB) + UDP-gal, не обнаруживали такого превращения, что указывает на то, что GTB был необходим для такого превращения (фиг. 4).

[0249] *In vitro*, в то время как J591-GTB преобразовывал LNCaP (с высоким уровнем PSMA) из HBGA O в HBGA B, PC3 (PSMA-негативные) не обнаруживали такого превращения (фиг. 5). Высокая степень специфичности конверсии HBGA была подтверждена тестированием клеток PC3, которые были трансфицированы PSMA (PC3-PSMA). В этих клетках, которые гетерогенно экспрессируют PSMA, были преобразованы только те клетки, которые были позитивными по PSMA; а соседние PSMA-негативные клетки не обнаруживали такого превращения (фиг. 6).

[0250] Клетки HBGA O LNCaP также совместно инкубировали с цельной кровью типа O плюс UDP-Gal и с J591 или с J591-GTB или с J591-GTB с удлинением на 54 аминокислоты. Как показано на фиг. 7, J591 не преобразовало ни одной клетки, тогда как

J591-GTB, с удлинением или без него, преобразовывало клетки LNCaP, но не эритроциты, из типа O в тип HBGA B.

Пример 4. Литическая активность нормальной человеческой сыворотки O или A после превращения раковых клеток в HBGA B-клетки

[0251] Анализ *in vitro* проводили для тестирования литической способности нормальных человеческих сывороток O и A лизировать клетки рака предстательной железы или молочной железы после преобразования в экспрессию HBGA B. На фиг. 8A-8D показано, что клетки LNCaP (HBGA O) лизируются при инкубировании с J591-GTB+UDP-gal+ сывороткой человека A (или сывороткой O) в качестве источника компонентов антитела против B и комплемента. Исключение человеческой сыворотки A или O и/или замена J591-GTB на J591 без GTB не приводили к лизису.

[0252] Была проанализирована большая панель клеточных линий рака предстательной железы, каждая из которых имела фенотип HBGA O, как по исключению трипанового синего (фиг. 9), так и по поглощению иодида пропидия с помощью FACS-анализа (фиг. 10). Четыре из этих линий (LNCaP, VCaP, MDA-PCa-2b и CWR22Rv1) экспрессируют различные уровни PSMA, от высоких до низких, и все они были лизированы при инкубировании с J591-GTB+человеческой сывороткой O или A, содержащей природное анти-B Ab плюс эндогенный комплемент. 5-я клеточная линия, PC3, то есть, PSMA-негативная, не подвергалась конверсии и не лизировалась (фиг. 11A-11B). Аналогичные результаты были получены с клеточной линией рака молочной железы MDA-MB-361 после конверсии химерным агентом mAb 4D5-GTB.

Пример 5. Конверсия экспрессии HBGA *in vivo*

[0253] Поскольку быстрое отторжение и разрушение трансплантатов твердых органов, несоответствующих HBGA, является хорошо задокументированным и известным явлением у человека с первых дней почечных аллотрансплантатов (см. публикацию T. Starzl, *Experience In Renal Transplantation*. (WB Saunders Company, Philadelphia, PA, chapter 6 (1964); L. Altman, Doctors Discuss Transplant Mistake. *New York Times*. (2003), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), то важным экспериментом *in vivo* является эксперимент, который должен был продемонстрировать, что HBGA установленного рака человека может быть преобразован в высокоиммуногенный HBGA посредством «молекулярной трансплантации» аллогенной гликозилтрансферазы, нормально функционирующей в аппарате Гольджи/ЭР, на плазматическую мембрану опухолевых клеток с применением системного подхода, нацеленного на опухоль. Для подтверждения этой концепции были выбраны два клинически хорошо зарекомендовавших себя ассоциированных с опухолью антигена (FOLH1/PSMA и HER2), полученные из 2 наиболее распространенных типов солидных опухолей, а именно, рака предстательной железы и молочной железы, соответственно. Были протестированы множественные опухолевые линии, экспрессирующие широкий диапазон целевых уровней экспрессии. Рак предстательной железы LNCaP, C4-2 и CWR22Rv1, позитивный по PSMA, и рак молочной железы, позитивный по her2, MDA-MB361, были обнаружены в подкожных участках у

мышей NOD SCID. J591-GTB или 4D5/трастузумаб-GTB вводили внутривенно; UDP-gal вводили либо внутривенно, либо внутривенно, либо подкожно. J591-GTB и 4D5/трастузумаб-GTB преобразовали рак предстательной железы, позитивный по PSMA, и рак молочной железы, позитивный по her2, соответственно (фиг. 10A-10H. См. также фиг. 12A-12E).

[0254] Конверсия HBGA B была низкой после внутривенного введения UDP-gal по сравнению с внутривенным или подкожным введением. Экспрессия HBGA явно присутствовала на плазматической мембране. Как и ожидалось, замена Ab-GTB только соответствующим Ab приводила к отсутствию экспрессии HBGA B. Конверсия не была обнаружена ни в каких других тканях, и у животных не было никаких признаков токсичности.

Пример 6. Противоопухолевая активность *in vivo*

[0255] Тестирование противоопухолевой активности, которая является результатом направленной конверсии экспрессии HBGA Ab-GTB на животном-модели, представляло несколько проблем, поскольку как мыши, так и крысы экспрессируют цис-аллели A, B, а также аллель α 1,3-GalT. В результате, эти грызуны-модели являются как HBGA A, так и B-позитивными, а также альфа-1,3-gal-позитивными и, следовательно, толерантными ко всем этим гликоструктурам. Кроме того, мыши имеют исключительно слабые или неактивные системы комплемента (см. публикацию Bergman et al., *Cancer Immunol. Immunother.* (2000) 49:259-266; Drake et al., «Passive Administration of Antiserum and Complement in Producing Anti-EL4 Cytotoxic Activity in the Serum of C57BL/6 Mice», *J Natl. Cancer Inst.* 50:909-14 (1973); Ong et al., «Mouse Strains With Typical Mammalian Levels of Complement Activity» *J. Immunol. Methods* 125:147-158 (1989), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), а в некоторых случаях, даже наблюдается ингибирование функцию активности комплемента у животных других видов, включая человека (см. публикацию Ratelade et al., «Inhibitor(s) of the Classical Complement Pathway in Mouse Serum Limit the Utility of Mice as Experimental Models of Neuromyelitisoptica», *Mol. Immunol.* 62:104-113 (2014), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Действительно, активность комплемента нормальной плазмы человека анализировали в присутствии плазмы C57BL/6, и было обнаружено, что литическая активность комплемента человека была снижена приблизительно на 33%. Чтобы избежать отсутствия природных антител и устранить слабую или даже ингибирующую функцию системы комплемента, у этих животных-моделей потребовалась бы почти полная замена плазмы животных плазмой человека типа O или A для обеспечения необходимых природных антител и функциональных белков комплемента. Такая замена плазмы физически непрактична, будет приводить к перегрузке жидкостью, не сможет обеспечить соответствующее равновесие биораспределения иммуноглобулинов, которое отражает устойчивое состояние человека, и будет нарушено ингибирующим действием нативной плазмы мыши. Эти проблемы были преодолены благодаря разработке модели внутривенного ксенотрансплантата у мышей NOD/SCID с использованием резистентной к кастрату линии человеческих PC-

клеток, содержащих С4-2-люциферазу, и в эти клетки можно было вводить человеческую плазму внутривенно для обеспечения природных антител и комплемента, не вызывая перегрузки жидкостью. Через несколько дней после IP-инъекции 10×10^6 С4-2-luc-клеток и после подтверждения взятия опухоли с помощью биолюминесцентной визуализации, 2 группы по 5 животных, каждая с сопоставимой медианой/диапазоном потока биолюминесцентных фотонов, получали однократную IP-дозу J591-GTB, UDP-gal и человеческой сыворотки типа О. Для контрольной группы, сыворотку типа О перед инъекцией подвергали термоинактивации. Общий поток для каждого животного оценивали через каждые 3-4 дня в течение приблизительно 2 недель. В то время как у животных, которые получали термоинактивированную сыворотку, наблюдалось значительное прогрессирование опухоли на 13-й день, у животных, получавших сыворотку, содержащую активный комплемент, наблюдалась регрессия на 80% по сравнению с потоком у контрольной группы ($p=0,0032$; фиг. 13А-13В). Повторный эксперимент дал похожие результаты (фиг. 14А-14В).

Обсуждение примеров 1-6

[0256] Иммунный ответ на рак резко отличается от ответа на несовместимый аллотрансплантат. В настоящей заявке описана стратегия селективной модификации опухолевых клеток для экспрессии неаутологичного, высокоиммуногенного фенотипа, несовместимого с экспрессией HВGA. Быстрый и разрушительный результат применения аллотрансплантата, несовместимого с HВGA, у человека был обнаружен Starzl в первые дни введения почечных аллотрансплантатов (см. публикацию Т. Starzl, *Experience In Renal Transplantation*. (WB Saunders Company, Philadelphia, PA, chapter 6 (1964), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки) и привел к необходимости тестировать совместимость HВGA как неотъемлемую и важную часть подбора донора-реципиента. И лишь в тех редких случаях, когда возникает ошибка и не выполняется требование совместимости с HВGA, эту процедуру повторяют и подкрепляют полученными данными (см. публикацию L. Altman, *Doctors Discuss Transplant Mistake*. *New York Times* (2003), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0257] Для реализации этой стратегии, клинически подтвержденные антитела, ограничивающие рост опухоли (например, антитела против FOLH1/PSMA и против HER2), были слиты с GTB для получения единого бифункционального белка. Аналогичным образом были сконструированы нацеливающие гликозилтрансферазы (GTS) с использованием различных фрагментов антител, пептидов/лигандов и конструкций. Хотя последствия несовместимости аллотрансплантатов АВО у людей хорошо известны, однако, в этой попытке, задача заключалась в молекулярной «трансплантации» функции посттрансляционной гликозилтрансферазы, обычно обнаруживаемой в аппарате Гольджи, на поверхности опухолевых клеток (или эндотелиального васкулярного новообразования), и такую молекулярную «трансплантацию» осуществляют путем системного введения в опухоль.

[0258] Эти химерные белки успешно изменяли HBGA различных линий раковых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. В экспериментах на животных не было обнаружено отклоняющейся от цели конверсии HBGA или токсичности. Как показано в настоящей заявке, HBGA-несовместимые клетки запускают опосредованный комплементом лизис, то есть, реакцию, которая, по прогнозам, разовьется у пациента с онкологией точно так же, как это было продемонстрировано много раз в клинических условиях трансплантации (см. публикацию L. Altman, Doctors Discuss Transplant Mistake. *New York Times* (2003); T. Starzl, *Experience In Renal Transplantation*. (WB Saunders Company, Philadelphia, PA, chapter 6 (1964), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0259] Биосинтез neo-HBGA требует присутствия как GT, так и (фукозилированного) H-антигена с «акцепторной структурой» на гликопротеинах и гликолипидах клеток-мишеней (см. публикацию Milland et al., «ABO Blood Group and Related Antigens, Natural Antibodies and Transplantation», *Tissue Antigens* 68:459-466 (2006), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки) для добавления HBGA. Поскольку карциномы широкого спектра экспрессируют H-антиген, включая карциномы легких, желудка, прямой и ободочной кишки, молочной железы, предстательной железы, яичников, мочевого пузыря, поджелудочной железы и т.п., то опухоли этих типов могли бы быть кандидатами для этой стратегии. Нормальные клетки, не являющиеся мишенями, не подвергаются конверсии HBGA из-за: (1) отсутствия связывания нацеливающего фермента GTB (или GTA) и (2) отсутствия требуемого H-Ag во многих клетках нормальных типов (например, костного мозга, печени, селезенки, почек, миокарда, центральной и периферической нервной системы и т.п.), что исключает активность трансферазы GTB (или GTA) в этих участках. Сообщалось об экспрессии FOLH1/PSMA в новообразованной сосудистой сети опухолей широкого спектра, но отсутствующей в сосудистой сети нормальной ткани. Примерами типов опухолей, которые имеют FOLH1/PSMA-позитивную неососудистую структуру, являются опухоли почек, легких, толстой кишки, желудка, молочной железы, головного мозга, поджелудочной железы, печени, мочевого пузыря, пищевода, надпочечников, головы и шеи; меланома и опухоли головного мозга и т.п. Реже, но иногда, FOLH1-позитивными являются опухоли яичек, лимфоидные опухоли и саркомы. Нацеливание на экспрессию FOLH1/PSMA в новообразованной сосудистой сети обеспечивает средство для изменения экспрессии HBGA в сосудистом ложе опухолей широкого спектра. Это, в свою очередь, может приводить к аналогичному феномену сверхострого отторжения, наблюдаемому в аллотрансплантатах твердых тканей с несоответствующим HBGA (см. публикацию Altman, Doctors Discuss Transplant Mistake. *New York Times* (2003); T. Starzl, *Experience In Renal Transplantation*. (WB Saunders Company, Philadelphia, PA, chapter 6 (1964), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки).

[0260] Ферментативная природа реакции обеспечивает эффект амплификации, поскольку каждая молекула нацеливающего фермента преобразует множество молекул-акцепторов. Кроме того, ферментативно преобразуются не только сами антигены,

ассоциированные с опухолью, на которые было нацелено Ab, но и все соседние молекулы, которые находятся в пределах досягаемости фермента. И поскольку большинство молекул клеточной поверхности имеют несколько сайтов гликозилирования, например, FOLH1/PSMA имеет 10 сайтов гликозилирования (20, если учесть, что FOLH1/PSMA обычно экспрессируется в виде гомодимера), то количество неаутологичных сайтов НВГА, которые могут быть получены с применением такого подхода, играет очень существенную роль. Кроме того, гликопротеины, секретируемые неоваскулярными или опухолевыми клетками-мишенями, также подвергаются конверсии НВГА, приводящей к активации комплемента в микроокружении опухоли, и тем самым к усилению иммунного ответа вокруг опухоли.

[0261] Эти вышеупомянутые факторы, а именно, амплификация фермента, конверсия как непосредственно нацеливающих, так и соседних молекул и секретируемых гликопротеинов, а также увеличение числа сайтов гликозилирования, должны давать беспрецедентные уровни в высокой степени иммуногенной экспрессии антигена опухолевыми клетками и в микроокружении опухоли даже в случае слабо экспрессируемой ассоциированной с опухолью антигенной мишени. Поскольку пациенты с НВГА О и А составляют приблизительно 85% населения, то GTB использовался в попытках доказательства этой концепции. Кроме того, поскольку активность поликлонального антитела против gal, которая исключает ксенотрансплантацию, перекрестно реагирует с НВГА В (см. публикацию Macher et al., «The Gal alpha1,3Gal beta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) Epitope: a Carbohydrate of Unique Evolution and Clinical Relevance» *Biochim. Biophys.* 1780:75-88 (2008), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки), то индуцированная экспрессия НВГА В опухолью и/или ее кровоснабжением делает ее мишенью беспрецедентного уровня атаки со стороны антител, фиксирующих комплемент и способных опосредовать высокие уровни воспаления и сверхострое отторжение. Эта стратегия может быть расширена для охвата пациентов с НВГА О, А и В ($\approx 95\%$ населения) с использованием GT с активностью как А, так и В. Это может быть достигнуто путем замены одного нуклеотида/аминокислоты 803G>C (Gly268Ala) GTA, то есть, мутации, которая в природе возникает в так называемом цис-AB GT и которая генерирует как НВГА А, так и В. Этот подход был бы применим ко всем пациентам, кроме пациентов с АВ ($\approx 5\%$ населения), у которых нет природных антител ни к А, ни к В.

[0262] Описанный здесь способ имеет много общих черт с недавними успешными иммунотерапевтическими подходами и дополняет их. Подобно подходам с использованием CAR-T и биспецифических Ab, в которых используют T-клеточный литический механизм, в подходе согласно изобретению задействован литический механизм каскада реакций комплемента. И помимо прямого литического эффекта, запуск каскада реакций комплемента в микроокружении опухоли служит связующим звеном для повышения эффективности клеточного иммунного ответа, поскольку C3 активирует АПК (см. публикации Baudino et al., «C3 Opsonization Regulates Endocytic Handling of Apoptotic Cells Resulting in Enhanced T-cell Responses to Cargo-Derived Antigens», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

111:1503-1508 (2014); Surace et al., «Complement is a Central Mediator of Radiotherapy-Induced Tumor-Specific Immunity and Clinical Response» *Immunity* 42:767-777 (2015), которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки), для стимуляции «примирования» Т-клеток (см. публикацию Kopf et al., «Complement Component C3 Promotes T-cell Priming and Lung Migration to Control Acute Influenza Virus Infection» *Nature Med.* 8:373-378 (2002), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Кроме того, недавно было показано, что высвобождение свободного C3d, фрагмента C3, истощает Treg (посредством апоптоза), увеличивает инфильтрацию CD8⁺-Т-клеток, продуцирующих перфорин, TNF- α и IFN- γ и снижает экспрессию PD-1 Т-клетками (см. публикацию Platt et al., «C3d Regulates Immune Checkpoint Blockade and Enhances Antitumor Immunity», *JCI Insight.* 2:e90201 (2017), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Кроме того, активация системы комплемента генерирует хемотаксические факторы, такие как C3a и C5a, которые индуцируют воспаление и обеспечивают рекрутинг воспалительных клеток. Это могло бы превратить «холодное» микроокружение опухоли в «горячее», что еще больше способствовало бы иммунному ответу. Подводя итоги, можно отметить, что описанный здесь подход обеспечивает необходимый потенциал для расширения масштабов и силы иммунной атаки на рак за счет непосредственного вовлечения гуморальной иммунной системы и каскада реакций комплемента, а также за счет его роли в усилении клеточного иммунного ответа.

Пример 7. В-конверсия MM1-S под действием антитела против CD19-GTB

[0263] На чертежах 15-17 показана способность превращать CD19-позитивные/НВГА О-позитивные клетки миеломы в клетки, экспрессирующие НВГА В. В этом случае, клетки миеломы MM1-S, пассированные в культуре ткани, были протестированы методом клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) с использованием мышиных моноклональных антител против CD19, CD20, CD38 (фиг. 15), НВГА А, НВГА В (Fisher Scientific (Ortho) и Ulex-FITC или Ulex-Dylight (Vector Labs) для выявления НВГА О (фиг. 16А-16В). Клетки MM1-S инкубировали в течение 1 часа с каждым из антител, а затем клетки промывали и инкубировали с соответствующим вторым антителом, таким как антитело против мышиных IgM-Alexa 488 или 647 (Jackson ImmunoResearch), где первым антителом является IgM или помеченное антитело против мышиных IgG, если первым антителом является IgG. После еще одной промывки, клетки анализировали методом FACS. Как показано на фиг. 17, клетки MM1-S инкубировали со слитым белком «антитело против CD19-GTB» плюс UDP-gal, и экспрессию НВГА В сравнивали с помощью FACS с необработанными клетками.

[0264] На фиг. 15 показаны клетки миеломы MM1-S, CD20-негативные и содержащие CD19 и CD38. На фиг. 16А-16В показано, что клетки MM1-S являются НВГА А- и В-негативными (фиг. 16А), но НВГА О-позитивными (фиг. 16В). На фиг. 17 показано, что клетки MM1-S, инкубированные со слитым белком антитело против CD19-GTB плюс

UDP-gal, преобразуются в клетки с высоким уровнем экспрессии НВГА В по сравнению с необработанными клетками.

[0265] Эти эксперименты представляют еще один пример направленной на опухоль конверсии для экспрессии чужеродного антигена: НВГА В. В этом случае, мишенью является CD19, маркер В-клеток, также присутствующий при В-клеточных злокачественных новообразованиях. Этот эксперимент также представляет преобразование гематогенного типа опухоли, тогда как другие приведенные примеры представляют эксперимент для предстательной железы (PSMA) и молочной железы (HER2), которые являются примерами солидных опухолей.

Пример 8. Нацеливание гликозилтрансферазы с помощью низкомолекулярного лиганда в качестве альтернативы антителу или производному антитела

[0266] На фиг. 18 показано, что нацеливание GTA, GTB или альфа-gal может быть осуществлено не только с использованием конструкций на основе антител, но также с использованием нацеливающего агента на основе пептида/низкомолекулярного лиганда. В этом случае, фермент GTB был конъюгирован с 2-(3-((S)-5-амино-1-карбокспентил)уреидо)пентандиоевой кислотой (ACUPA), лигандом на основе галактозы, мочевины и лизина, который связывается с PSMA. Для достижения высокого уровня связывания, между частями ACUPA и GTB был встроены спейсер ПЭГ 1500. Это давало адекватную стерическую свободу для ACUPA, чтобы обеспечить связывание ферментативного кармана PSMA без стерического затруднения со стороны гораздо более крупного фермента GTA/GTB.

[0267] На фиг. 18 показано, что ACUPA-PEG1500-GTB может преобразовывать клетки LNCaP из НВГА О в НВГА В (левая панель). Использование чистого GTB без компонента ACUPA для нацеливания не привело к какой-либо конверсии (правая панель).

[0268] Гибкость использования различных нацеливающих групп, от крупных антител с молекулярной массой 150 кД до более мелких молекул, происходящих от антител, таких как мономерные (75 кД), Fab'2 (100 кД), Fab (50 кД), scFv (25 кД), вплоть до короткого пептида, такого как ACUPA (1,0 кД), позволяет конструировать слитые белки с различными фармакокинетическими свойствами и свойствами биораспределения. Более крупные слитые белки будут циркулировать в кровотоке дольше, обычно, дольше остаются в кровеносном сосуде и выводятся через печень, в то время как более мелкие конструкции, обычно, имеют более короткое время полужизни в сыворотке, быстрее достигают опухолевой мишени и выводятся через почки. Этими различными вариантами можно воспользоваться для подбора терапии в зависимости от опухолей различных типов (например, гематологических или солидных опухолей).

Пример 9. Специфичность и точность конверсии; отсутствие «эффекта стороннего наблюдателя»

[0269] Как показано на фиг. 19 и 20, было проведено совместное культивирование клеточной линии рака молочной железы SK-BR5 (PSMA-негативной) и клеточной линии

рака предстательной железы LNCaP (PSMA-позитивной). Эти клетки можно различить по их заметно отличающейся морфологии: SK-BR5 являются круглыми, а 2 скопления видны около центра и сверху (красные кружки) поля на фиг. 19. LNCaP являются более тонкими, и эти клетки также экспрессируют GFP в качестве идентификационного маркера.

[0270] Если культуру обрабатывали J591-GTB+UDP-gal, то HBGA B (окрашенные Cy5 (фиолетовым)) появляется только на PSMA-позитивных клетках. Соседние скопления PSMA-негативных клеток SKBR5 (выделены красными кружками) не преобразуются в HBGA B, несмотря на близость к клеткам, которые преобразуются. Аналогично, на фиг. 20 показаны те же различимые типы клеток. На левой панели показаны все клеточные ядра, окрашенные DAPI. На средней панели показаны веретенообразные клетки LNCaP с флуоресценцией в зеленом диапазоне спектра, обусловленной экспрессией GFP. На правой панели, после обработки J591-GTB+UDP-gal показано, что HBGA B экспрессируется только PSMA-позитивными клетками LNCaP, тогда как PSMA-негативные клетки SK-BR5 остаются HBGA B-негативными.

[0271] Это демонстрирует как высокую степень специфичности, так и отсутствие «эффекта стороннего наблюдателя», то есть, даже соседние клетки не преобразуются, если они непосредственно не являются мишенями и не связывают слитый белок.

Пример 10 - Количественное определение индекса специфичности

[0272] На фиг. 21A-21B и 22 количественно показан индекс специфичности для одних и тех же 2 PSMA-позитивных и -негативных клеточных линий. Антитела против PSMA-GTB в различных концентрациях от 100 мкг/мл до 0,003 мкг/мл, инкубировали отдельно с каждой из клеточных линий в присутствии донора нуклеотидов UDP-gal. Специфичность конверсии определяли количественно с использованием FACS путем сравнения концентрации J591 (антитела против PSMA)-GTB, необходимой для конверсии LNCaP (PSMA+) в HBGA B, по сравнению с клетками SK-BR5 (PSMA-негативными). Обе клеточные линии являются O-позитивными. Гистограммы FACS показаны на фиг. 21A-21B. Следует отметить, что концентрации, превышающие 12,5 мкг/мл, накладываются на кривую 12,5 мкг/мл и не отображаются на гистограмме FACS для упрощения просмотра.

[0273] Никакого B-превращения SK-BR5 не происходило даже при концентрациях J591-GTB до 100 мкг/мл. Для сравнения, антитело против PSMA-GTB в концентрации по меньшей мере 0,012 мкг/мл начинает индуцировать конверсию PSMA-позитивных клеток. Эти данные представлены в виде гистограммы на фиг. 22. Это указывает на то, что слитый белок по меньшей мере в 8196 раз более специфичен для PSMA-позитивных клеток, чем для тех клеток, которые являются PSMA-негативными. Это является результатом способности слитого белка связываться непосредственно с PSMA-позитивными клетками, где он концентрируется на поверхности клетки и выполняет свою ферментативную функцию. Ферментативная реакция намного слабее или вообще отсутствует там, где фермент не связывается с поверхностью клетки-мишени. Концентрации выше 100 мкг/мл не тестировали из практических соображений; возможно, что вычисленный индекс специфичности на самом деле намного больше и выше, чем в 8000 раз.

[0274] На фиг. 19-22 продемонстрирована исключительная специфичность реакции конверсии, которая ограничена только клетками-мишенями, и отсутствие «эффекта стороннего наблюдателя», при котором даже клетки, соседствующие с конвертирующей/мишень-позитивной клеткой, не конвертируются, если эти клетки являются мишень-негативными и не связывают слитый белок.

Пример 11. Этим методом были гликозилированы как клеточная поверхность, так и секретируемые гликопротеины

[0275] Поскольку гликопротеины клеточной поверхности и секретируемые гликопротеины гликозилируются посредством одних и тех же клеточных процессов в аппарате Гольджи/эндоплазматическом ретикулуме, то в дополнение к превращению НВГА-молекул клеточной поверхности, гликопротеины, секретируемые клеткой-мишенью, также превращаются в НВГА. В этом репрезентативном случае, секретируемые гликопротеины преобразуются в НВГА В-позитивные. Клетки LNCaP обрабатывали J591-GTB плюс UDP-gal в течение 5 часов (10 мкг/мл антитела против PSMA-GTB+100 мкМ UDP-gal). В качестве негативного контроля, другой набор клеток LNCaP инкубировали с 10 мкг/мл антитела против PSMA-GTB, но без UDP-gal. В качестве позитивного контроля, оценку конверсии клеточной поверхности проводили с использованием неконвертированных клеток, служащих фоновым контролем. После 5-часового инкубирования, отработанную среду, содержащую секретируемые гликопротеины, собирали из каждого набора клеток и концентрировали 10-кратно с использованием отсечки Amicon 3000 Дальтон. Отработанную среду адсорбировали в лунках планшета и анализировали методом ELISA на присутствие НВГА В с использованием антитела IgM против НВГА В с последующим добавлением антитела против мышинных IgM, конъюгированного с щелочной фосфатазой.

[0276] На фиг. 23 показано, что по сравнению с негативным контролем (неконвертированной отработанной средой), преобразованная среда была позитивной по присутствию НВГА В на секретируемых белках.

[0277] Это указывает на то, что конверсия НВГА В не ограничивается клеточной поверхностью, но также включает гликопротеины, секретируемые клетками-мишенями. *In vivo*, это позволяет предположить, что такие преобразованные секретируемые гликопротеины проникают во внеклеточное пространство опухоли, связываются с природным антителом против В, запускают комплемент и генерируют провоспалительное микроокружение, обеспечивают рекрутинг воспалительных и иммунных клеток посредством хемотаксиса и впоследствии преобразуют микросреду опухоли в «горячую».

Пример 12. Анализ на утилизацию альфа-1,3-галактозилтрансферазы (αGalT)

[0278] В дополнение к использованию ферментов гликозилтрансферазы А или В человека, в другом варианте осуществления изобретения используется фермент альфа-1,3-галактозилтрансфераза (αGalT, EC 2.4.1.87), который функционирует у всех млекопитающих, но является неактивным у людей и мармышек из-за эволюционных мутаций. GTA, GTB и альфа-1,3-GalT являются в высокой степени гомологичными и, как

считается, произошли от одного и того же предкового гена. Подобно GTB, альфа-GalT добавляет концевую альфа-1,3-галактозу к углеводной цепи клеточной поверхности и секретируемым гликопротеинам и гликолипидам, но в отличие от GTB, альфа-GalT может добавлять свой Gal в отсутствие акцепторной структуры фукозы H-антигена. Поскольку у всех людей отсутствует функциональный альфа-GalT и, следовательно, отсутствует экспрессия этого терминального эпитопа альфа-1,3-Gal, то все они имеют повышенные уровни антител против альфа-Gal классов IgM, IgG, IgA и IgE, которые, по оценкам специалистов, составляют приблизительно 1% от всего иммуноглобулина в кровотоке. Именно иммуногенность этого эпитопа альфа-1,3-Gal препятствует ксенотрансплантации от других млекопитающих, которые имеют функциональный аGalT и экспрессируют конечный альфа-1,3-Gal в своих тканях, включая кровеносные сосуды.

[0279] Использование альфа-GalT отменяет необходимость выбора GTA или GTB в зависимости от группы крови индивидуума. Это также позволяет применять этот подход к лечению пациентов с группой крови АВ, у которых нет природных антител ни к HBGA А, ни к В, но есть, антитела против альфа-1,3-Gal. Отказ от требования к фукозе H-антигена в качестве акцептора в случае альфа-GalT также расширяет типы тканей, на которые можно воздействовать. Так, например, гемопоэтические клетки и клетки мезенхимального происхождения (и опухоли, происходящие от клеток этих типов), а также другие ткани лишены экспрессии акцептора H-антигена. Эти ткани/опухоли не поддавались бы лечению с помощью GTA или GTB, но могли бы быть устранены с помощью альфа-1,3-GalT.

[0280] Одна из проблем, связанных с использованием альфа-Gal- трансферазы, заключается в том, будет ли сам фермент иммуногенным у человека, если учесть, что у человека не экспрессируется функциональный вариант этого фермента. Если бы это было так, то повторное введение потребовало бы, чтобы фермент был гуманизованным или деиммунизованным. Эта проблема была оценена путем анализа сывороток 50 случайно выбранных пациентов с различными группами крови, чтобы определить, присутствуют ли у них какие-либо антитела против альфа-GalT.

[0281] Анализ ELISA проводили путем нанесения покрытия $\alpha 1,3GalT$ (500 нг/мл) на 96-луночный микропланшет с высокой степенью связывания на половину площади в течение ночи при 37°C. Лунки с негативным контролем не были покрыты ферментом. После промывки и блокирования PBS-HSA (5%), сыворотки от 50 различных доноров добавляли в планшет в течение 2 часов при комнатной температуре (КТ). Это процедура включала введение сыворотки от 21 пациента типа О, 20 А, 3 В и 6 АВ. После промывки, антитела против $\alpha 1,3GT$ были обнаружены в результате добавления раствора антител против человеческого IgG+IgM-Alk Phos с последующим добавлением PNPP и считыванием данных с планшета на 405 нм. Для гарантии того, что $\alpha 1,3GT$ был правильно сенсibilизирован, белок был обнаружен с использованием антитела против His-метки, поскольку $\alpha 1,3GT$ был помечен His-меткой (позитивный контроль). В качестве другого контроля, чтобы убедиться, что конъюгированное с AP антитело против человеческих IgG+IgM было функциональным, наносили покрытие в виде BSA в концентрации 500 нг/мл

и оценивали наличие антител против BSA сыворотки человека (HBGA A) с применением того же самого метода.

[0282] Было обнаружено, что ни одна из 50 сывороток не содержала антител против альфа-1,3-GalT (фиг. 24А-24В). Предполагается, что это связано с гомологией широкого спектра гликозилтрансфераз, включая, но не ограничиваясь ими, GTA и GTB. Этот результат указывает на то, что можно использовать фермент альфа-GalT в слитом белке, чтобы продуцировать эпитоп альфа-Gal, не беспокоясь о том, что слитый белок будет иммуногенным. Следовательно, маловероятно, что в данном случае потребуется деиммунизация или гуманизация.

Пример 13. Экспрессия и очистка рекомбинантной альфа-1,3-галактозилтрансферазы (αGalT)

[0283] Был сконструирован анти-CD19 scFv, слитый с частью последовательности альфа-1,3-GalT (аминокислоты 90-376), аналогично подходу с использованием GTA и GTB. Используемые последовательности scFv были получены из денитгузумаба (Den) от Seattle Genetics и обекселимаба (Obx) от Xenacor, которые распознают CD19 собакоподобных обезьян и человека и связываются с ним. Был использован тот же самый спейсер/линкер (G₄S)₃, ранее описанный для конструкции Ab-GTB. Для альфа-GalT была выбрана последовательность игрунок, которая содержит 376 аминокислотных остатков и соответствует общей топологии гликозилтрансфераз: 6 аминокислот в цитоплазматическом домене, 16 аминокислот в трансмембранном домене и 354 аминокислоты в просвечивающем домене, обладающем ферментативной активностью.

[0284] Область стебля α1,3GT игрунок состоит из 67 аминокислот и охватывает 23-89 аминокислот просвечивающего домена фермента; и ее можно удалить без какого-либо влияния на активность фермента. Усеченный фрагмент из 90-376 α1,3GT является функциональным и был выбран для слитого белка. К ферменту была добавлена his-метка. Конструкцию экспрессировали в клетках Expi293F и очищали с использованием колонки с аффинностью к металлу.

[0285] Электрофорез в ПААГ с ДСН, проводимый с использованием антитела против his, выявил с высокой степенью чистоты препараты желаемых конструкций с их соответствующими предсказанными молекулярными массами (фиг. 25).

Пример 14. Исследование функциональности и специфичности конструкций «анти-CD19 scFv-альфа-GalT»

[0286] Чтобы продемонстрировать функциональность и специфичность конструкций «анти-CD19 scFv-альфа-GalT» была выбрана гемопоэтическая мишень, которая не экспрессирует ни структуру акцептора Н-антигена, ни HBGA A или B:CD19 на клетках В-лимфомы Raji. CD19 также является подтвержденной опухолевой мишенью. В дополнение к функциональности, специфичность оценивали путем сравнения добавления альфа-Gal к CD19⁺-клеткам Raji, совместно инкубированным с CD19-негативными клетками MM1.S.

[0287] CD19-позитивную линию раковых клеток Raji-GFP смешивали с CD19-негативными раковыми клетками (MM1.S) в различных соотношениях и инкубировали с конструкциями scFv- α GalT (10 мкг/мл) и UDP-Gal (5 мМ) в течение 1 часа при 37°C. Наличие эпитопов α 1,3Gal затем оценивали методом проточной цитометрии с использованием антитела против α 1,3Gal; клетки Raji-GFP использовали для их дифференциации от клеток MM1.S.

[0288] Слитый белок связывается с CD19-позитивными клетками Raji с насыщением 1-10 мкг/мл, но не связывается с CD19-негативными клетками MM1.S (фиг. 26А-26В). Конструкции анти-CD19 scFv- α GalT добавляли концевой альфа-1,3-Gal к CD19-позитивным клеткам Raji, но не к CD19-негативным клеткам MM1.S (фиг. 27), даже если последние присутствуют в 30-кратном избытке по сравнению с первыми. MM1.S, даже при высоком соотношении к клеткам Raji, никогда не становились α Gal-позитивными в присутствии слитых белков scFv- α GalT+UDP-Gal.

[0289] Альфа-1,3-GalT сама по себе, без scFv-связывающего домена, не добавляет фрагмент Gal, что указывает на то, что для добавления альфа-1,3-Gal требуется связывание посредством антитела (или его фрагмента) слитого белка (фиг. 28). Кроме того, если UDP-gal не добавляли, то Gal не добавлялся к клеткам-мишеням. В присутствии UDP-gal добавляли фрагмент альфа-1,3-Gal, но он не продуцирует эпитоп HBGA B, о чем свидетельствует отсутствие связывания антитела с HBGA B (фиг. 28).

Пример 15. Способность конструкции анти-CD19 scFv- α GalT преобразовывать свежие лимфоциты человека

[0290] Аналогичным образом была протестирована способность анти-CD19 scFv- α GalT преобразовывать свежие лимфоциты человека. Чтобы избежать искажения результатов из-за присутствия конструкции антитела против CD19, для идентификации В-клеток в этом эксперименте использовали антитело против CD20. Клетки инкубировали только с UDP-gal, только с Obx против CD19-альфа GalT или с обоими Obx против CD19-альфа-GalT плюс UDP-gal в указанных концентрациях. Двухканальный FACS использовали для оценки связывания CD19-альфа-GalT (ось X) и экспрессии альфа-Gal-эпитопа (ось Y) (фиг.29). Также был использован негативный контроль без обработки.

[0291] CD20-негативные клетки не связывались со слитым белком и не были преобразованы для экспрессии альфа-1,3-Gal (фиг. 29, верхняя панель). CD20-позитивные клетки (фиг. 29, нижняя панель) продемонстрировали связывание слитого белка и превращались в клетки, экспрессирующие альфа-1,3-Gal только при добавлении UDP-gal.

Пример 16. Литическая функциональность человеческих сывороток, взятых у доноров с различными группами крови, на CD19-позитивных клетках Raji-GFP

[0292] Была протестирована литическая функциональность человеческих сывороток, взятых у доноров с различными группами крови, на CD19-позитивных клетках Raji-GFP. CD19⁺-клетки Raji-GFP инкубировали с Obx- α GT (10 мкг/мл) в присутствии UDP-Gal (5 мМ) или без него в течение 1 часа при 37°C. Затем к клеткам добавляли сыворотки от различных доноров и инкубировали в течение 4 часов при 37°C.

Жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитометрии путем оценки их экспрессии GFP.

[0293] Если UDP-gal не был предоставлен в качестве донора нуклеозидов для завершения конверсии анти-CD19 scFv-aGalT для экспрессии концевой альфа-1,3-Gal, то наблюдался только фоновый лизис (фиг. 30). Но если был включен UDP-gal и произошла конверсия альфа-gal, то сыворотки человека лизировали преобразованные клетки. В этом эксперименте было обнаружено, что сыворотки типа O и A вызывали больший лизис, чем сыворотки типа B или AB.

Пример 17. Конверсия и лизис свежих В-клеток человека с использованием аутологичных сывороток

[0294] Все вышесказанное было применено для исследования конверсии и лизиса свежих В-клеток человека с использованием аутологичных сывороток (от того же донора), при этом, также оценивали уровень антитела против альфа-1,3-Gal IgG и IgM у отдельных доноров. Человеческие МКПК от доноров различных групп крови инкубировали с Obx-αGT (10 мкг/мл) и UDP-Gal (5 мМ) в течение 1 часа при 37°C. Аликвоту клеток анализировали методом FACS на связывание человеческого IgG и человеческого IgM с использованием антител, специфичных к цепи гамма или мю. Сыворотки от тех же доноров затем добавляли к другой аликовоте клеток и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Истощение В-клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием антитела против CD20.

[0295] Наибольшая степень лизиса преобразованных клеток была обнаружена у пациентов типа A и O, и это соответствовало индивидуальному уровню антител против альфа-1,3-Gal у каждого пациента (фиг. 31A-31B). Это позволяет предположить, что оценка уровня антитела против альфа-gal до начала лечения позволит предсказать, какие пациенты с большей или меньшей вероятностью отреагируют на данный подход к лечению. Это также указывает на то, что некоторым пациентам, особенно пациентам типа B или AB, может оказаться полезным примирование путем воздействия альфа-1,3-Gal-антигеном для стимуляции более высокого уровня антител против альфа-Gal. Это может наблюдаться при подкожном введении альфа-gal, содержащего полисахарид или гликопротеин, по меньшей мере за неделю до этого терапевтического подхода или, альтернативно, индуцирование альфа-gal-эпитопа в начальном цикле лечения может стимулировать выработку антител против альфа-gal, которые будут присутствовать в последующих циклах. Специалист в данной области может оценить группу пациентов на наличие у них уровней антител против альфа-gal до начала лечения и на их ответ и определить порог, ниже которого такой ответ будет менее вероятным без примирования.

Пример 18. Определение оптимальных концентраций конструкции анти-CD19 scFv-aGalT и UDP-gal для достижения лизиса клеток, содержащих CD19 и взятых у человека-донора с использованием аутологичной сыворотки

[0296] Были определены оптимальные концентрации анти-CD19 scFv-aGalT и UDP-gal для достижения лизиса клеток, содержащих CD19 и взятых у человека-донора с использованием аутологичной сыворотки. Человеческие МКПК, взятые от донора типа A

НВГА, которые, как известно, индуцируют опосредованный сывороткой лизис клеток, конвертированных в α Gal, инкубировали с Obx- α GT и UDP-Gal в различных концентрациях в течение 1 часа при 37°C. Затем к клеткам добавляли сыворотку от того же донора и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Связывание, перенос альфа-1,3-Gal и истощение В-клеток оценивали методом проточной цитометрии.

[0297] Конструкция анти-CD19 scFv- α GalT насыщала клетки, содержащие CD19, приблизительно при 10 мкг/мл (фиг. 32A-32C). Экспрессия альфа-1,3-gal была наилучшей при концентрации UDP-gal приблизительно 10 мМ. Лизис В-клеток был максимальным при использовании анти-CD19 scFv- α GalT в концентрации 10 мкг/мл и UDP-gal в диапазоне 5-20 мМ. Лизис В-клеток прогрессивно снижался при концентрациях анти-CD19 scFv- α GalT >10 мкг/мл, а особенно \geq 25 мкг/мл, выше точки насыщения CD19. Вероятно, это связано с тем, что несвязанный анти-CD19 scFv- α GalT конкурирует за связывание с UDP-gal, что тем самым уменьшает количество доступного UDP-gal для связанного с клетками анти-CD19 scFv- α GalT.

[0298] Концентрации scFv- α GalT и UDP-gal могут варьироваться в зависимости от антигена-мишени рака, его плотности на мембране опухолевых клеток, а эффективность лизиса может варьироваться в зависимости от уровня антител против альфа-1,3-Gal (IgM и/или IgG и/или IgA и/или IgE). Все эти параметры могут быть определены до начала лечения, и специалист в данной области может определить оптимальные концентрации различных компонентов для лечения каждого отдельного пациента.

Пример 19. Конструирование анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазы

[0299] Обекселимаб-scFv- α -1,3-Gal (SEQ ID NO: 63) был сконструирован путем слияния одноцепочечного вариабельного фрагмента обекселимаба (scFv) в ориентации vH-vL с N-концом α -1,3-галактозилтрансферазы игрунок (аминокислоты 90-376) посредством линкера (G₄S)₃. Метка bHis была добавлена к С-концу слитого белка, чтобы обеспечить очистку с помощью аффинной хроматографии.

[0300] Получение белка осуществляли в WuXi Biologics. Вкратце, последовательность ДНК-мишени, кодирующую обекселимаб-scFv- α -1,3-Gal (SEQ ID NO: 63), была оптимизирована по кодонам, синтезирована и субклонирована в запатентованный экспрессионный вектор WuXi Biologics. Слитый белок экспрессировали путем временной трансфекции в клетках CHO, масштабированных до 2 литров. Обекселимаб-scFv- α -1,3-Gal очищали из супернатанта клеточной культуры путем проведения трехстадийного процесса очистки на колонке. Аффинную хроматографию на никеле использовали на начальной стадии захвата, а затем проводили анионообменную хроматографию и эксклюзионную хроматографию для достижения 95% чистоты белка с уровнями эндотоксина <1 ЭЕ/мг. Очищенный белок был приготовлен в гистидиновом буфере с pH 6,0 в дозе 20 мг/мл. Чистоту белка оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН и ЭХ-ВЭЖХ, а также оценивали уровень эндотоксина.

Пример 20. Обработка примата, не являющегося человеком, *in vivo* слитым белком анти-CD19 scFv-альфа Gal-трансферазы плюс UDP-Gal

[0301] Затем было определено, может ли *in vivo* обработка примата, не являющегося человеком, слитым белком анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазы плюс UDP-Gal приводить к снижению количества CD19⁺-В-клеток или токсичности.

[0302] Двум собакоподобным обезьянам (каждая из которых имела массу тела 5 кг) были проведены базовые анализы крови для подтверждения приемлемых лабораторных показателей и измерения исходного количества В-клеток и Т-клеток. Затем собакоподобным обезьянам вводили внутривенную инъекцию анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазы (SEQ ID NO: 63) в момент времени 0 с последующей инъекцией UDP-gal.

[0303] Общий анализ крови, химический состав сыворотки, функциональные тесты печени и оценку общего количества лимфоцитов, В-клеток и Т-клеток проводили через 1 час, 4 часа и 24 часа, а также на 7, 14, 30 и 60-й дни после лечения (фиг. 33). Количество В-клеток определяли путем оценки флуоресценции CD20⁺/CD3⁻. CD20 использовали в целях предотвращения искажения количества В-клеток из-за присутствия анти-CD19 scFv.

[0304] Обработка первой испытуемой обезьяны анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазой плюс UDP-Gal приводила к 70% снижению количества CD19/CD20⁺-В-клеток через 7 дней после обработки, и такое снижение продолжалось 8 недель, прежде чем вернуться к исходному уровню. У второй обезьяны, которой совсем недавно вводили более высокую дозу анти-CD19 scFv-альфа-Gal-трансферазы, при первой оценке, проведенной через 4 часа, наблюдалось снижение содержания В-клеток на 80%. У испытуемых обезьян не наблюдалось видимых признаков токсичности, замеченных ветеринарами. Масса испытуемых обезьян оставалась неизменной. При анализе крови у них не было выявлено никаких поддающихся определению признаков токсичности. У первой обезьяны, лабораторные показатели анализа крови, за исключением количества CD19/CD20, оставались стабильными в течение 2 месяцев наблюдения. У второй обезьяны имеются данные только до 48 часов, и они все еще изучаются.

[0305] Эти результаты продемонстрировали, что примата, не являющегося человеком, можно безопасно лечить с применением раскрытых здесь способов, и что такое лечение приводит к значительному снижению количества клеток-мишеней.

Пример 21. Конструирование бифункционального терапевтического белка, нацеленного на опухоль

[0306] Слитые белки, нацеленные на опухоль, были сконструированы путем генетического слияния Н-цепи антитела, нацеленного на опухоль, с ферментом гликозилтрансферазой. В описанных здесь примерах, GTA (SEQ ID NO: 64) и GTB (SEQ ID NO: 65) были получены из известных человеческих последовательностей, в то время как α GalT был получен из последовательности игрунок (SEQ ID NO: 66). Все посттрансляционные ферменты, используемые в представленных здесь примерах, были естественным образом экспрессированы в мембранах пузырьков Гольджи и/или эндоплазматического ретикулума. Для конструирования бифункциональных слитых белков, описанных в настоящей заявке, части ферментов, которые не являются

необходимыми для ферментативной функции (например, во вневезикулярной, трансмембранной области и области стебля), не использовали.

[0307] Как описано *выше*, нацеленная на опухоль часть слитого белка может представлять собой полноразмерное Ab, Fab'2, Fab, scFv, мономерное Ab или любые их производные Ab/иммуноглобулина. Ферментативная часть слитых белков может представлять собой любой посттрансляционный модифицирующий фермент; а его последовательность обычно является человеческой, гуманизованной, приматизированной (происходящей от приматов, не являющихся человеком) или деиммунизированной каким-либо иным образом. Присоединение нацеливающей части к ферменту может быть осуществлено посредством линкера/спейсера или без него. В приведенных здесь примерах используется линкер/спейсер (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67), но может быть использован любой линкер/спейсер, известный специалистам в данной области.

[0308] Получение этих слитых белков является модульным, а поэтому любая часть, нацеленная на опухоль/ткань, может быть слита с любым посттрансляционным ферментом в соответствии с несколькими представленным здесь примерами. Последовательности, используемые при конструировании и получении бифункциональных терапевтических средств huJ591 и 4D5, приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Последовательности

Посл-ть белка	Последовательность	SEQ ID NO:
Тяжелая цепь huJ591	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAY MELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTLTSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	68
N-конец человека (а.к. 57- 354)	EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPWLAPIV WEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETA EKHFVMVGH RVHYYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVG AYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDM	69

	EFRDHVGV EIL TPLFGTLHPSFYGSSREAFYERRPQSQAYI PKDEGDFY YMGAFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQAN GIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVLSPEYLWDQQLLGP AVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP	
6-his-метка	HHHHHH	70
huJ591-LC	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQK PGPSPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	71
Тяжелая цепь huJ591 (VH-CH1- неполная шарнирная посл- ть)	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAY MELSSLRSEDTA VYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT	72
Мус-his- метка	AAAEQKLISEEDLNGAVEHHHHHH	73
Тяжелая цепь huJ591	EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAY MELSSLRSEDTA VYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTVPPVPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSRDELTKN QVLSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTVPVLDSD GSFRLASYLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (аминокислоты варианта HC67 (n=8) выделены жирным шрифтом)	74
Хвост из 54 аминокислот	EFEQKLISEEDLNSADIHHTGARSSAHLELTADYKDHDGD YKDHDIDYKDDDDK	75

huJ591scFv/Fc	<p>DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQK PGPSPKLLIYWASTRHTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIKEVQLVQSGPEVKKPG ATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNN GGTTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDТАVY YCAAGWNFDYWGGQTLLTVSSEPKSCDKTHTVPPVPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTKP PSRDELTKNQVSLVCKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTVPVLDSDGSFRLASVLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>(аминокислоты варианта HC67 (n=8) выделены жирным шрифтом)</p>	76
huJ591scFv	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQA SGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCAAGWNFDYWGGQTTVTVSSGSTS GGGSGGGSGGGSSDIVMTQSPSSLASVGDRTITCKAS QDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGKLEI K</p>	77
N-конец ГТА человека (а.к. 57- 354)	<p>EPDHLQRVSLPRMVYPQPKVLTPCRKDVLVVTPLAPIV WEGTFNIDILNEQFRLQNTTIGLTVFAIKKYVAFLKLFLETA EKHFMVGHVRVHYVFTDQPAAVPRVTLGTGRQLSVLEVR AYKRWQDVSMRRMEMISDFCERRFLSEVDYLCVDVDM EFRDHVGV EIL TPLFGTLHPGFYGS SREAFYERRPQSQAYI PKDEGDFY YLGGFFGGSVQEVQRLTRACHQAMMVDQAN GIEAVWHDESHLNKYLLRHKPTKVL SPEYLWDQQLL GWP AVLRKLRFTA VPKNHQAVRNP</p>	78
Тяжелая цепь трастузумаба (4D5)	<p>EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDТАVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG</p>	79

	GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
Легкая цепь трастузумаба (4D5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPK GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	80
scFv трастузумаба (4D5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK VEIK	81

huJ591-GTB

[0309] huJ591-GTB (H-цепь) (SEQ ID NO: 34) сконструировали путем лигирования тяжелой цепи huJ591 (SEQ ID NO: 68) с N-концом человеческого GTB (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO: 69). huJ591-LC (L-цепь) (SEQ ID NO:36) конструировали путем добавления 6His-метки (SEQ ID NO:70) к C-концу huJ591-LC (SEQ ID NO:70) для облегчения аффинной хроматографической очистки.

[0310] Последовательность ДНК, кодирующую H- и L-цепи, субклонировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1. Продуцирование белка осуществляли с применением метода временной экспрессии путем котрансфекции H- и L-цепей в клетки CHO. Слитый белок huJ591-GTB очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на никеле и оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

huJ591Fab-GTB

[0311] huJ591Fab-GTB (H-цепь) (SEQ ID NO: 37) конструировали путем лигирования усеченного фрагмента тяжелой цепи huJ591 (последовательности VH-CH1-неполной шарнирной последовательности) (SEQ ID NO:72) с N-концом GTB человека (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO: 69). Метка Myc/his (SEQ ID NO: 73) была добавлена к C-концу для облегчения мониторинга экспрессии и очистки с помощью аффинной хроматографии.

huJ591-LC (L-цепь) (SEQ ID NO: 39) кодирует последовательность легкой цепи huJ591 (SEQ ID NO: 71).

[0312] Последовательность ДНК, кодирующую Н- и L-цепи, субклонировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1. Продукцию белка осуществляли с применением метода временной экспрессии путем котрансфекции Н-цепи и L-цепи в клетки CHO. Слитый белок Fab-GTB очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на никеле и оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

huJ591-HC67-GTB

[0313] huJ591-HC67-GTB (Н-цепь) (SEQ ID NO: 40) конструировали путем лигирования тяжелой цепи huJ591 (SEQ ID NO: 74) с N-концом человеческого GTB (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO: 69) посредством линкера (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67). Измененные аминокислоты подчеркнуты двойной чертой и выделены жирным шрифтом в Таблице 4 и выделены жирным шрифтом в Таблице 7. J591-LC (L-цепь) (SEQ ID NO: 42) конструировали путем добавления 6His-метки (SEQ ID NO: 70) к C-концу J591-LC (SEQ ID NO: 71) для облегчения очистки с помощью аффинной хроматографии.

[0314] Получение мономерного Fc-слитого белка осуществляли следующим образом. Последовательность ДНК, кодирующую J591HC67-GTB и L-цепь, синтезировали, субклонировали в экспрессионный вектор и совместно трансфицировали в клетки CHO. Затем собирали супернатант клеточной культуры. Слитый белок J591HC67-GTB очищали с помощью аффинной хроматографии на никеле и оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

huJ591-HC67-GTB54aa

[0315] huJ591-HC67-GTB54aa (Н-цепь) (SEQ ID NO: 43) был модифицирован по сравнению с huJ591-HC67-GTB (Н-цепью) (SEQ ID NO: 74) путем добавления хвоста из 54 аминокислот (SEQ ID NO: 75) на C-конце GTB. huJ591-LC (L-цепь) (SEQ ID NO: 45) конструировали путем добавления 6His-метки (SEQ ID NO: 70) к C-концу для облегчения аффинной хроматографической очистки.

[0316] Продукцию белка осуществляли с применением метода временной экспрессии путем котрансфекции Н-цепи и L-цепи в клетки CHO. Слитый белок huJ591-GTB очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на никеле и оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

huJ591scFv-Fc67-GTB

[0317] huJ591scFv-Fc67-GTB (SEQ ID NO: 46) кодирует (от N- до C-конца) одноцепочечный варибельный фрагмент huJ591 (scFv)/фрагмент J591 Fc (SEQ ID NO: 76), человеческий GTB (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO: 69). Линкер (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67) был встроен между Fc (SEQ ID NO: 76) и GTB (SEQ ID NO: 69).

[0318] Последовательность ДНК, кодирующую huJ591scFv-Fc67-GTB (SEQ ID NO: 46), синтезировали, субклонировали в экспрессионный вектор и трансфицировали в клетки CHO. Затем собирали супернатант клеточной культуры. Слитый белок huJ591scFv-Fc67-GTB (SEQ ID NO: 46) очищали с помощью аффинной хроматографии на никеле и

оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

huJ591scFv-GTB

[0319] huJ591scFv-GTB (SEQ ID NO: 48) кодирует (от N- до C- конца) деиммунизированный вариант одноцепочечного варибельного фрагмента huJ591 (SEQ ID NO: 77), человеческого GTB (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO: 69). Линкер (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67) был встроен между scFv (SEQ ID NO: 77) и GTB (SEQ ID NO: 69). К C-концу добавляли метку Мус/His (SEQ ID NO: 73) для облегчения мониторинга экспрессии и очистки с помощью аффинной хроматографии.

[0320] Последовательность ДНК, кодирующую huJ591scFv-GTB (SEQ ID NO:48), субклонировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1. Продуцирование белка осуществляли с применением метода временной экспрессии путем трансфекции плазмиды в клетки CHO. Слитый белок huJ591scFv-GTB очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на никеле и оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

Конструкции GTA

[0321] Человеческую последовательность GTA (аминокислоты 57-354) (SEQ ID NO:78) также использовали вместо последовательности GTB (SEQ ID NO: 69) в ДНК-конструкциях, описанных выше, для получения следующих рекомбинантных белков: huJ591-GTA (SEQ ID NO:35), huJ591Fab-GTA (SEQ ID NO:38), huJ591-HC67-GTA (SEQ ID NO:41), huJ591scFv-Fc67-GTA (SEQ ID NO: 47), и huJ591scFv-GTA (SEQ ID NO: 49).

Конструкции на основе трастузумаба (4D5)

[0322] Для нацеливания на HER2 при раке молочной железы и раке других видов, последовательность трастузумаба (4D5) использовали вместо последовательности huJ591 в ДНК-конструкциях, описанных в настоящей заявке, для получения следующих рекомбинантных белков: 4D5-GTA (SEQ ID NO: 51), 4D5Fab-GTA (SEQ ID NO: 54), 4D5HC67-GTA (SEQ ID NO: 57), 4D5scFv-Fc67-GTA (SEQ ID NO: 60), 4D5scFv-GTA (SEQ ID NO: 62), 4D5-GTB (SEQ ID NO: 50), 4D5Fab-GTB (SEQ ID NO: 53), 4D5HC67-GTB (SEQ ID NO: 56), 4D5scFv-Fc67-GTB (SEQ ID NO: 59) и 4D5scFv-GTB (SEQ ID NO: 61).

[0323] Хотя предпочтительные варианты осуществления изобретения были изложены и подробно описаны в настоящей заявке, однако, для специалиста в данной области будет очевидно, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации, добавления, замены и т.п., не выходящие за рамки сущности изобретения, а поэтому все они входят в объем настоящего изобретения, определенный ниже в формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бифункциональное терапевтическое средство для лечения рака, содержащее:
нацеливающий компонент, который нацелен на антиген, ассоциированный с опухолью, и
фермент, который при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанный фермент связан с указанным нацеливающим компонентом.
2. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, состоящей из FOLH1/PSMA, VEGFR, CD19, CD20, CD25, CD30, CD33, CD38, CD52, антигена созревания В-клеток (BCMA), CD79, рецептора соматостатина, 5T4, gp100, CEA, мелана A/MART-1, MAGE, NY-ESO-1, PSA, тирозиназы, HER-2, HER-3, EGFR, hTERT, MUC1, мезотелина, нектина-4, TROP-2, тканевого фактора и CA-125.
3. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где нацеливающий компонент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, белка, пептида, аптамера и низкомолекулярного лиганда.
4. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 3, где нацеливающим компонентом является пептид, связанный с ферментом посредством пептидной связи.
5. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 4, где нацеливающим компонентом является антитело или антигенсвязывающее производное или его фрагмент.
6. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где нацеливающий компонент и фермент генетически сконструированы для получения слитого белка.
7. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где нацеливающий компонент и фермент являются химически связанными.
8. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 3, где нацеливающим компонентом является низкомолекулярный лиганд, химически связанный с ферментом посредством промежуточного спейсера из полиэтиленгликоля (ПЭГ).
9. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 8, где нацеливающим компонентом является ACUPA [2-(3-((S)-5-амино-1-карбокспентил)уреидо)пентандиовая кислота], химически связанная с ферментом посредством промежуточного ПЭГ-спейсера.
10. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где фермент представляет собой фермент, участвующий в посттрансляционной модификации, и выбран из группы, состоящей из трансферазы и гликозилтрансферазы.
11. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 10, где ферментом, участвующим в посттрансляционной модификации, является трансфераза.
12. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 11, где трансфераза представляет собой гликозилтрансферазу.
13. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 12, где гликозилтрансфераза выбрана из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-

ацетилгалактозаминилтрансферазы), гликозилтрансферазы В (альфа- 1-3-галактозилтрансферазы), альфа-gal-трансферазы, гликозилтрансферазы А (Gly268Ala) и фукозилтрансферазы.

14. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где фермент содержит присоединенную вторую аминокислотную последовательность на своем С-конце.

15. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 14, где вторая аминокислотная последовательность включает расщепляемую аминокислотную последовательность между ферментом и присоединенной второй последовательностью.

16. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 15, где расщепляемая аминокислотная последовательность расщепляется под действием PSA, металлопротеиназ матрикса или катепсина В.

17. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где опухоль, имеющая ассоциированный с опухолью антиген, экспрессирует Н-антиген.

18. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 1, где опухоль, имеющая ассоциированный с опухолью антиген, относится к раку, выбранному из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака прямой и ободочной кишки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака крови, рака шейки матки, рака эндометрия, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака почек, рака головного мозга, рака печени, рака пищевода, рака надпочечников, рака головы и шеи, меланомы и рака поджелудочной железы.

19. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 18, где раком является рак предстательной железы.

20. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 19, где нацеливающий компонент нацелен на рецептор специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA)/фолатгидролазы 1 (FOLH1).

21. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 19, где нацеливающим компонентом является антитело против рецептора PSMA или производное антитела против рецептора PSMA.

22. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 19, где нацеливающим компонентом является антитело, выбранное из группы, состоящей из J591, J415, J533 и E99.

23. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 17, где раком является рак молочной железы.

24. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 23, где нацеливающий компонент нацелен на член семейства рецепторов HER.

25. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 24, где нацеливающим компонентом является моноклональное антитело 4D5.

26. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 17, где рак представляет собой рак крови В-клеточного происхождения.

27. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 26, где нацеливающий компонент нацелен на CD19.

28. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 27, где нацеливающим компонентом является моноклональное антитело обекселимаб или денинтузумаб.

29. Способ лечения рака, где указанный способ включает:
выбор индивидуума, страдающего раком;
получение бифункционального терапевтического средства по любому из пп. 1-28; и
введение выбранному индивидууму бифункционального терапевтического средства в условиях, эффективных для лечения рака.

30. Способ по п. 29, где индивидуумом является человек.

31. Способ по п. 29, где антиген, ассоциированный с опухолью, выбран из группы, состоящей из FOLH1/PSMA, VEGFR, CD19, CD20, CD25, CD30, CD33, CD38, CD52, антигена созревания В-клеток (BCMA), CD79, рецептора соматостатина, 5T4, gp100, CEA, мелана А/MART-1, MAGE, NY-ESO-1, PSA, тирозиназы, HER-2, HER-3, EGFR, hTERT, MUC1, мезотелина, нектин-4, TROP-2, тканевого фактора и CA-125.

32. Способ по п. 29, где нацеливающий компонент выбран из группы, состоящей из антитела или его связывающего фрагмента, белка, пептида и небольшой молекулы.

33. Способ по п. 32, где нацеливающим компонентом является пептид, связанный с ферментом посредством пептидной связи.

34. Способ по п. 32, где нацеливающим компонентом является антитело или его антигенсвязывающее производное или его фрагмент.

35. Способ по п. 29, где нацеливающий компонент и фермент генетически сконструированы для получения слитого белка.

36. Способ по п. 29, где нацеливающий компонент и фермент являются химически связанными.

37. Способ по п. 29, где нацеливающим компонентом является небольшая молекула/лиганд, химически связанные с ферментом посредством промежуточного спейсера из полиэтиленгликоля (ПЭГ).

38. Способ по п. 37, где нацеливающим компонентом является ACUPA [2-(3-((S)-5-амино-1-карбокспентил)уреидо)пентандиоевая кислота], химически связанная с ферментом посредством промежуточного ПЭГ-спейсера.

39. Способ по п. 29, где фермент представляет собой фермент, участвующий в посттрансляционной модификации и выбранный из группы, состоящей из фермента гликозилирования, трансферазы и гликозилтрансферазы.

40. Способ по п. 39, где ферментом, участвующим в посттрансляционной модификации, является трансфераза.

41. Способ по п. 40, где трансфераза представляет собой гликозилтрансферазу.

42. Способ по п. 41, где гликозилтрансфераза выбрана из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А, гликозилтрансферазы В, альфа-gal-трансферазы, гликозилтрансферазы А (Gly268Ala) и фукозилтрансферазы.

43. Способ по п. 29, где фермент содержит присоединенную вторую аминокислотную последовательность на своем С-конце.

44. Способ по п. 43, где вторая аминокислотная последовательность содержит расщепляемую аминокислотную последовательность между ферментом и присоединенной второй последовательностью.

45. Способ по п. 44, где расщепляемая аминокислотная последовательность расщепляется под действием PSA, металлопротеиназ матрикса или катепсина В.

46. Способ по п. 29, где рак экспрессирует Н-антиген.

47. Способ по п. 29, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака прямой и ободочной кишки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака крови, рака шейки матки, рака эндометрия, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака почек, рака головного мозга, рака печени, рака пищевода, рака надпочечников, рака головы и шеи, меланомы и рака поджелудочной железы.

48. Способ по п. 47, где раком является рак предстательной железы.

49. Способ по п. 48, где нацеливающий компонент нацелен на рецептор специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA)/фолатгидролазы 1 (FOLH1).

50. Способ по п. 49, где нацеливающим компонентом является антитело против рецептора PSMA или производное антитела против рецептора PSMA.

51. Способ по п. 50, где нацеливающим компонентом является антитело, выбранное из группы, состоящей из J591, J415, J533 и E99.

52. Способ по п. 47, где раком является рак молочной железы.

53. Способ по п. 52, где нацеливающий компонент нацелен на член семейства рецепторов HER.

54. Способ по п. 53, где нацеливающим компонентом является моноклональное антитело 4D5.

55. Способ по п. 47, где рак представляет собой рак крови В-клеточного происхождения.

56. Способ по п. 55, где нацеливающий компонент нацелен на CD19.

57. Способ по п. 56, где нацеливающим компонентом является моноклональное антитело обекселимаб или денинтузумаб.

58. Способ по п. 29, где указанное введение дополнительно включает: введение уридиндифосфат-галактозы (UDP-gal), уридиндифосфат-N-ацетилгалактозамина (UDP-NAcGal) и/или гуанозиндифосфат-фукозы (GDP-фукозы).

59. Способ по п. 49, где нацеливающий компонент нацелен на рецептор PSMA на эндотелии опухолевых сосудов.

60. Фармацевтическая композиция, содержащая:

бифункциональное терапевтическое средство по любому из пп. 1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

61. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая бифункциональное терапевтическое средство по любому из пп. 1-28.

62. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты

по п. 61.

63. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 61.

64. Рекомбинантная клетка-хозяин, трансформированная молекулой нуклеиновой кислоты по п. 61.

65. Бифункциональное терапевтическое средство для лечения рака, включающее: нацеливающий компонент, который нацелен на рецептор специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA)/фолатгидролазы 1 (FOLH1), и гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

66. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:10;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 13; и

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:16.

67. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 28.

68. Бифункциональное терапевтическое средство по пп. 66 или 67, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит переменную область легкой цепи, где указанная переменная область легкой цепи содержит:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, где указанная модифицированная

последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 22;

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 25.

69. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29.

70. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 10, CDR-H2 SEQ ID NO: NO:13 и CDR-H3 SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 19, CDR-L2 SEQ ID NO: 22 и CDR-L3 SEQ ID NO: 25.

71. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:29.

72. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 34.

73. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где гликозилтрансфераза выбрана из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы) и гликозилтрансферазы В (альфа- 1-3-галактозилтрансферазы).

74. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 65, где бифункциональное терапевтическое средство содержит:

(i) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36;

(ii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37

или SEQ ID NO: 38, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39;

(iii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42;

(iv) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;

(v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46;

(vi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

(vii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(viii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

75. Бифункциональное терапевтическое средство для лечения рака, включающее: нацеливающий компонент, который нацелен на член семейства рецептора человеческого эпидермального фактора роста (HER) и

гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

76. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи включает:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:11;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:14; и

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 17.

77. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID

NO:30.

78. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 76 или п. 77, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область легкой цепи содержит:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 20;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 23;

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 26.

79. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 31.

80. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 11, CDR-H2 SEQ ID NO: 14 и CDR-H3 SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 20, CDR-L2 SEQ ID NO: 23 и CDR-L3 SEQ ID NO: 26.

81. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:31.

82. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 50.

83. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где гликозилтрансфераза выбрана из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа=1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы) и гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-

галактозилтрансферазы).

84. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 75, где бифункциональное терапевтическое средство содержит:

(i) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

(ii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(iii) первый белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(vi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; или

(vii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

85. Бифункциональное терапевтическое средство для лечения рака, включающее: нацеливающий компонент, который нацелен на CD19, и гликозилтрансферазу, которая, при доставке в опухоль указанным нацеливающим компонентом, ферментативно преобразует фенотип опухоли в фенотип несовместимого аллотрансплантата или ксенотрансплантата, где указанная гликозилтрансфераза связана с указанным нацеливающим компонентом.

86. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи включает:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 12;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 15; и

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18.

87. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO:32.

88. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 86 или п. 87, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит переменную область легкой цепи, где указанная переменная область легкой цепи содержит:

комплементарность-определяющую область 1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 21;

комплементарность-определяющую область 2 (CDR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 24; и

комплементарность-определяющую область 3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, или модифицированную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, где указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 27.

89. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 32.

90. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую CDR-H1 SEQ ID NO: 12, CDR-H2 SEQ ID NO: 15 и CDR-H3 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, включающую CDR-L1 SEQ ID NO: 21, CDR-L2 SEQ ID NO: 24 и CDR-L3 SEQ ID NO: 27.

91. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 33.

92. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где указанный нацеливающий компонент дополнительно содержит сигнальный пептид, где, но необязательно, сигнальный пептид имеет последовательность аминокислот 1-19 SEQ ID NO:63.

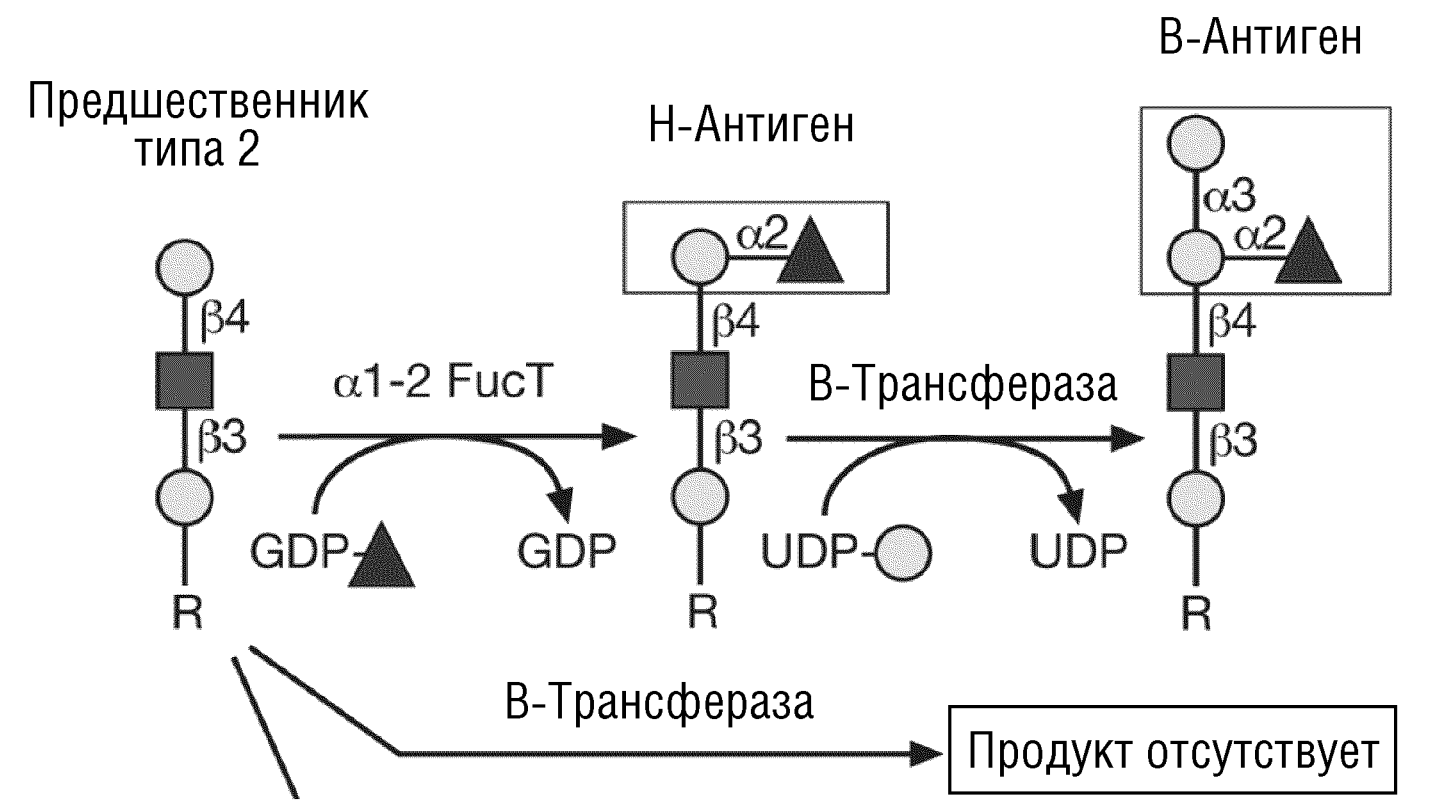
93. Бифункциональное средство по п. 85, где гликозилтрансфераза выбрана из группы, состоящей из гликозилтрансферазы А (альфа-1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы), гликозилтрансферазы В (альфа-1-3-галактозилтрансферазы) и α -1,3-галактозилтрансферазы и грунок.

94. Бифункциональное терапевтическое средство по п. 85, где бифункциональное терапевтическое средство содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

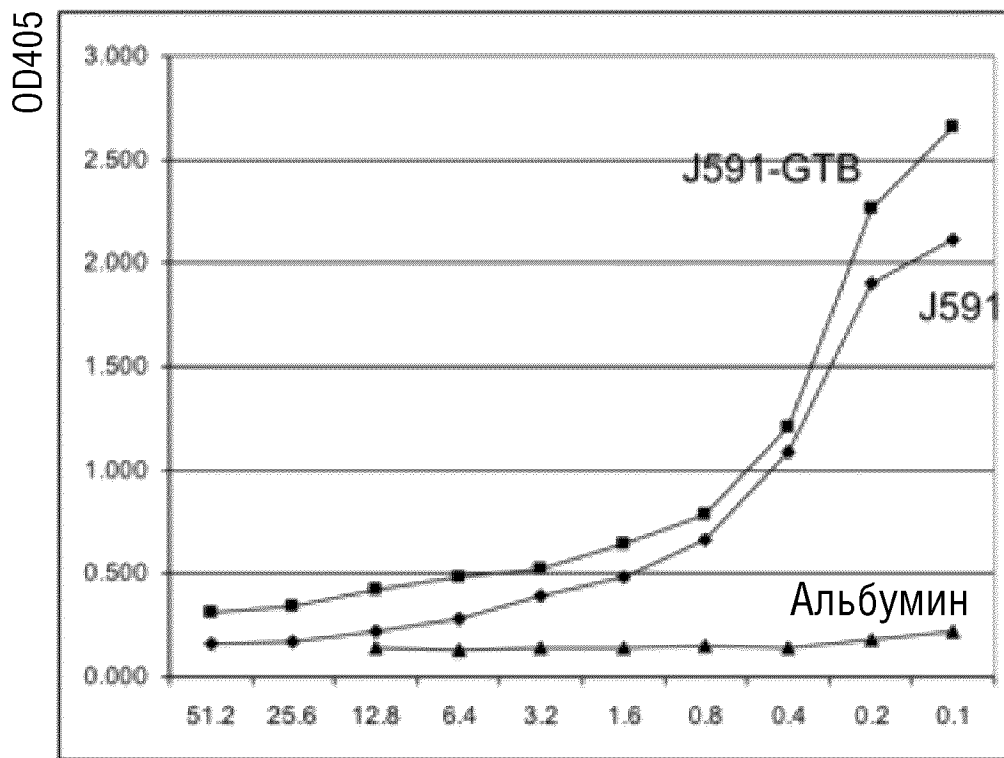
По доверенности

ФИГ.1

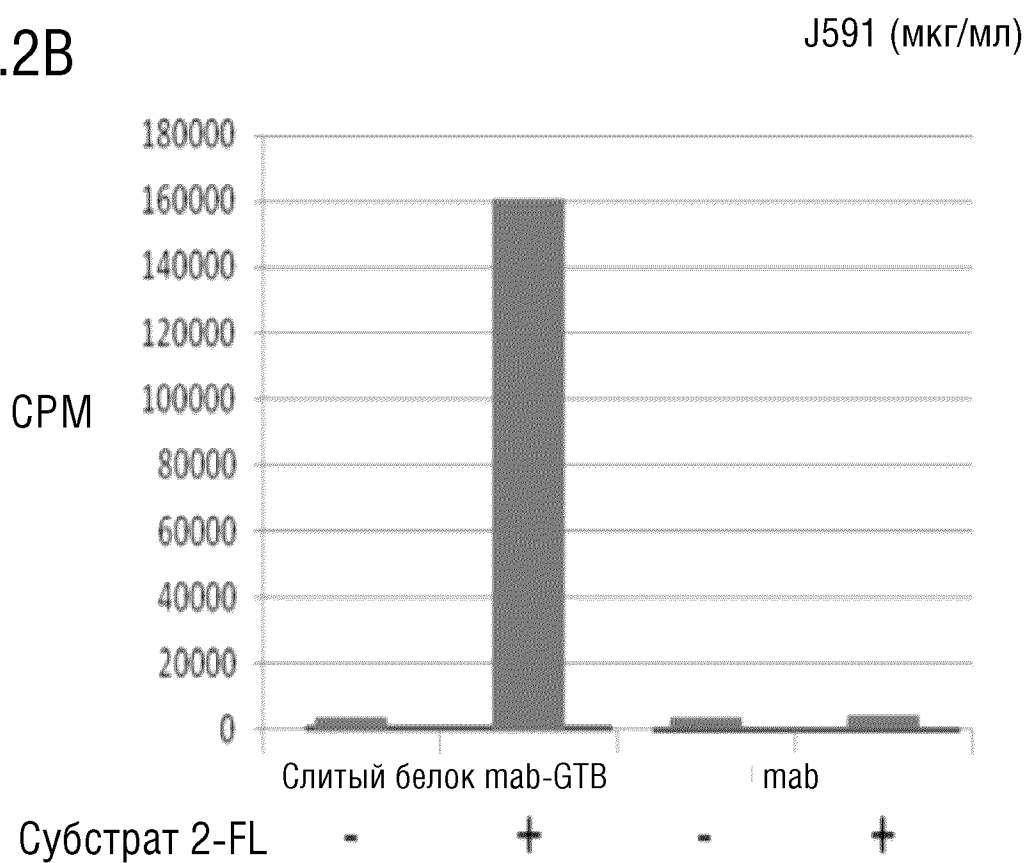
Строгая специфичность гликозилтрансфераз к акцепторному субстрату



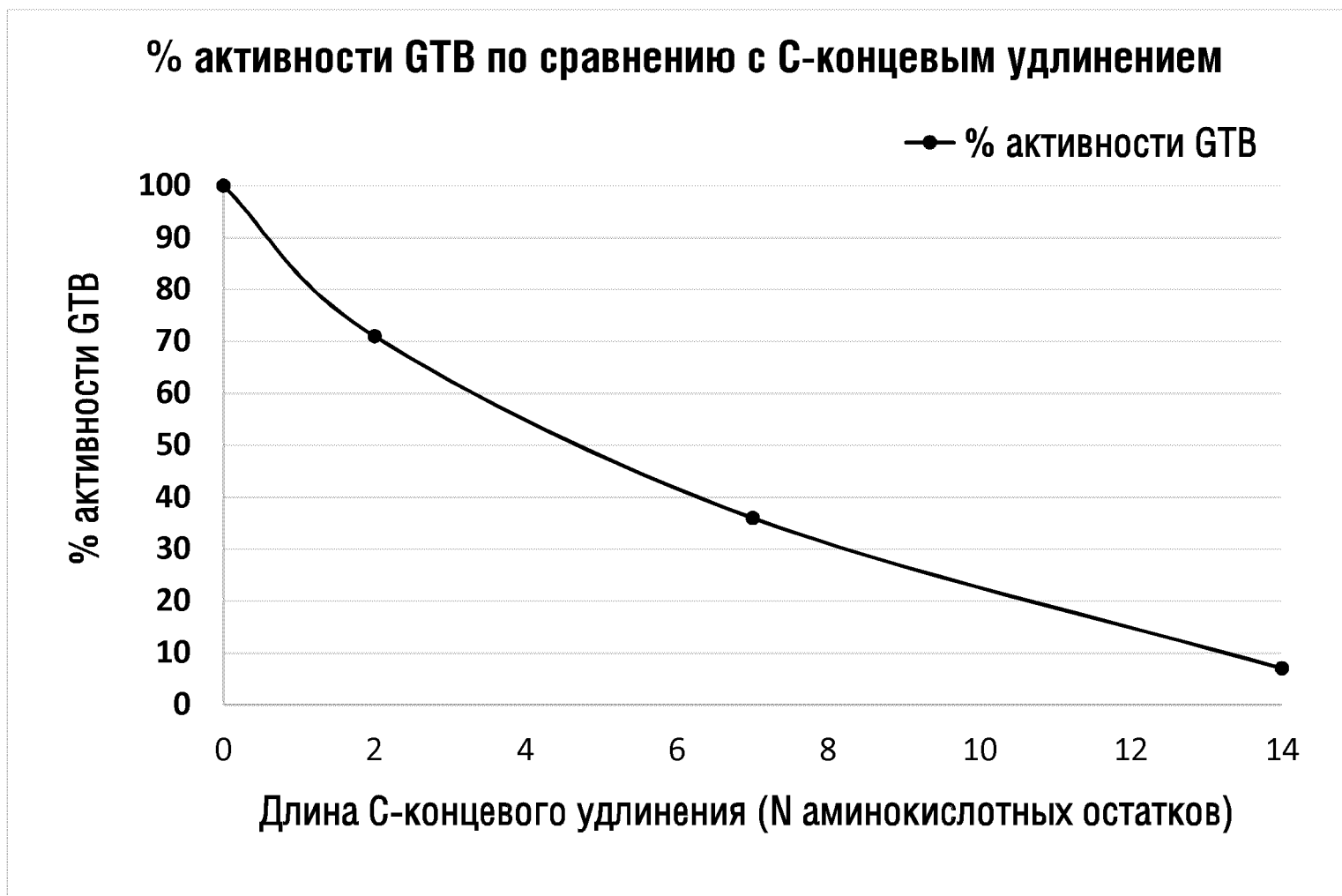
ФИГ.2А



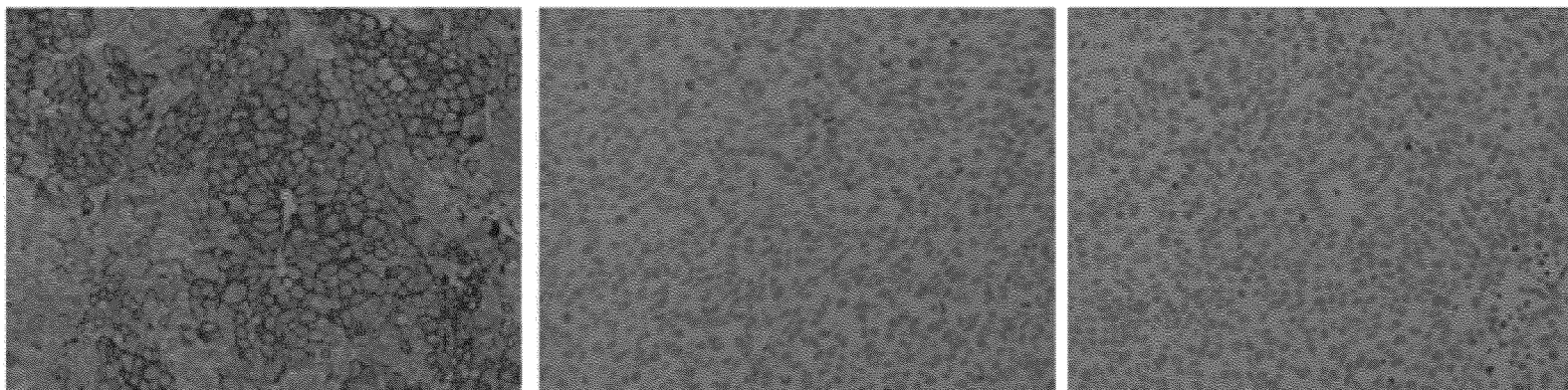
ФИГ.2В



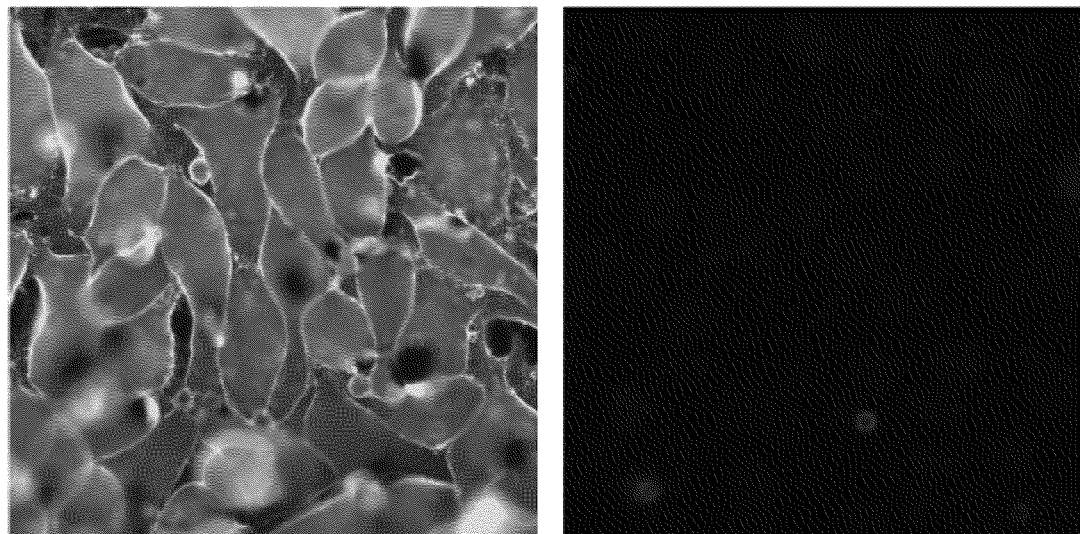
ФИГ.3



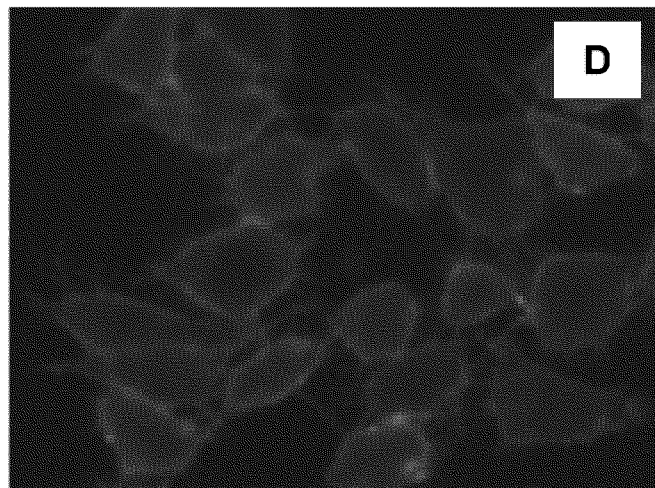
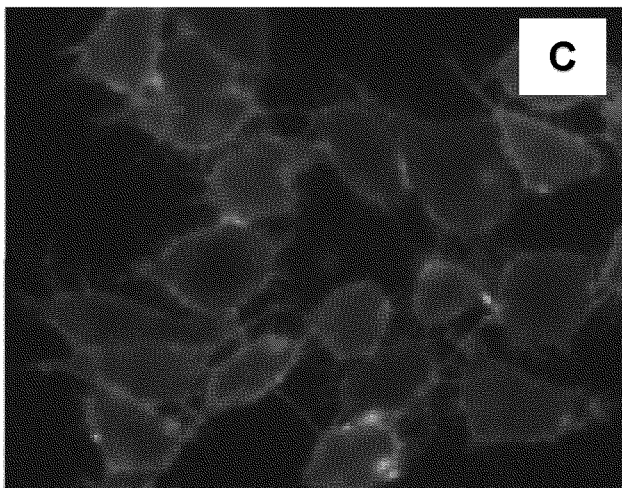
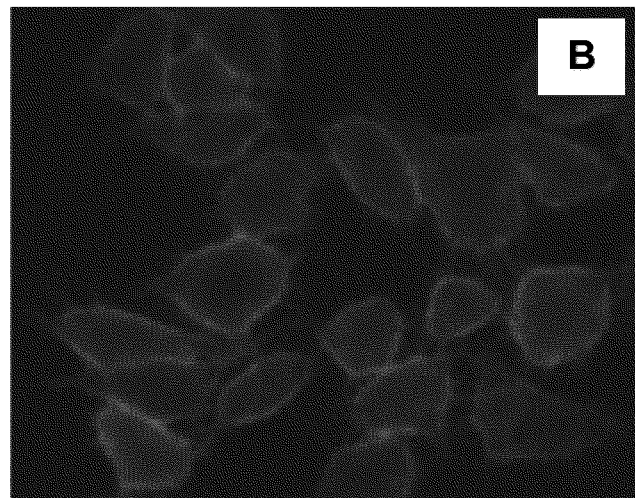
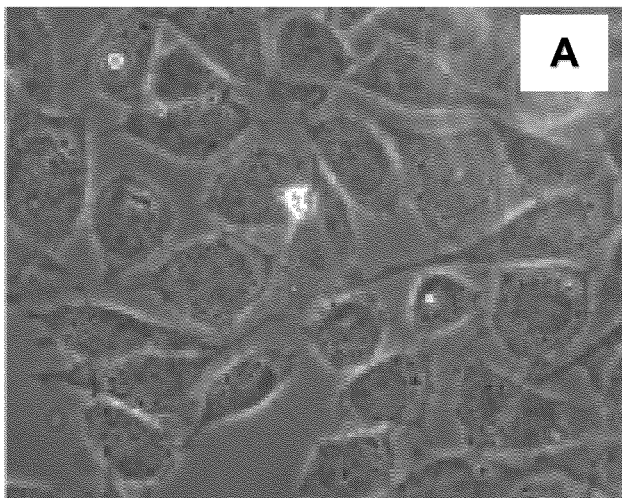
ФИГ.4



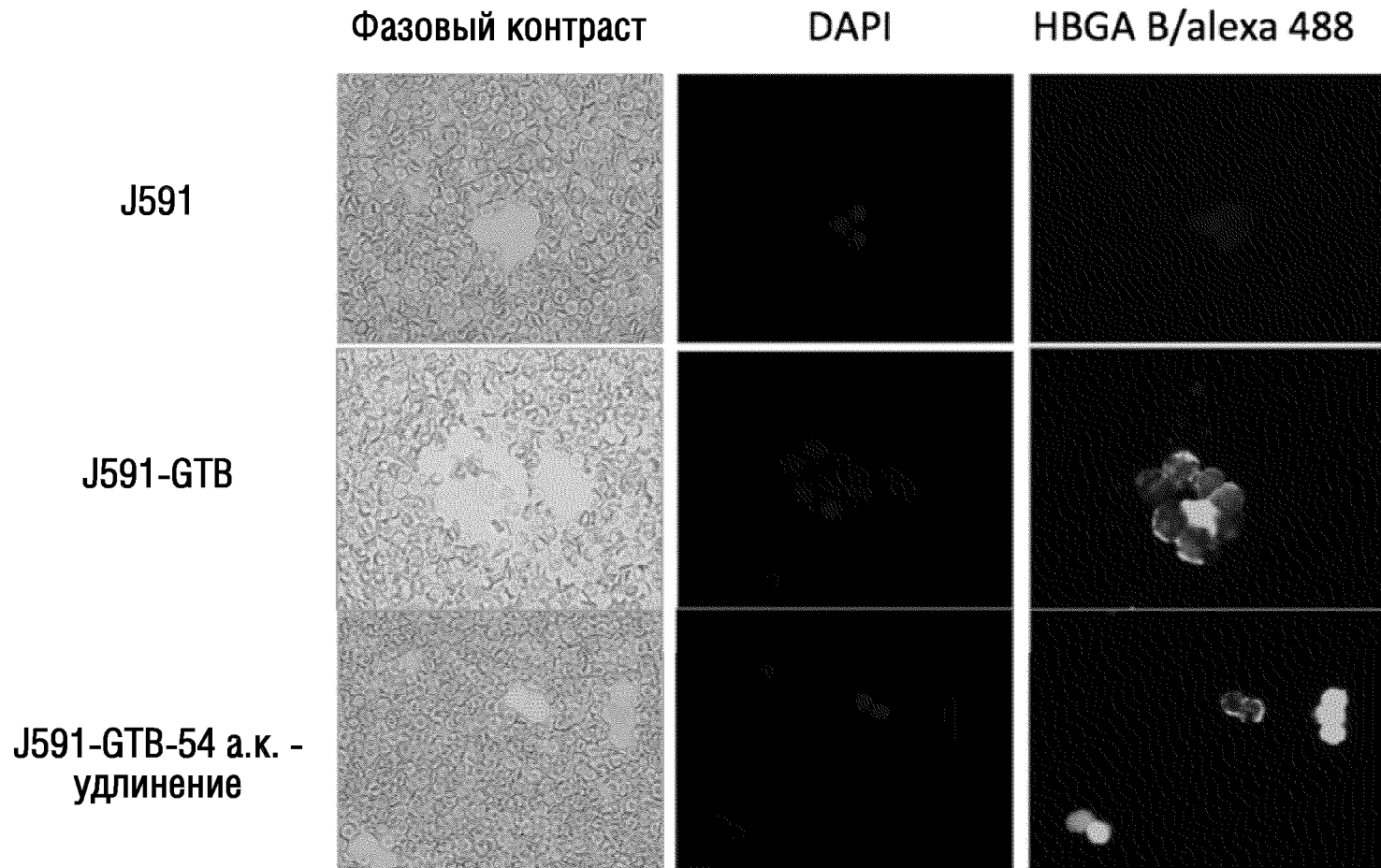
ФИГ.5



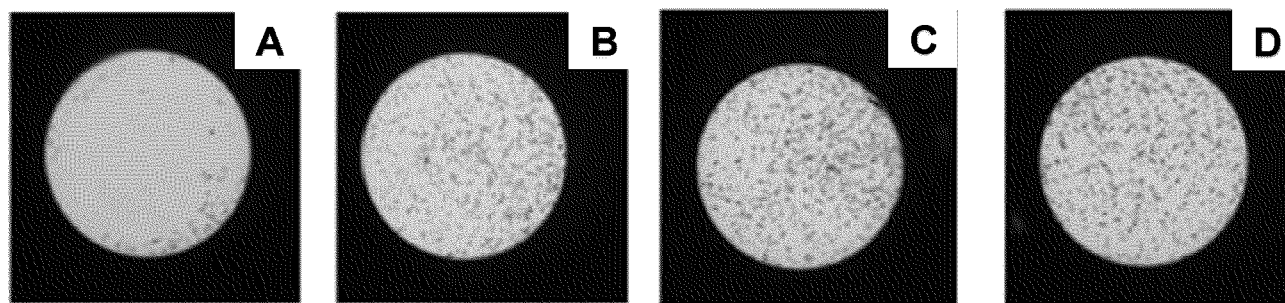
ФИГ.6А-6D



ФИГ.7



ФИГ.8А-8D



Слитый белок: mAb-GTB

mAb-GTB

mAb

—

Сыворотка типа А:
(источник
комплемента)

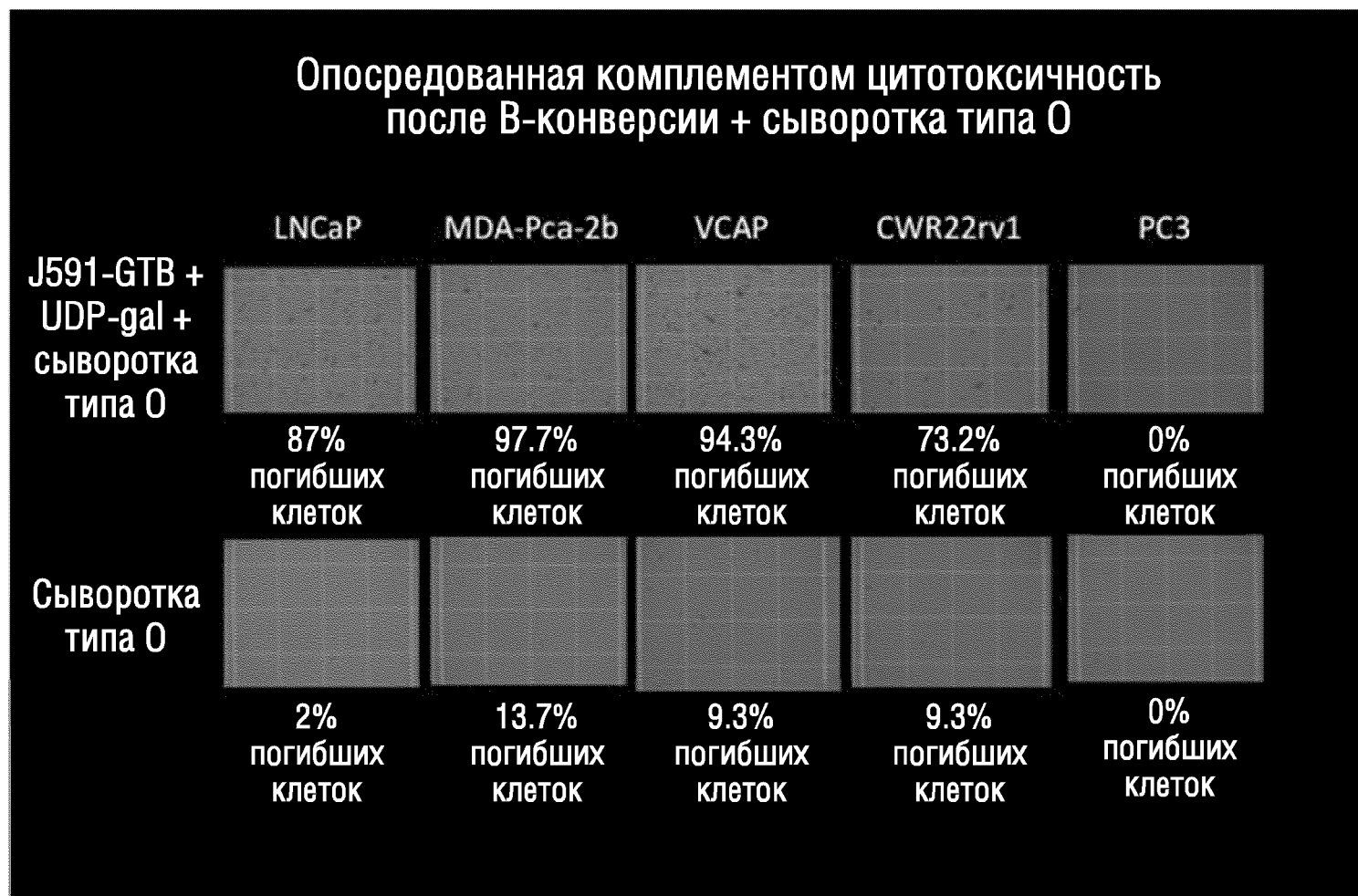
+

—

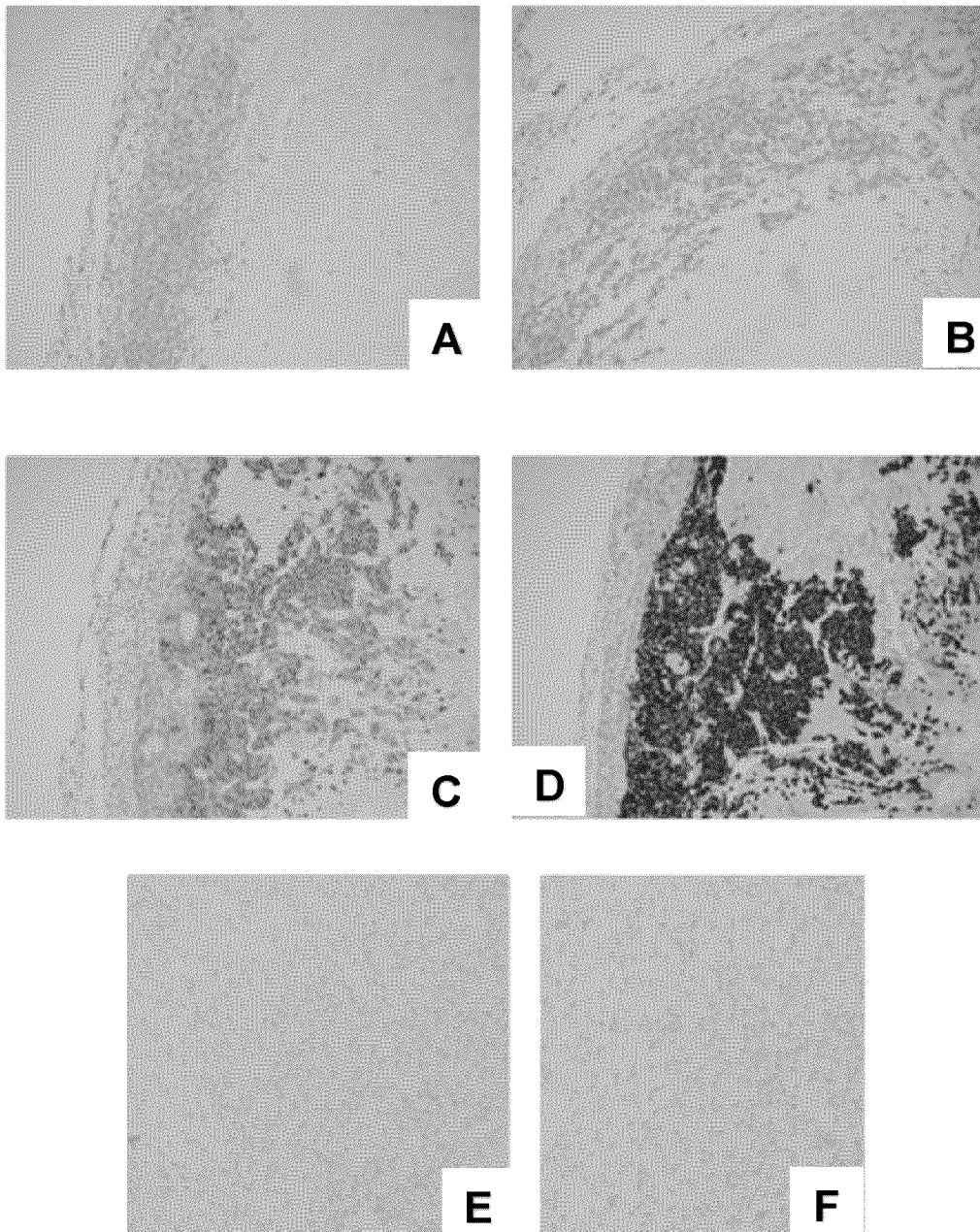
+

—

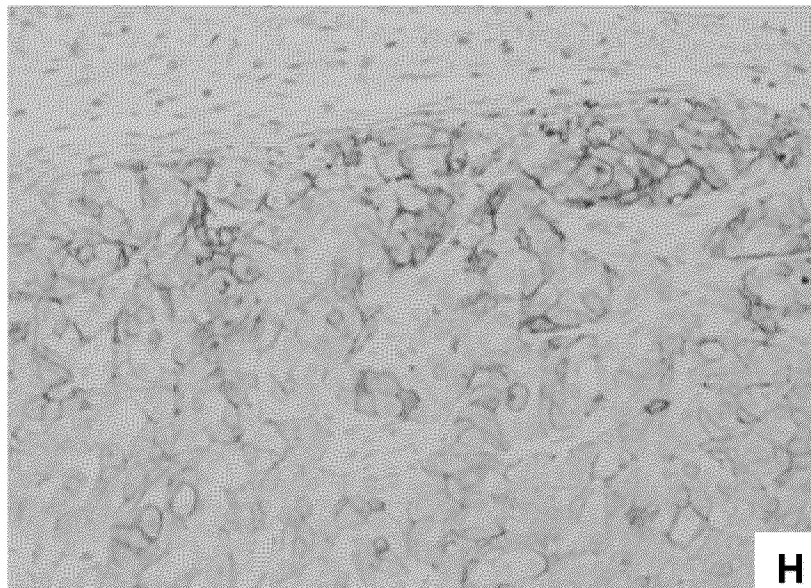
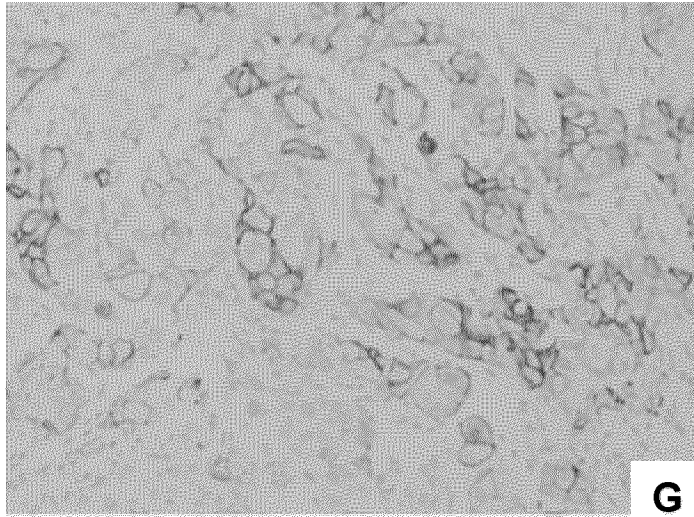
ФИГ.9



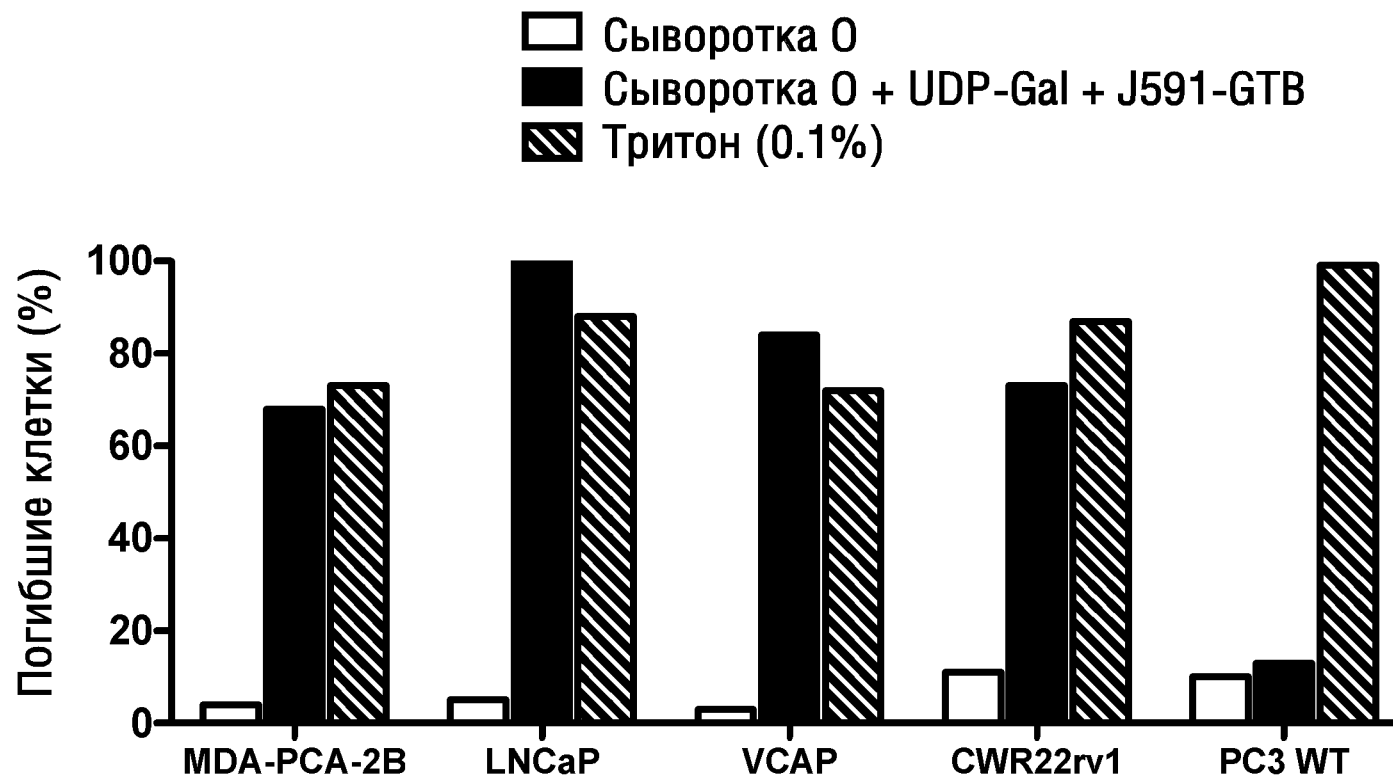
ФИГ.10А-10F



ФИГ.10G-10H



ФИГ.11А

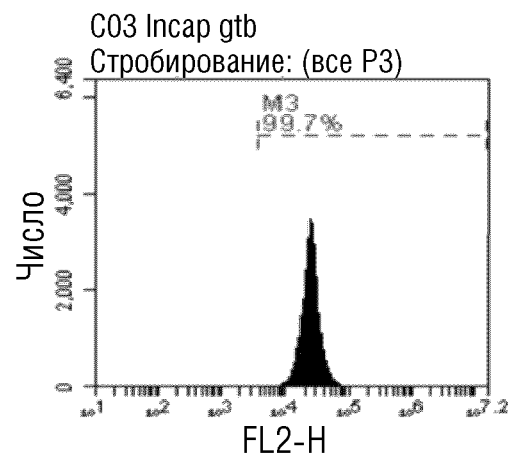
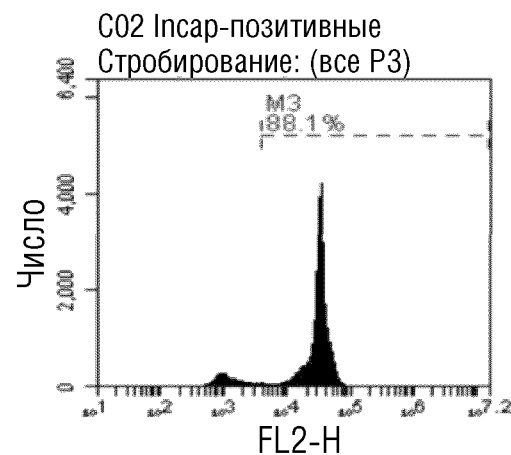
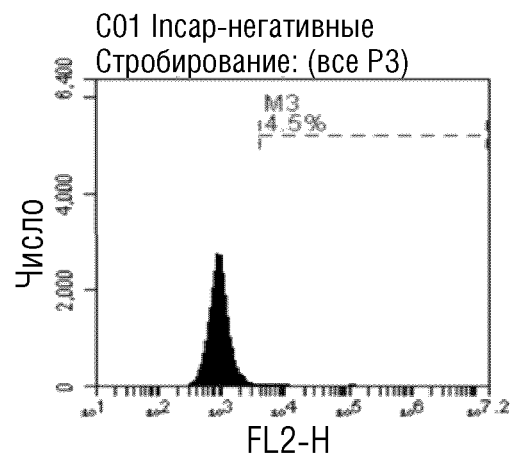


ФИГ.11В

Только сыворотка O

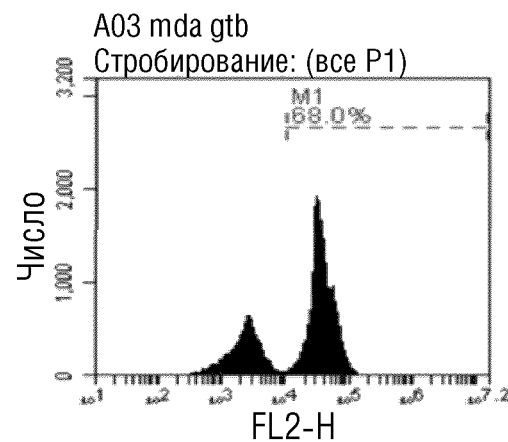
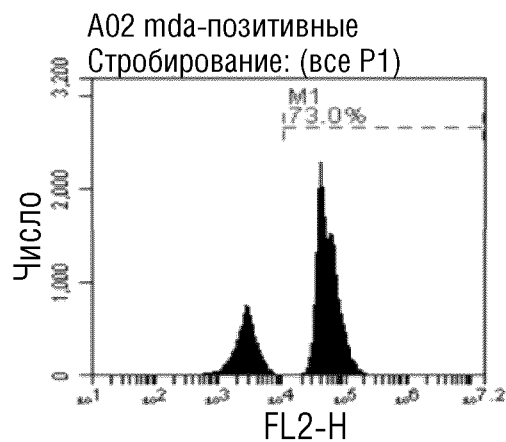
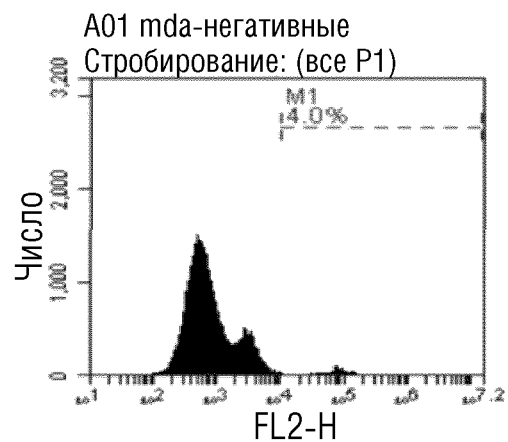
Тритон, 0.1%

J591-GTB + UDP-gal + сыворотка O



LNCaP

12/42



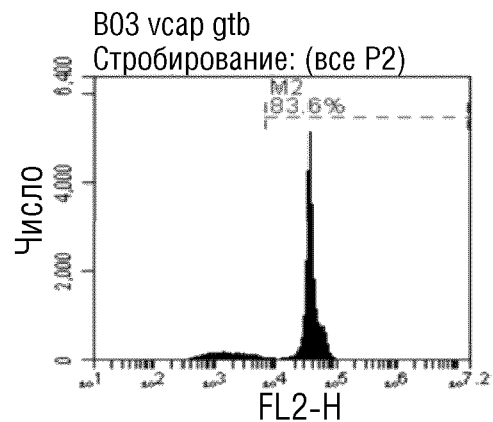
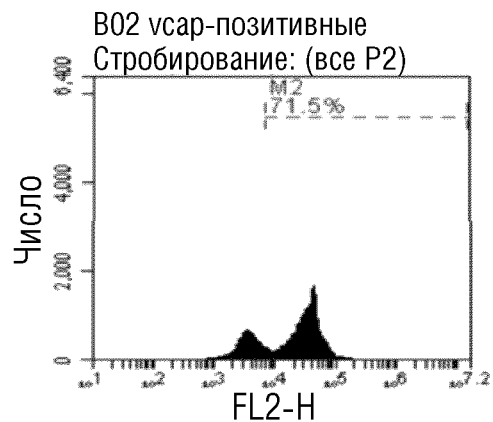
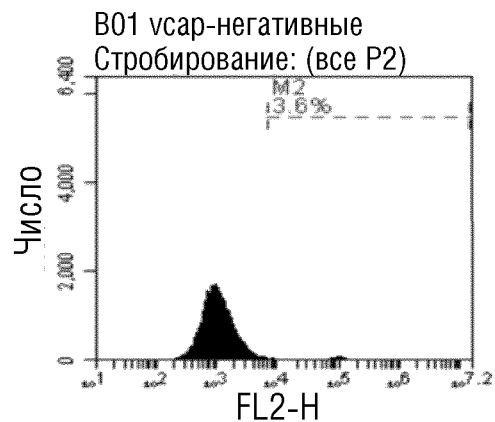
MDA-PCa-2b

ФИГ.11В (продолжение)

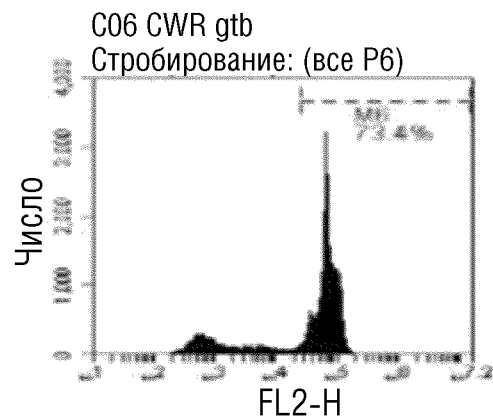
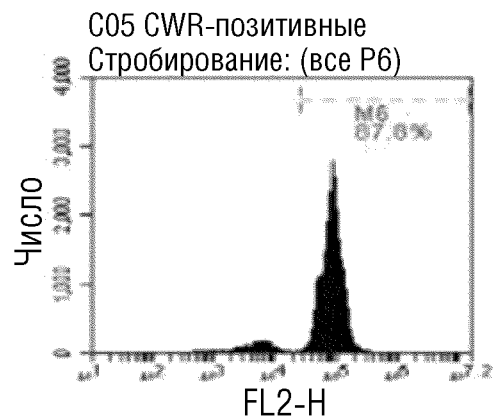
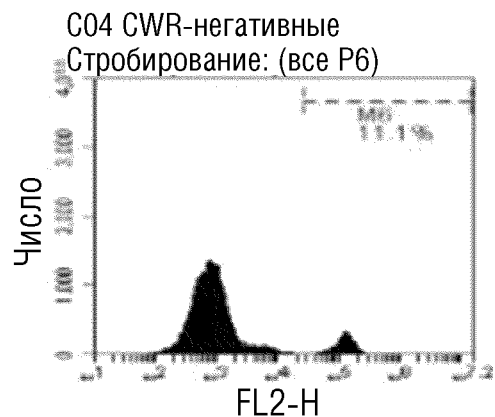
Только сыворотка O

Тритон, 0.1%

J591-GTB + UDP-gal + Сыворотка O



VCaP



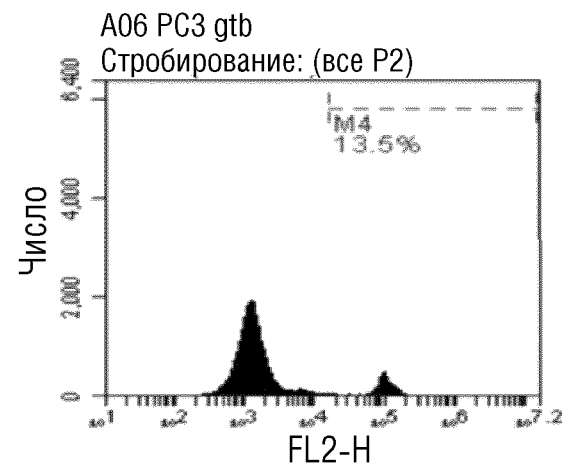
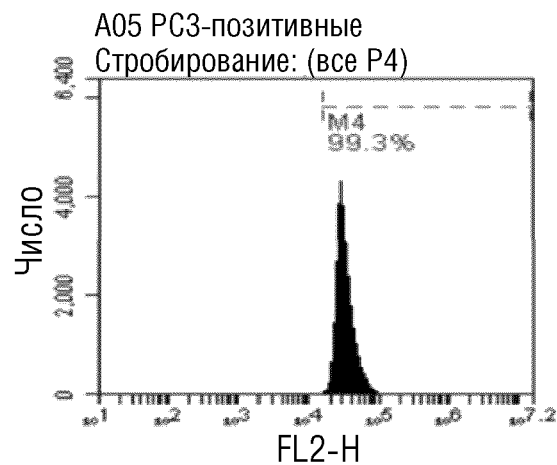
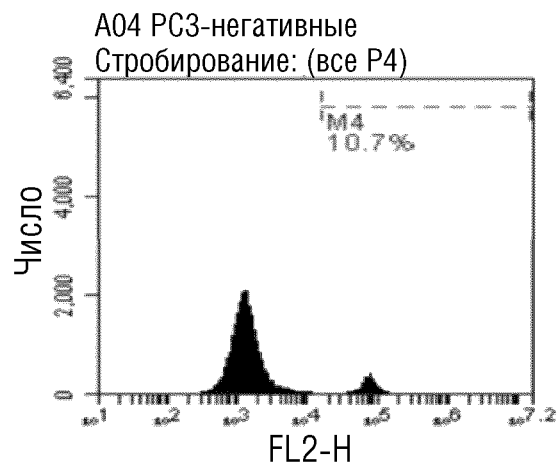
CWR22Rv1

ФИГ.11В (продолжение)

Только сыворотка O

Тритон, 0.1%

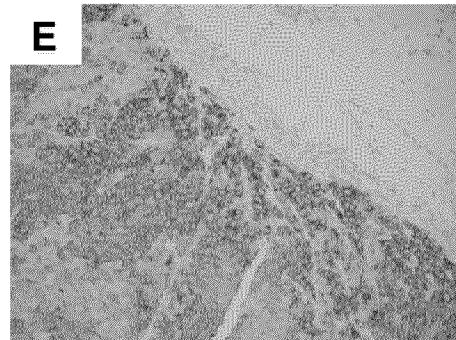
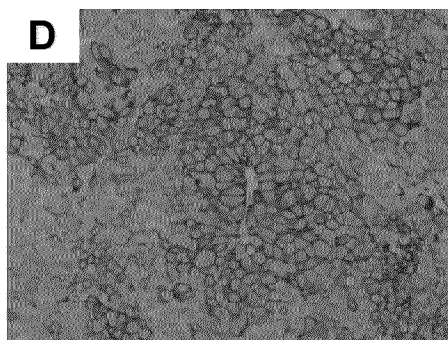
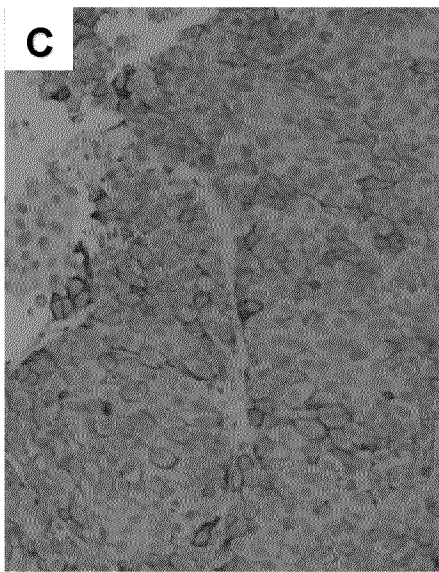
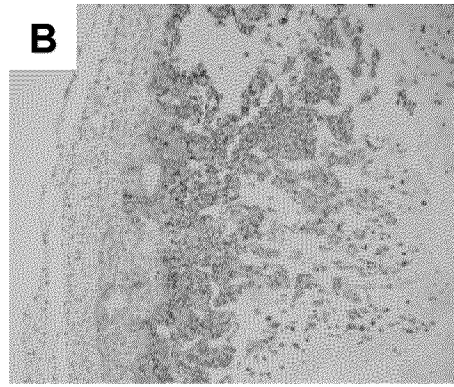
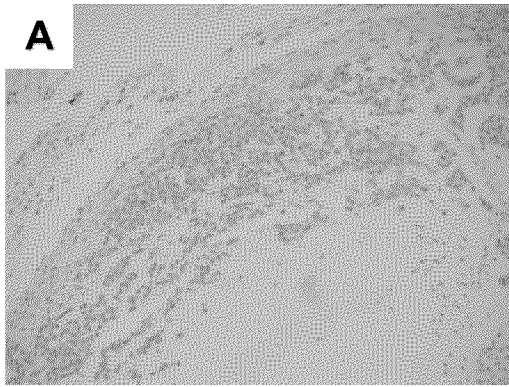
J591-GTB + UDP-gal + Сыворотка O



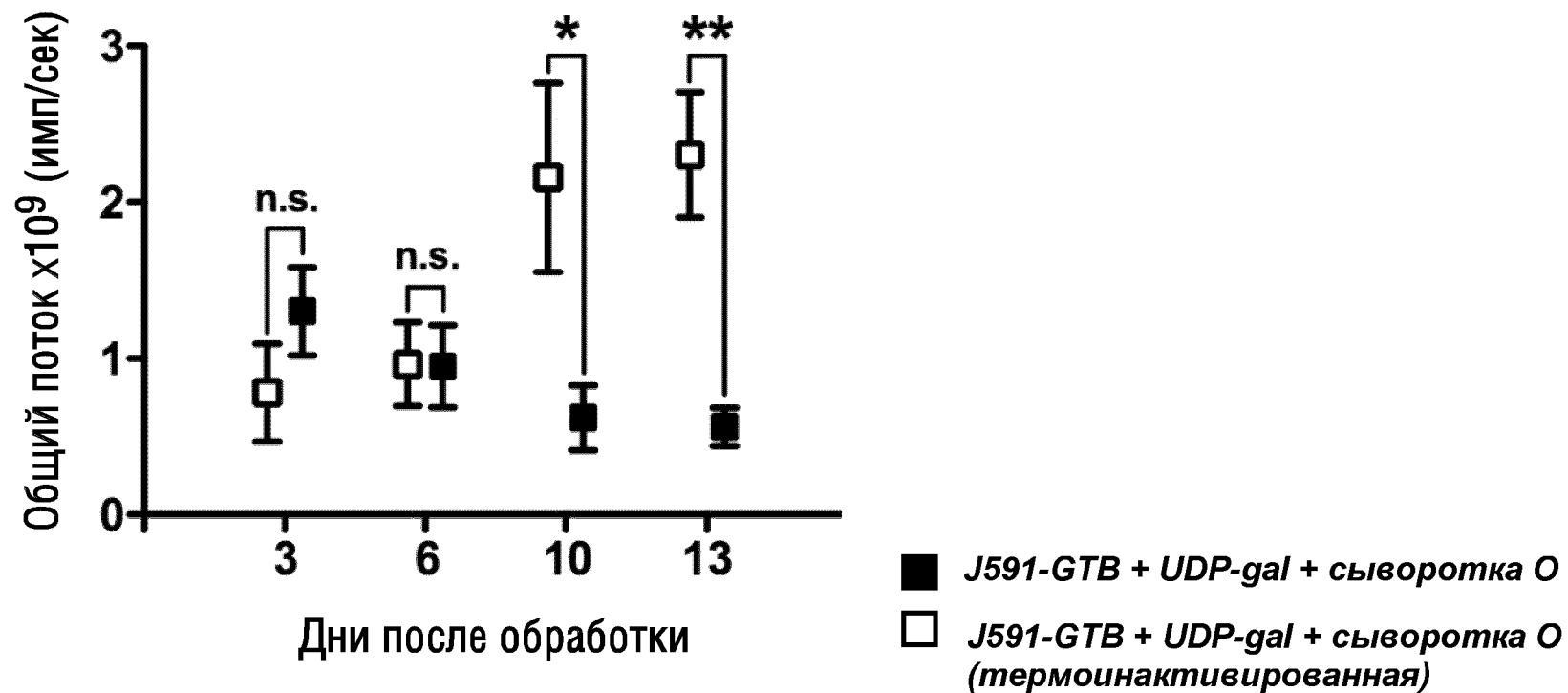
PC3

14/42

ФИГ.12А-12Е



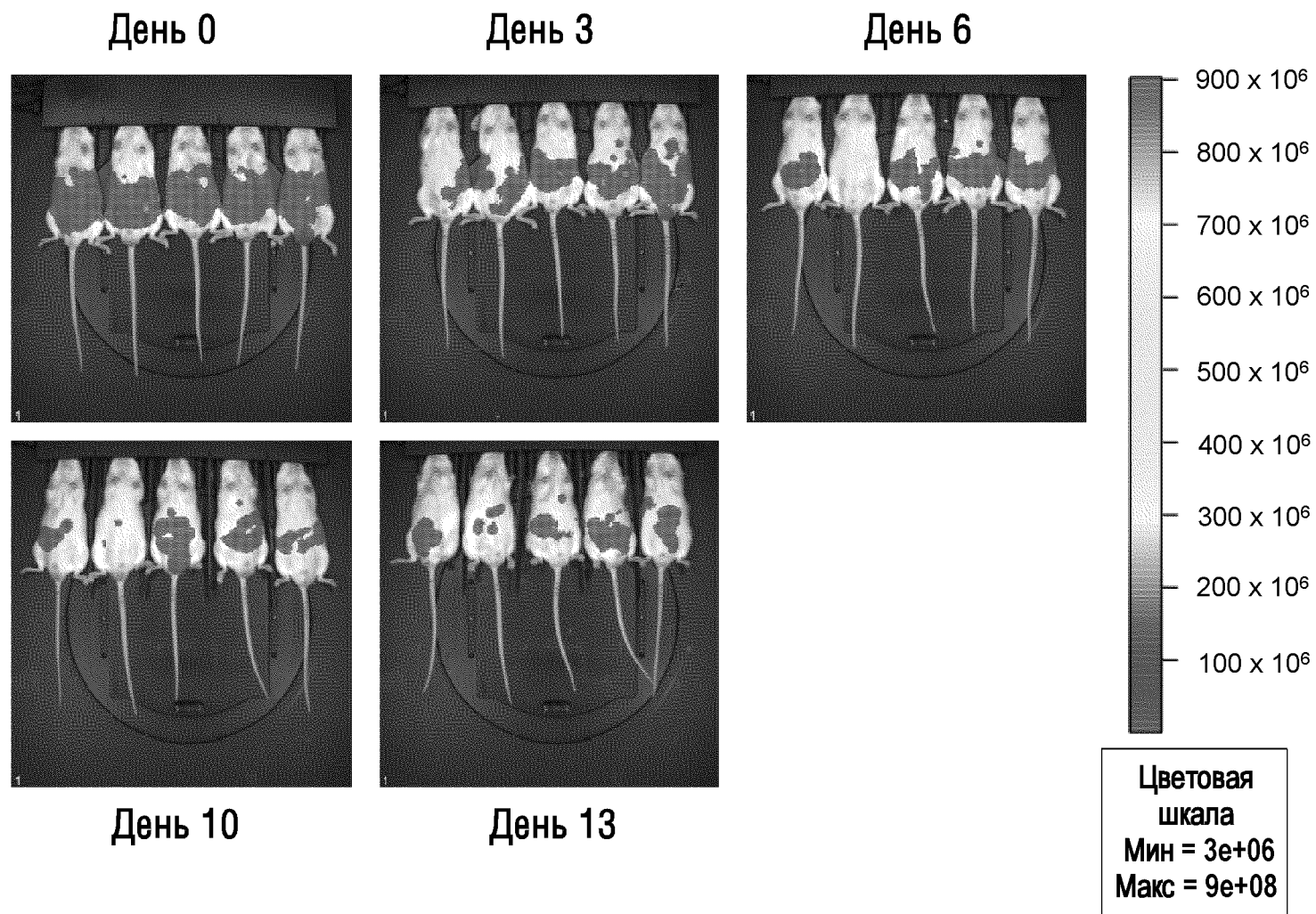
ФИГ.13А



* $p=0.043$
** $p=0.0032$

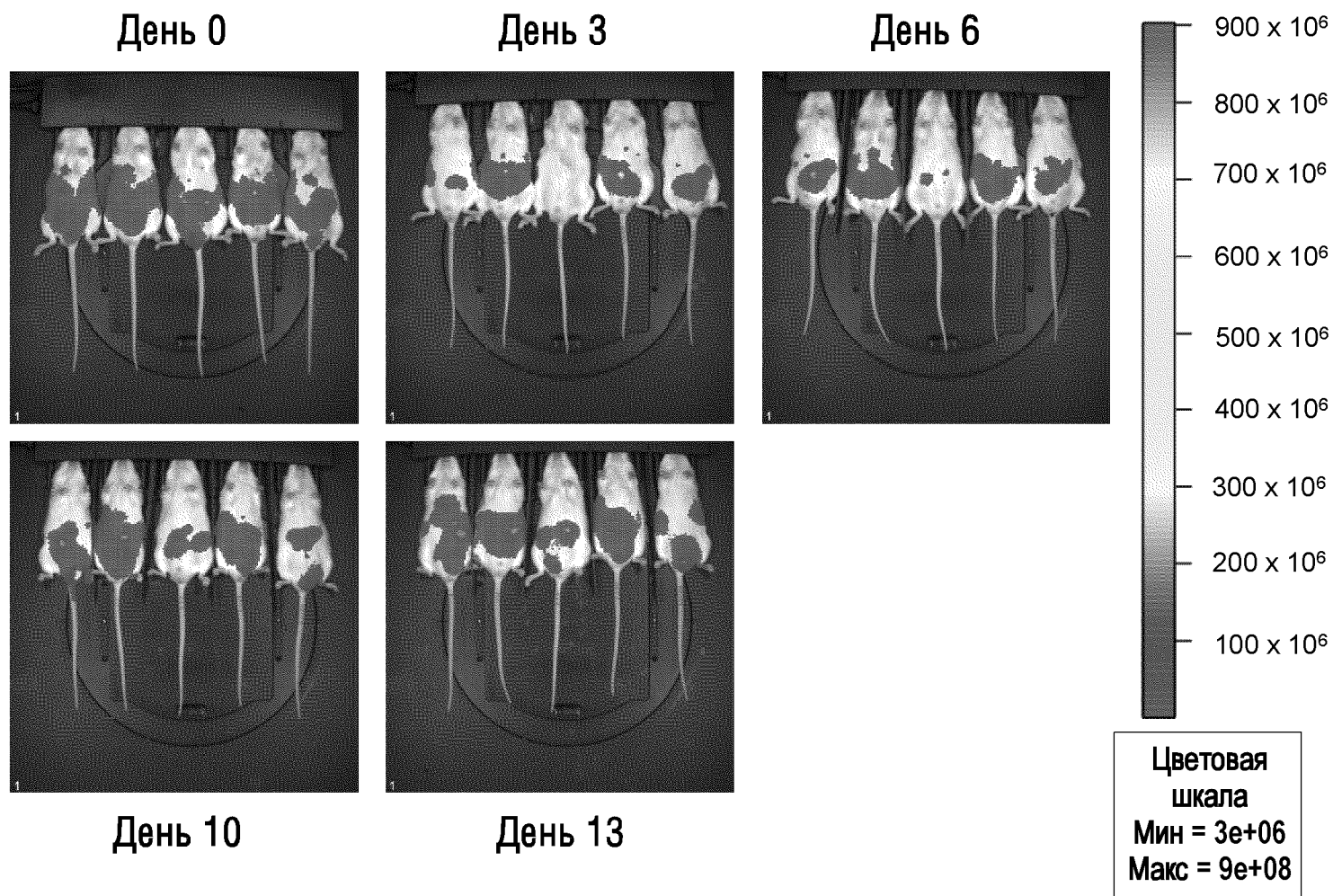
ФИГ.13В

Эксперимент 1. J591-GTV + человеческая сыворотка O



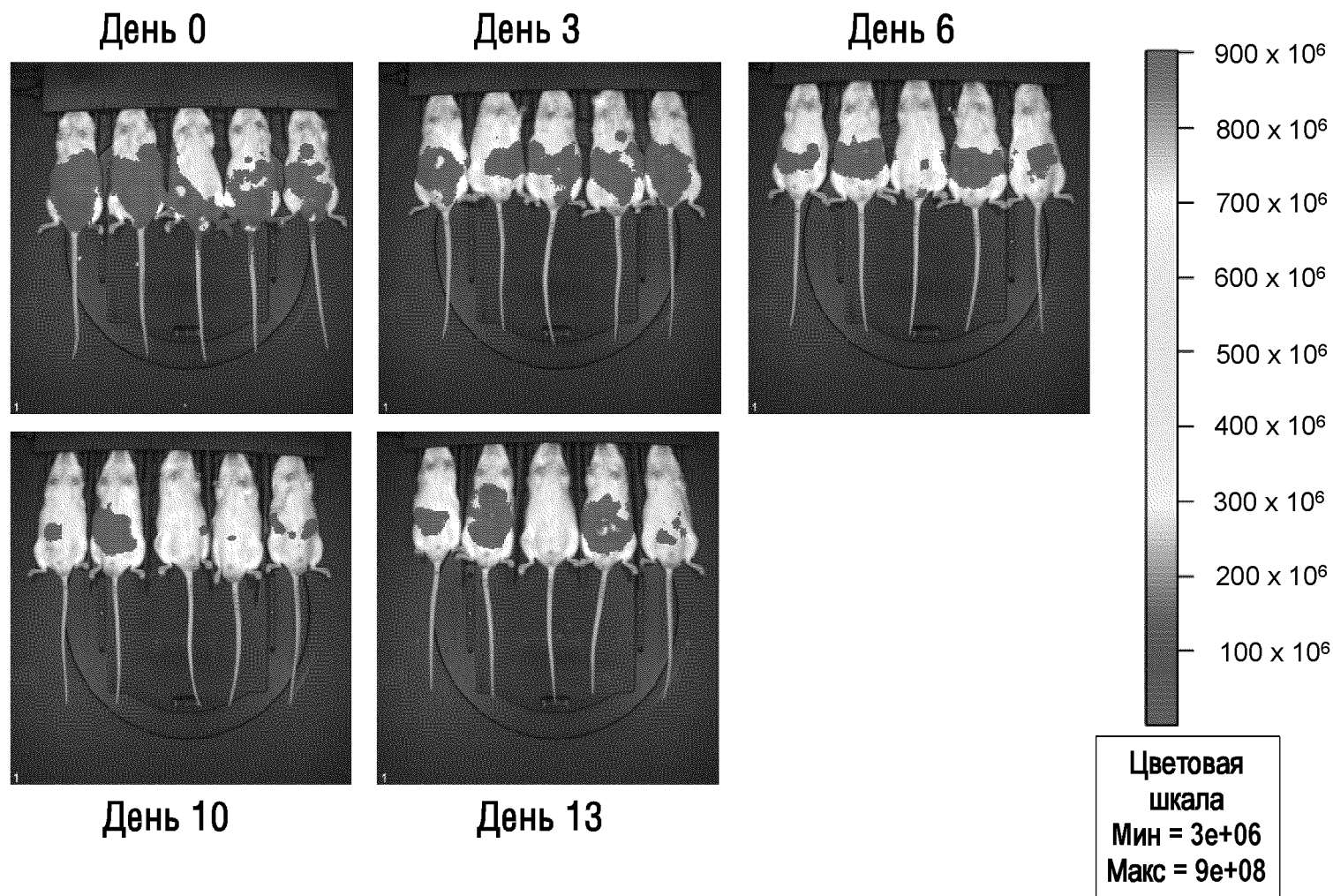
ФИГ.13В (продолжение)

Эксперимент 1. J591-GTV+человеческая сыворотка 0 (термоинактивированная)



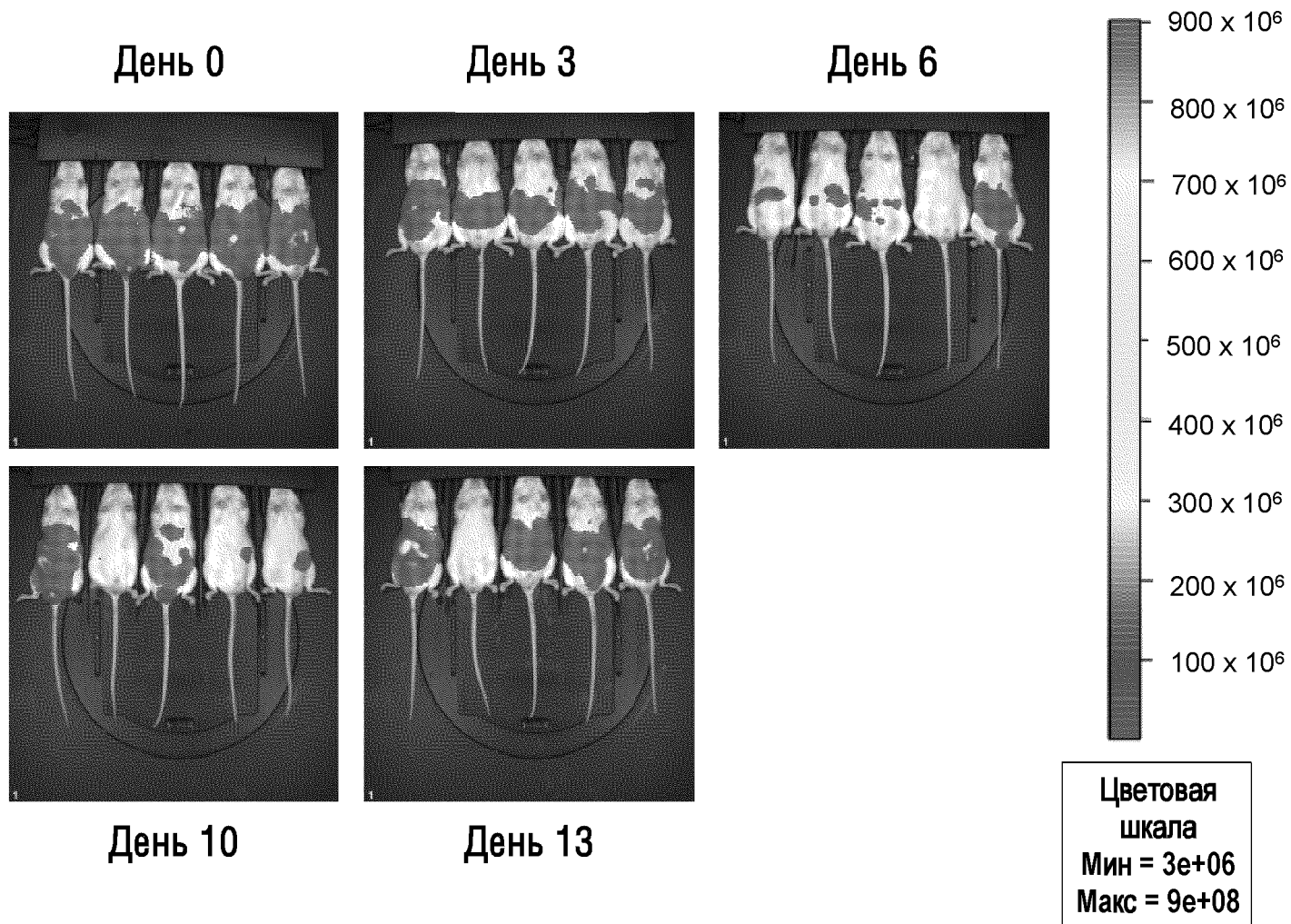
ФИГ.14А

Эксперимент 2. J591-GTV + человеческая сыворотка 0

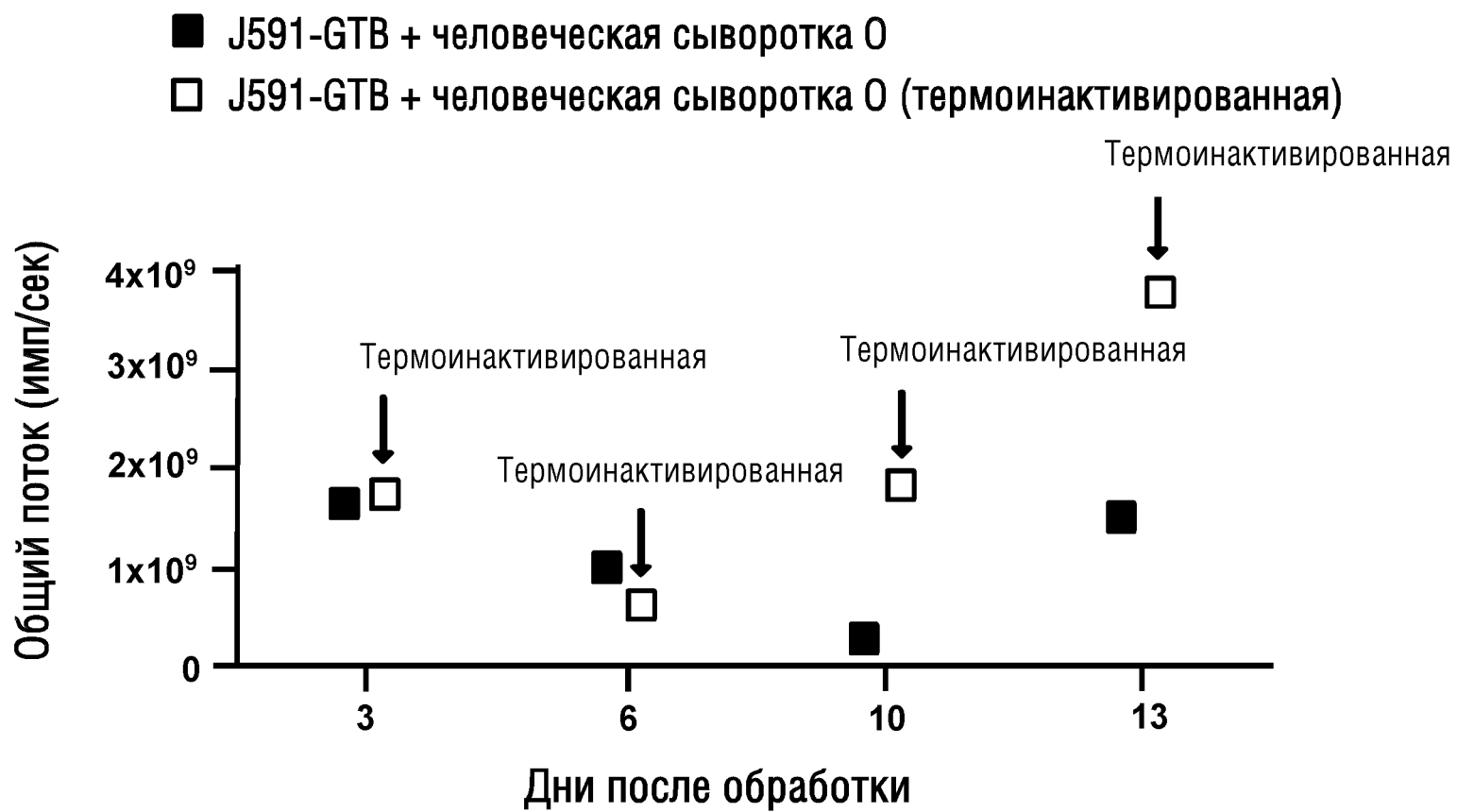


ФИГ.14А (продолжение)

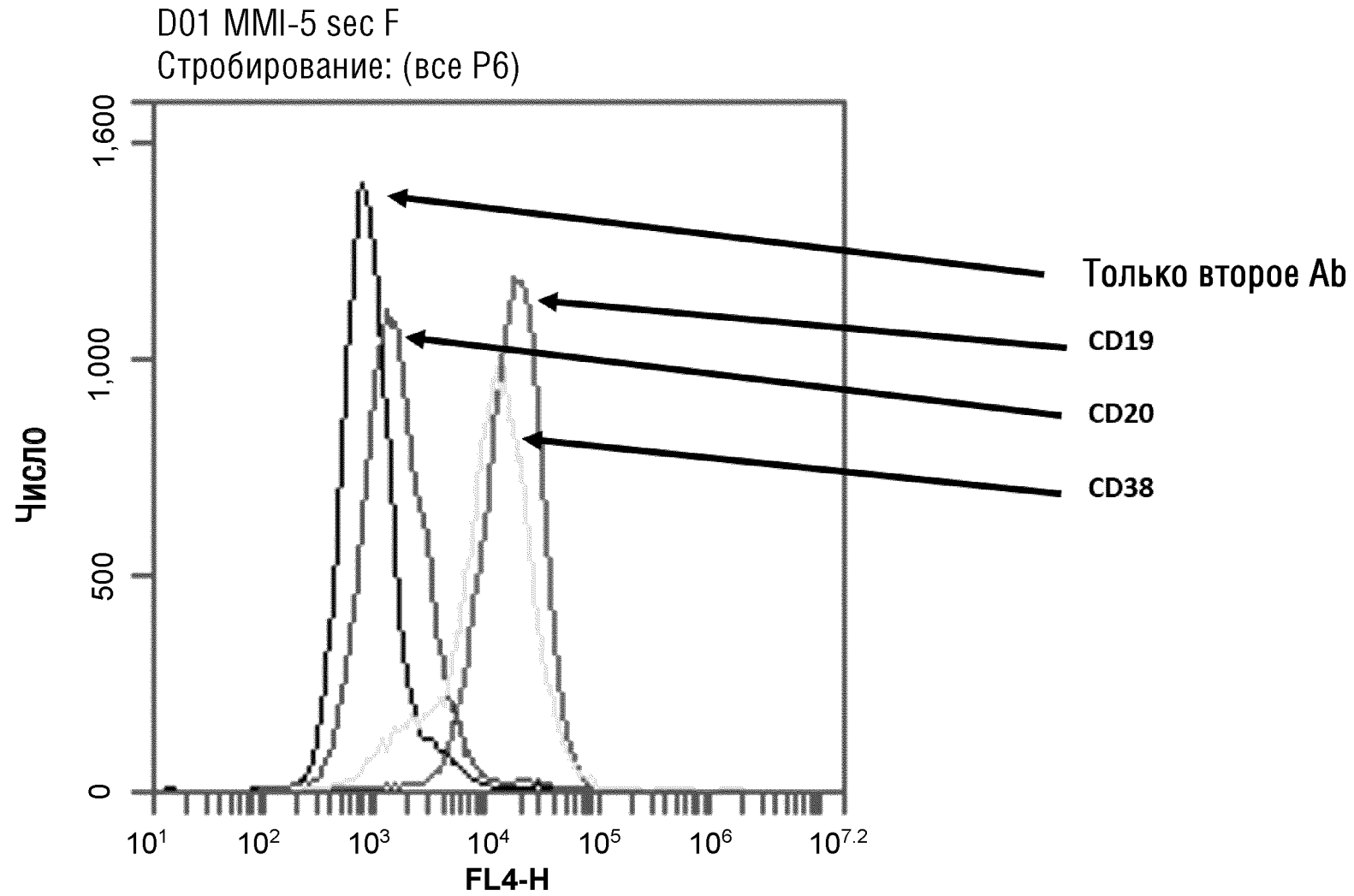
Эксперимент 1. J591-GTV + человеческая сыворотка 0 (термоинактивированная)



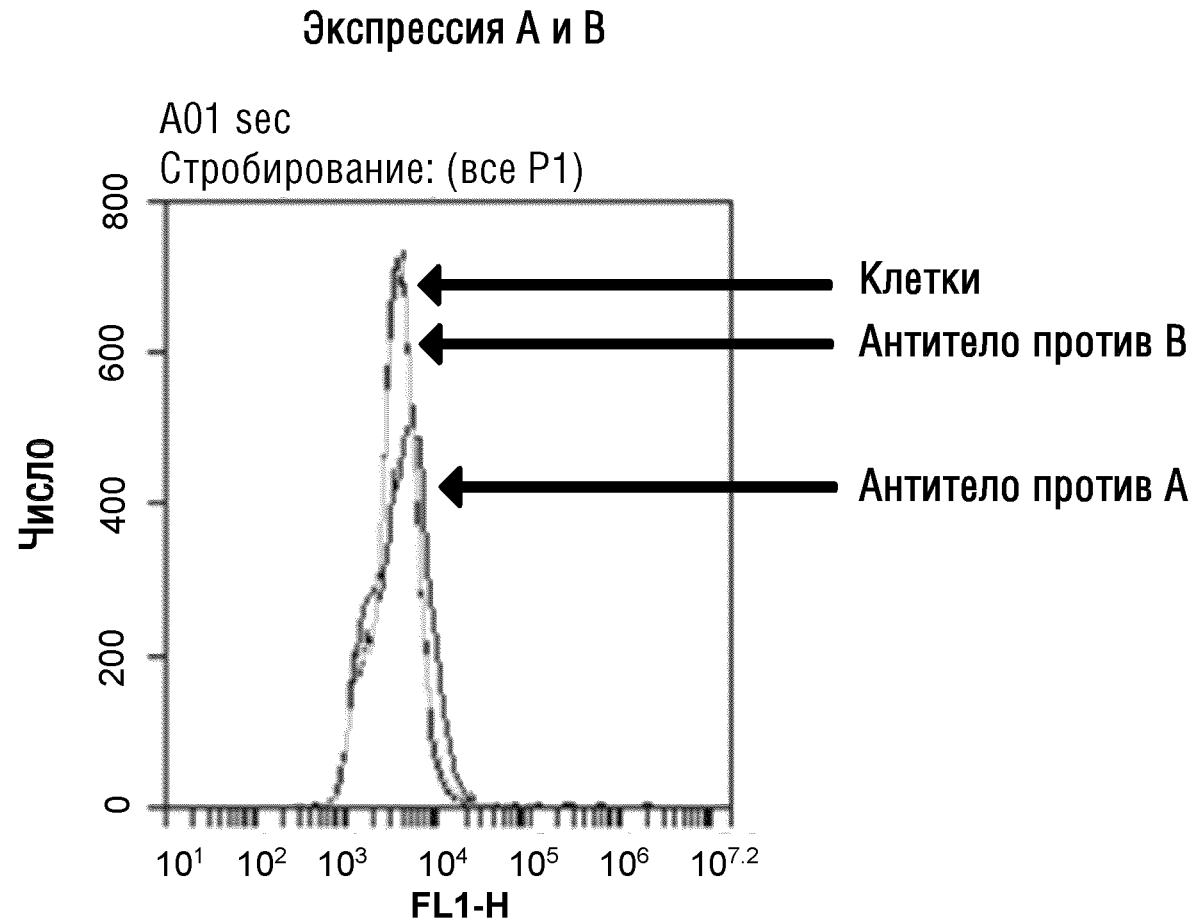
ФИГ.14В



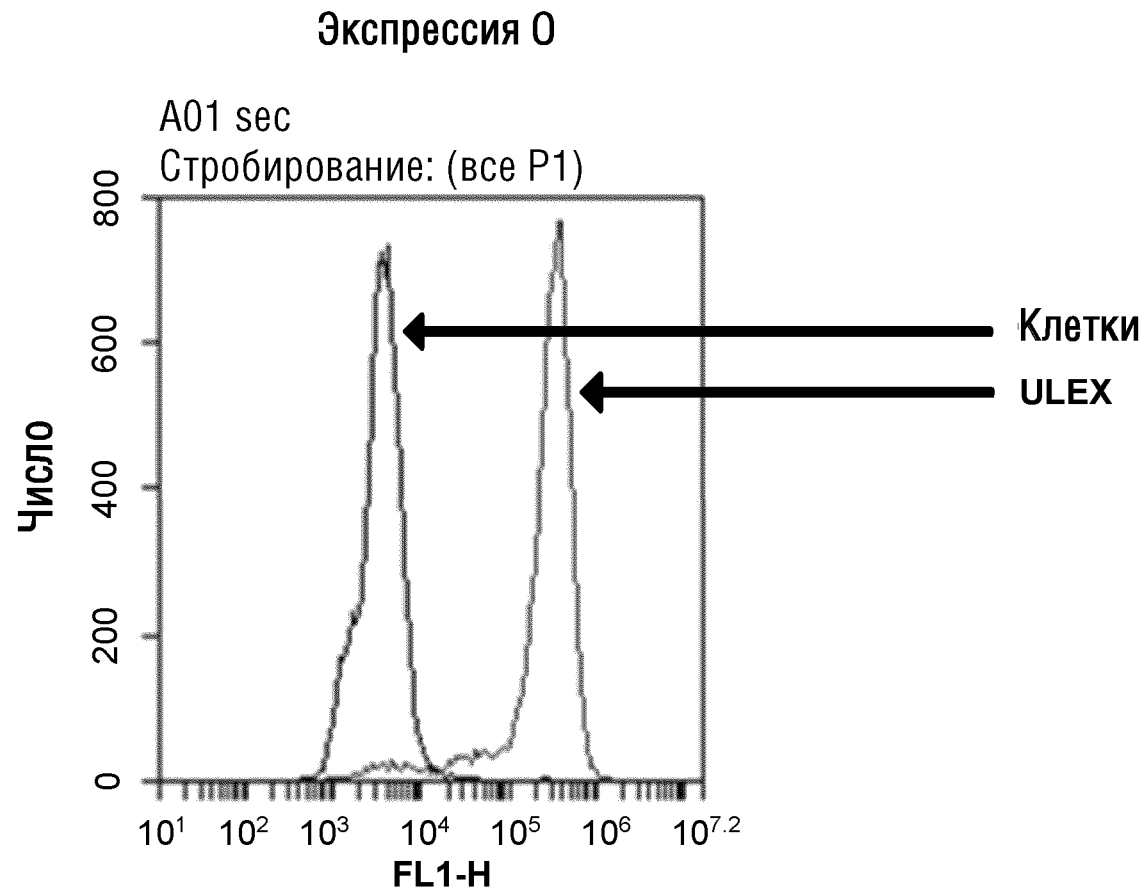
ФИГ.15



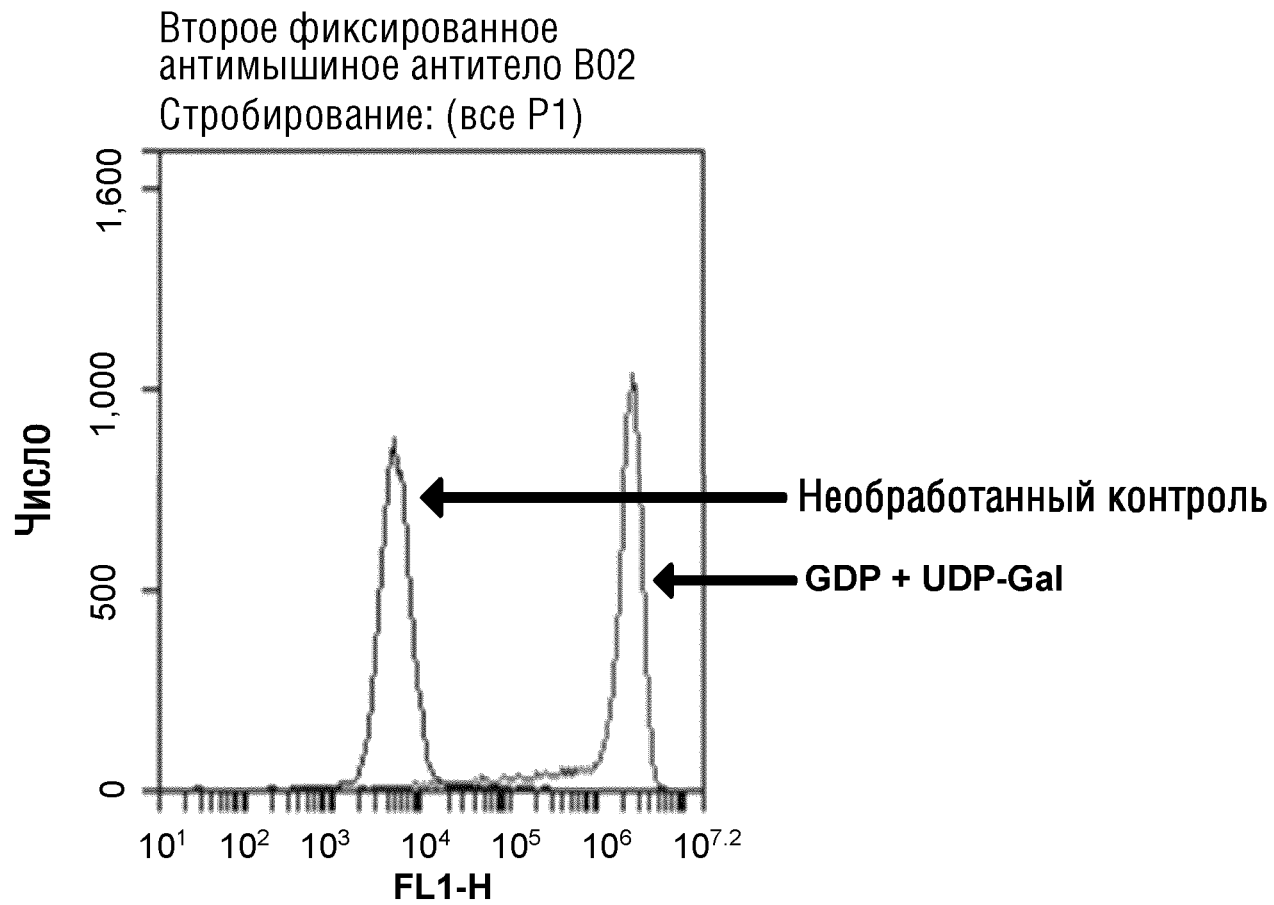
ФИГ.16А



ФИГ.16В

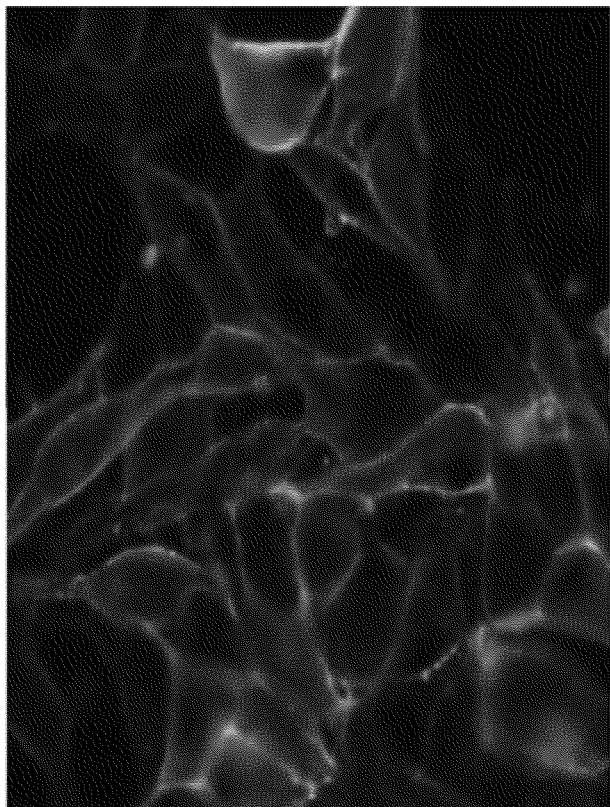


ФИГ.17

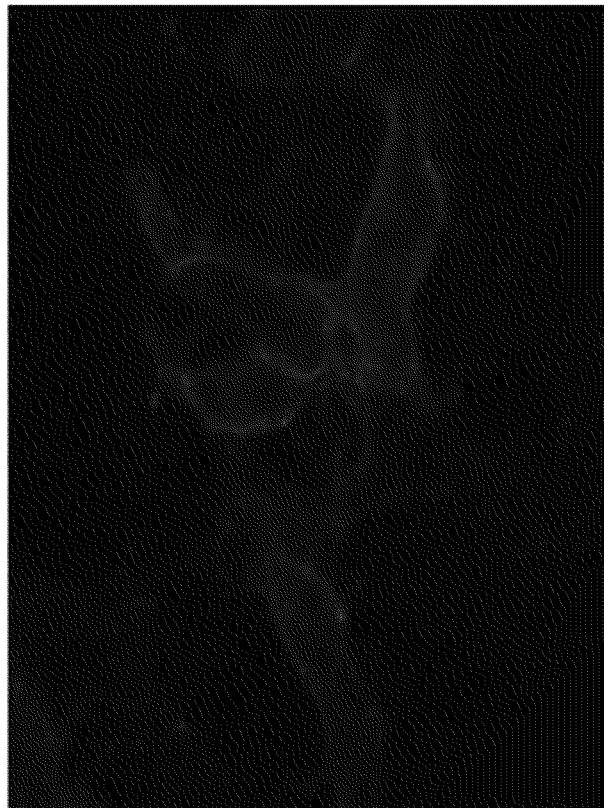


ФИГ.18

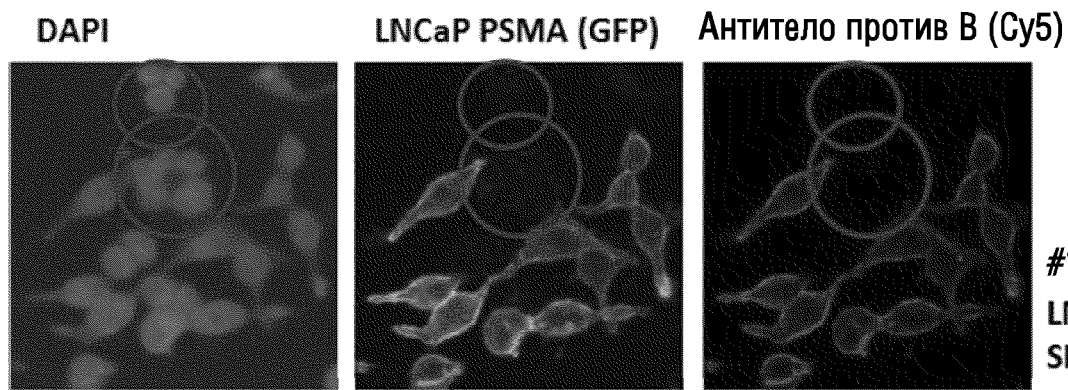
ACUPA-PEG-1500-GTB



Только GTB



ФИГ.19

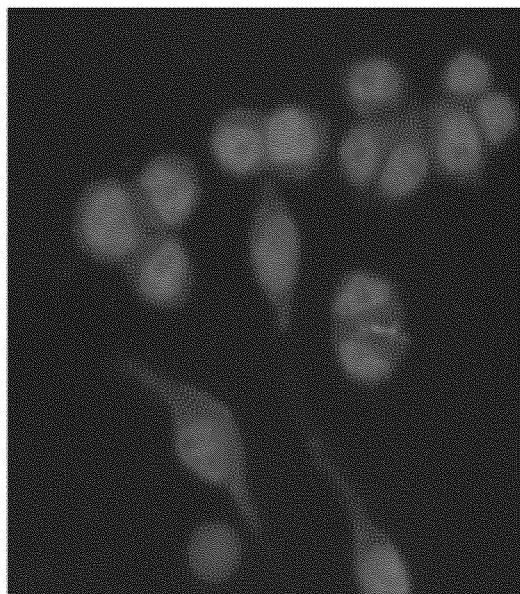


#1: совместное инкубирование → двойное окрашивание
LNCaP: PSMA+ B+
SKBR5: PSMA- B-

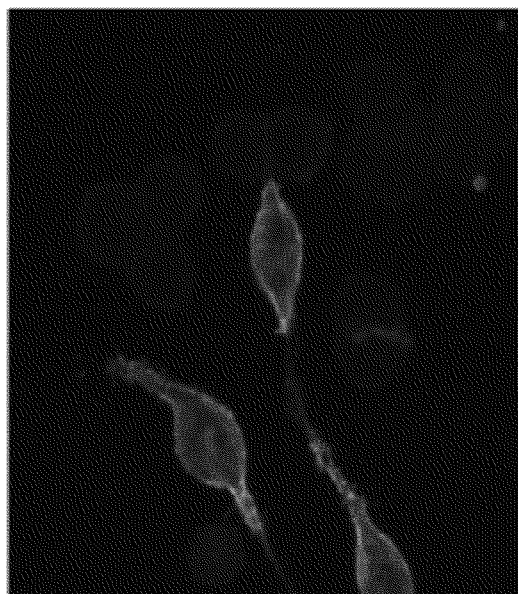
○ = SKBR5: PSMA-/B-

ФИГ.20

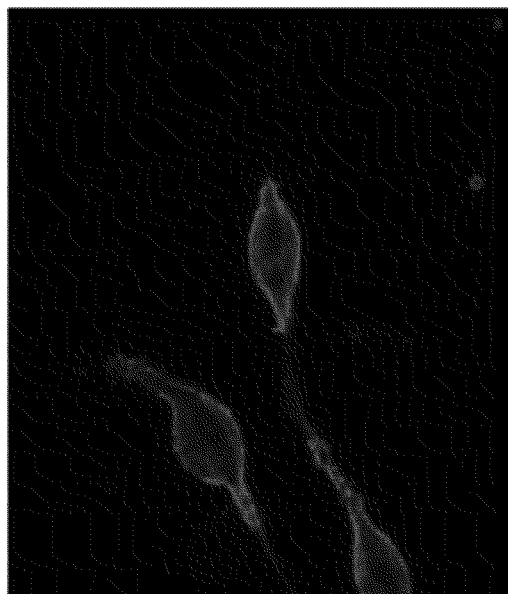
DAPI



PSMA (GFP)

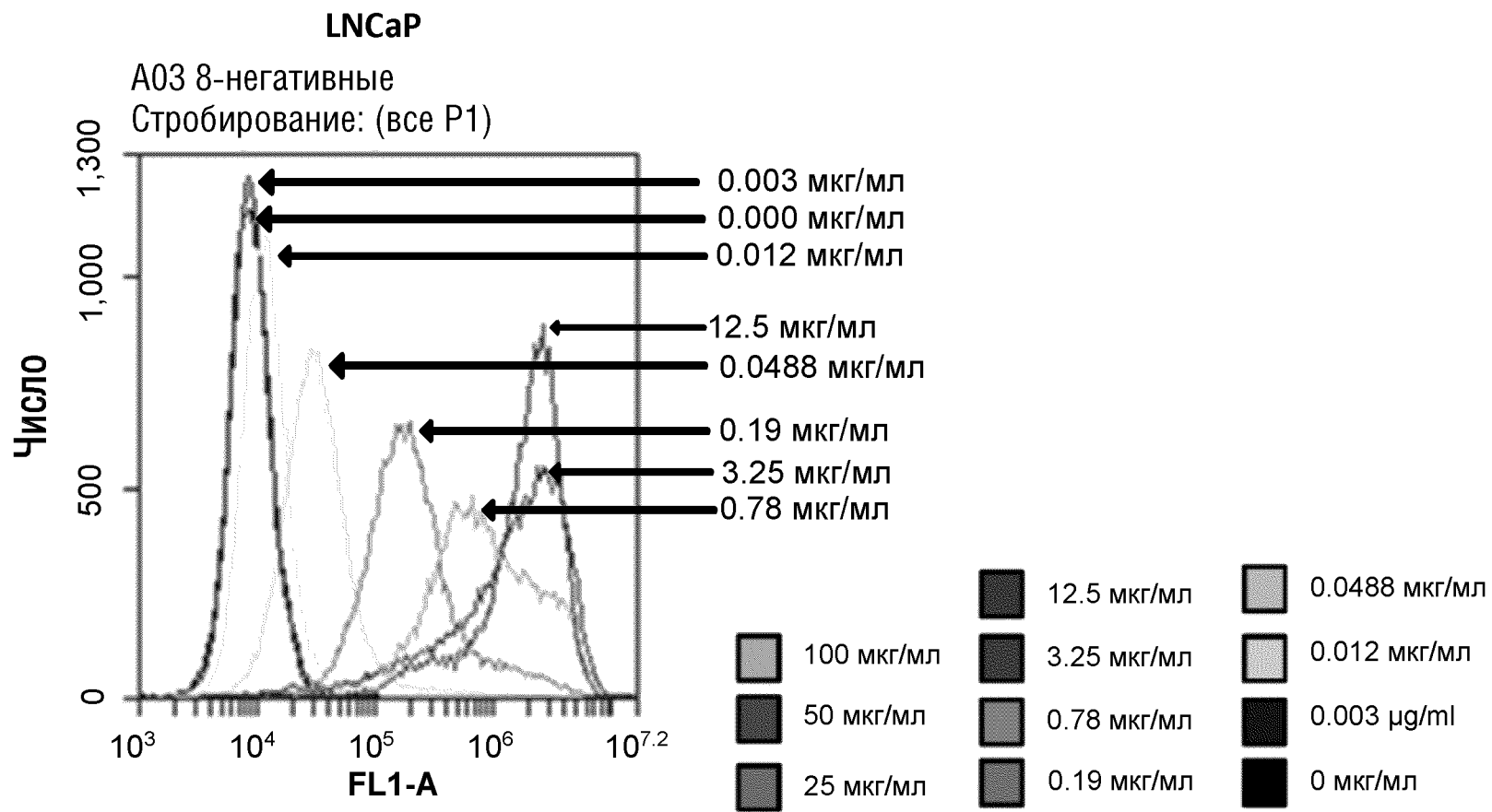


B (Cy5)

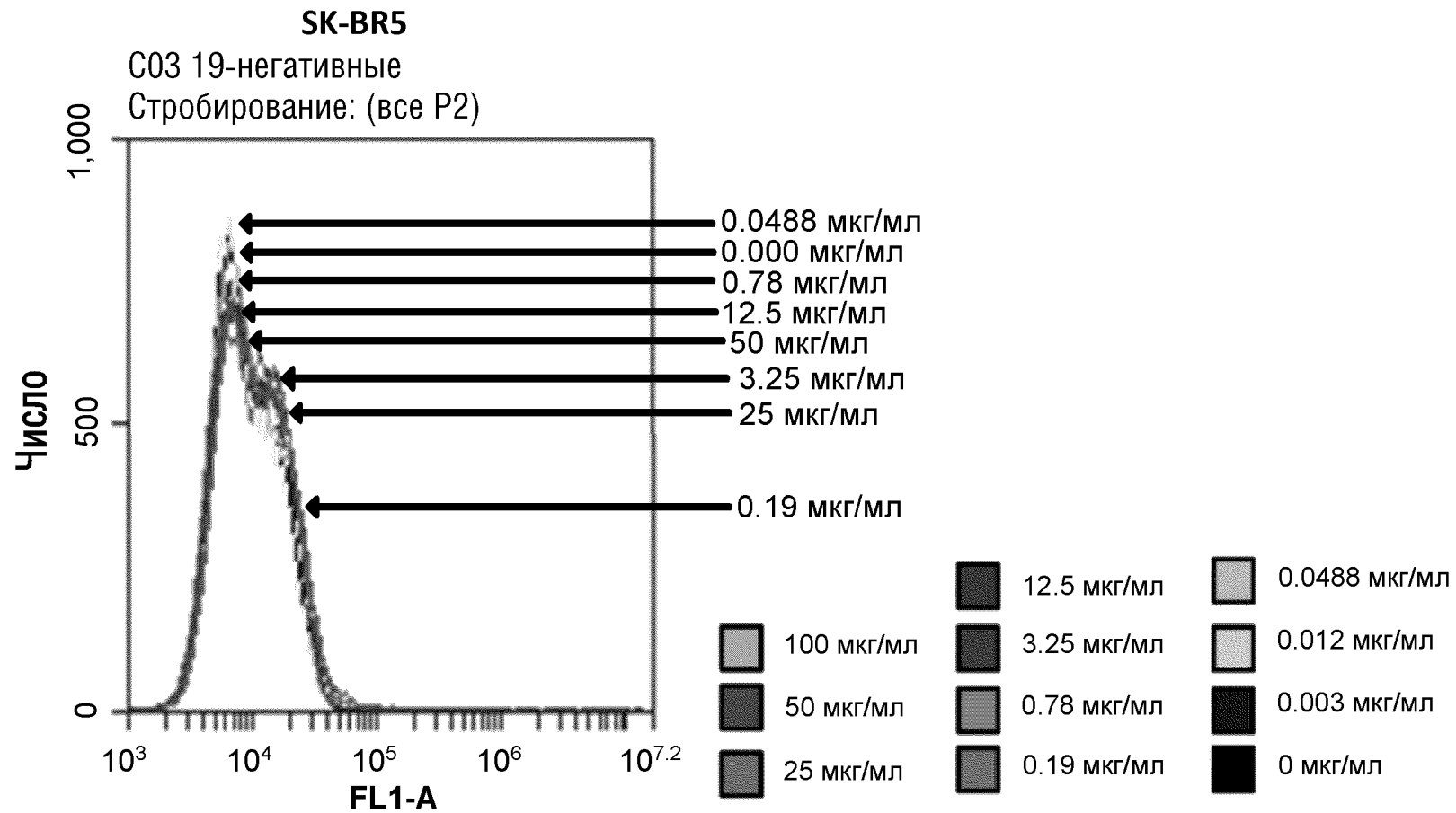


28/42

ФИГ.21А



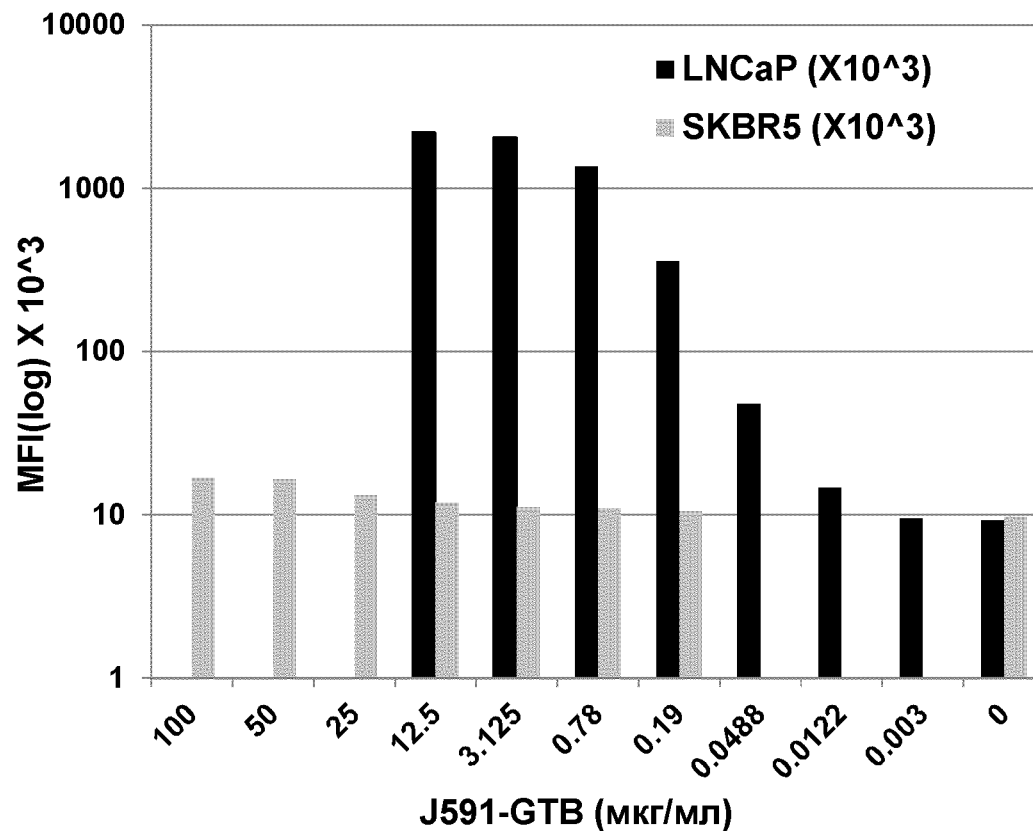
ФИГ.21В



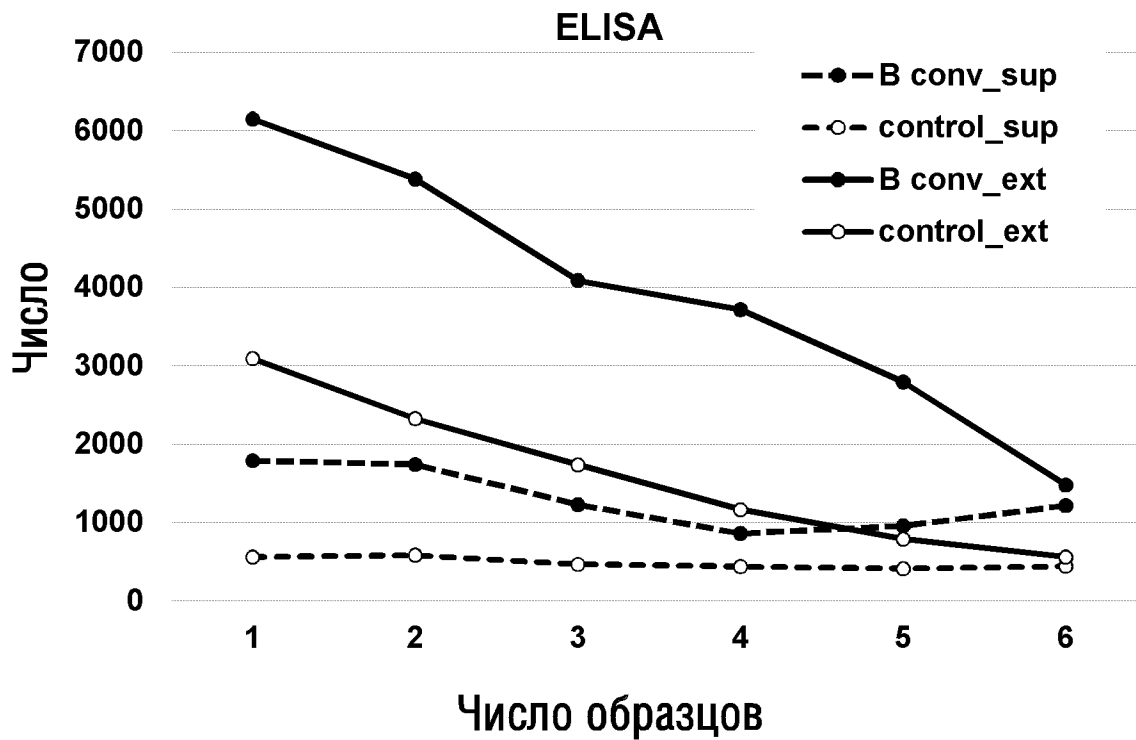
ФИГ.22

Ось Y: логарифмическая шкала

HC67GTB (мкг/мл)	LNCaP (X10 ³)	SKBR5 (X10 ³)
100		16.9
50		16.6
25		13.3
12.5	2198	11.9
3.125	2062	11.2
0.78	1362	11
0.1953	359	10.7
0.0488	47.9	
0.0122	14.6	
0.003	9.6	
0	9.3	9.8

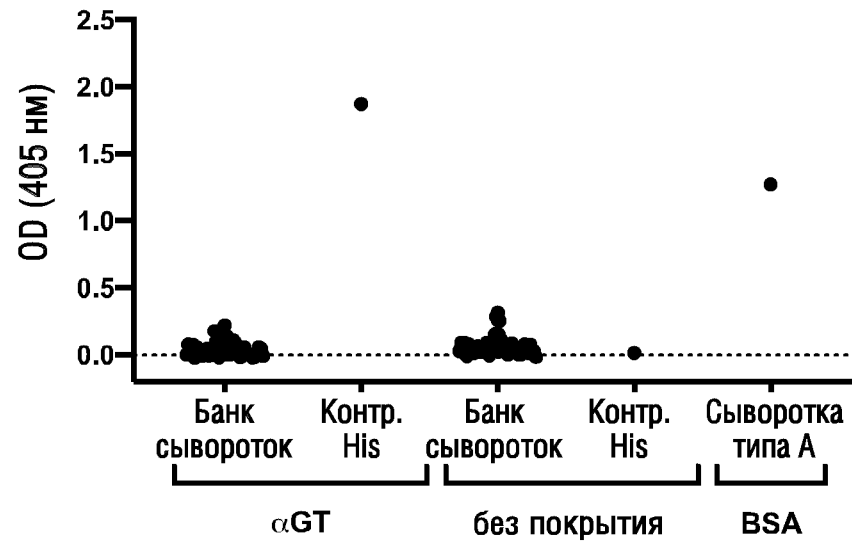


ФИГ.23

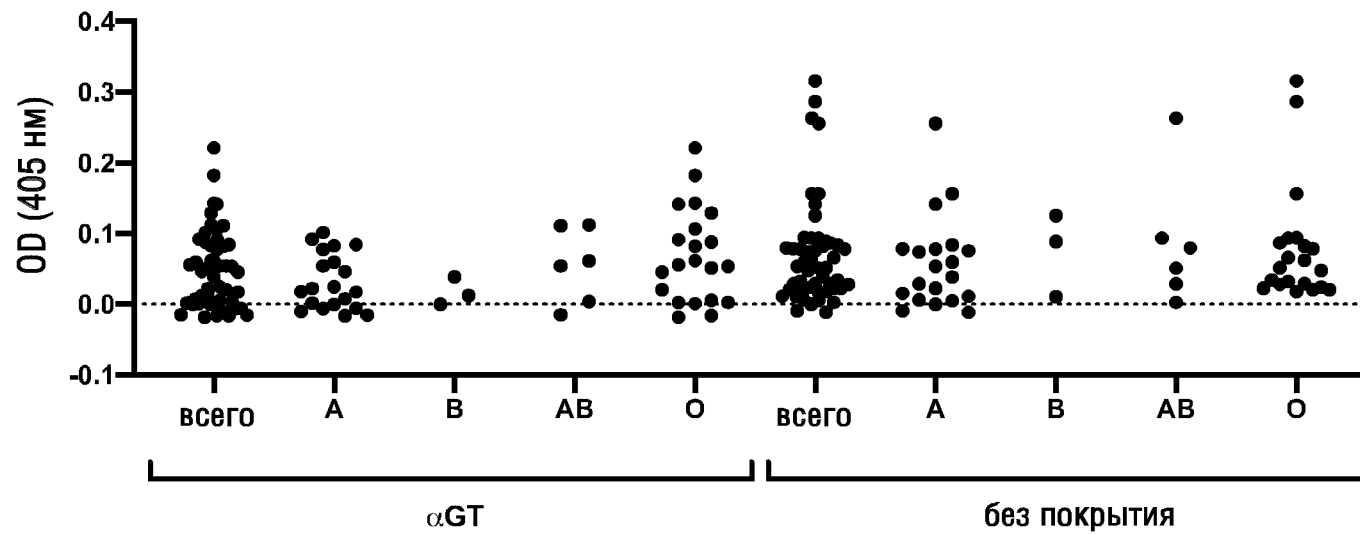


Разведение супернатанта	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Отработанная среда с В-конверсией	1786	1739	1227	857	955	1215
Отработанная контрольная среда	556	580	464	437	409	441
Разведение экстрактов	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Клеточный экстракт с В-конверсией	6146	5380	4085	3714	2792	1475
Контрольный клеточный экстракт	3089	2323	1734	1162	788	557

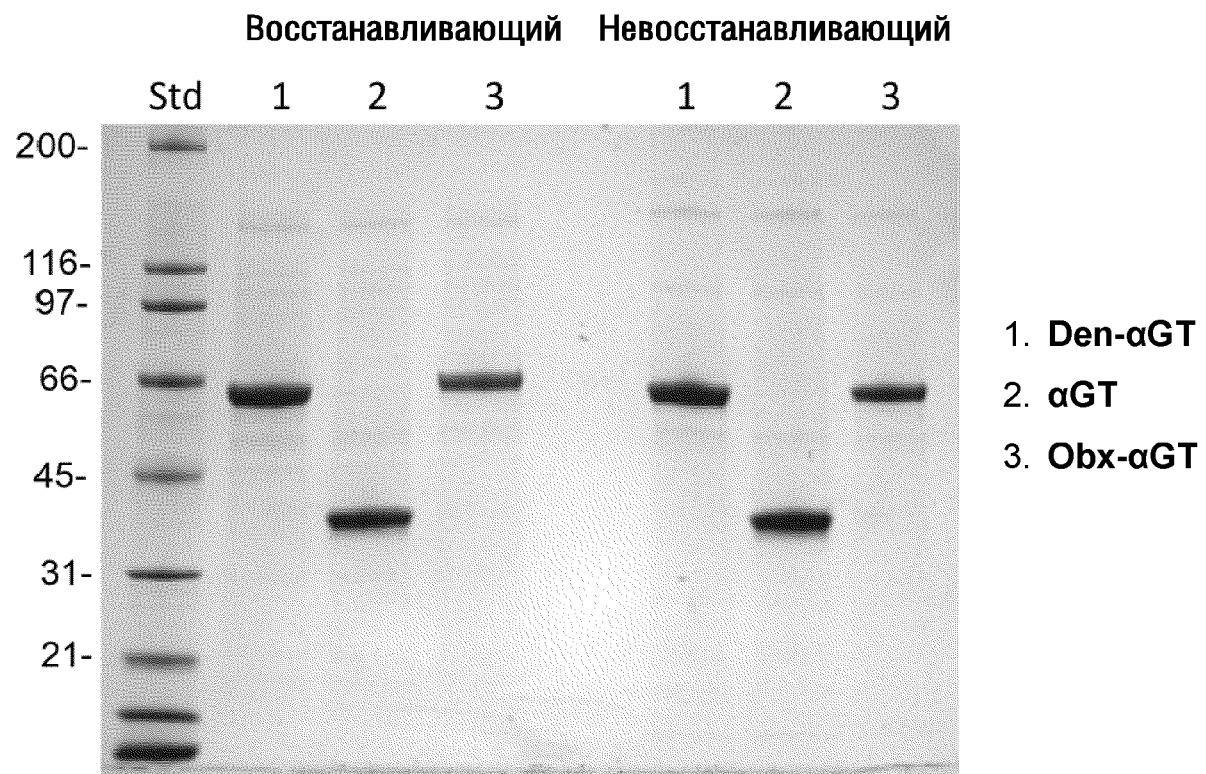
ФИГ.24А



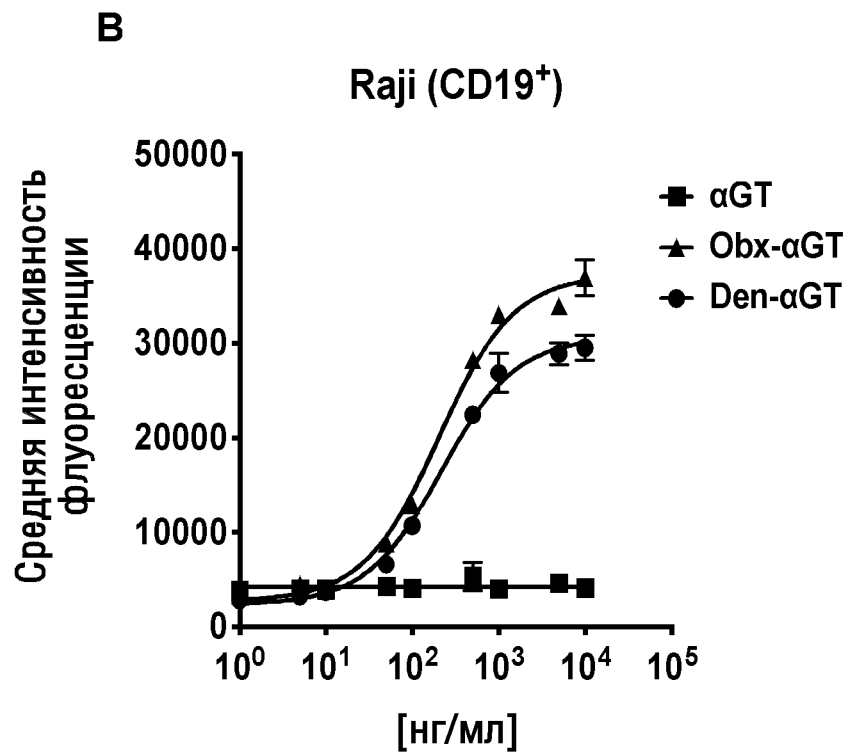
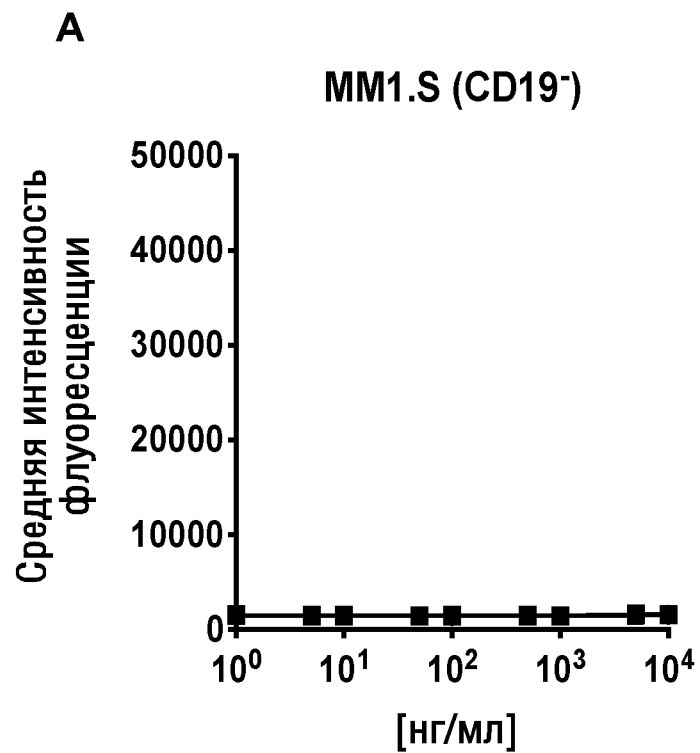
ФИГ.24В



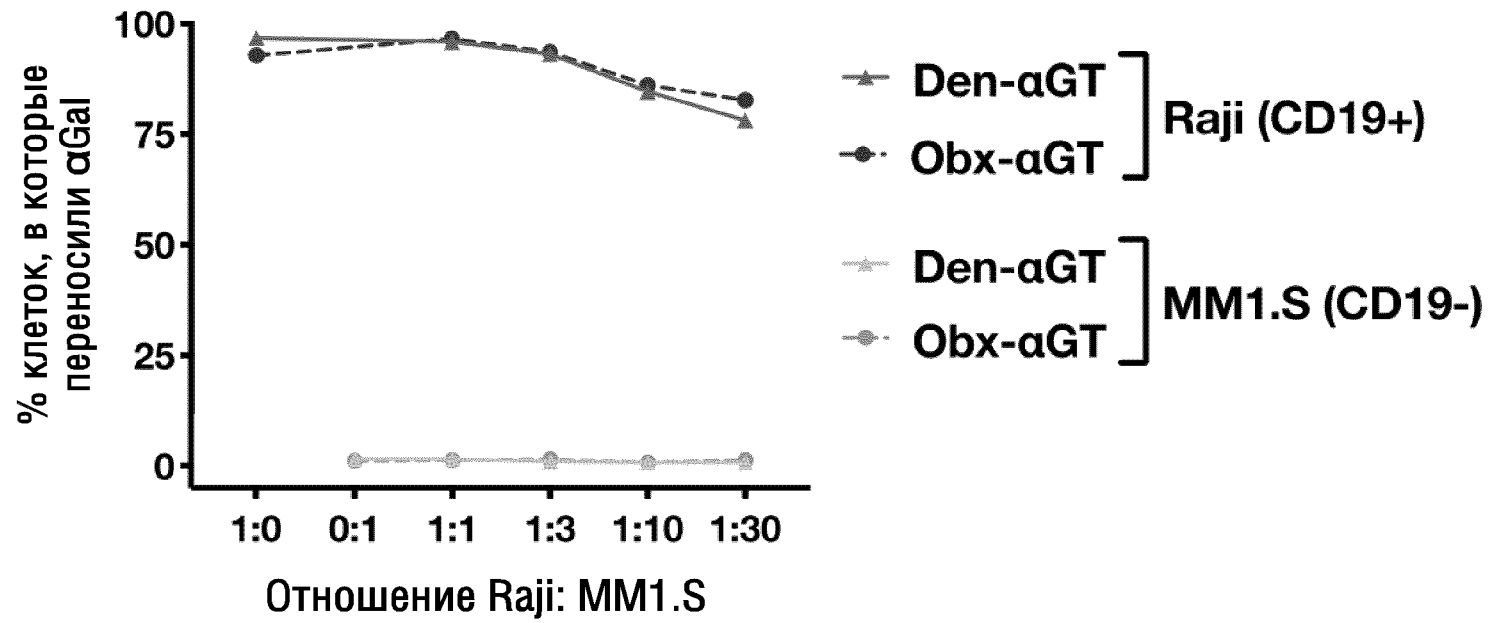
ФИГ.25



ФИГ.26А-26В

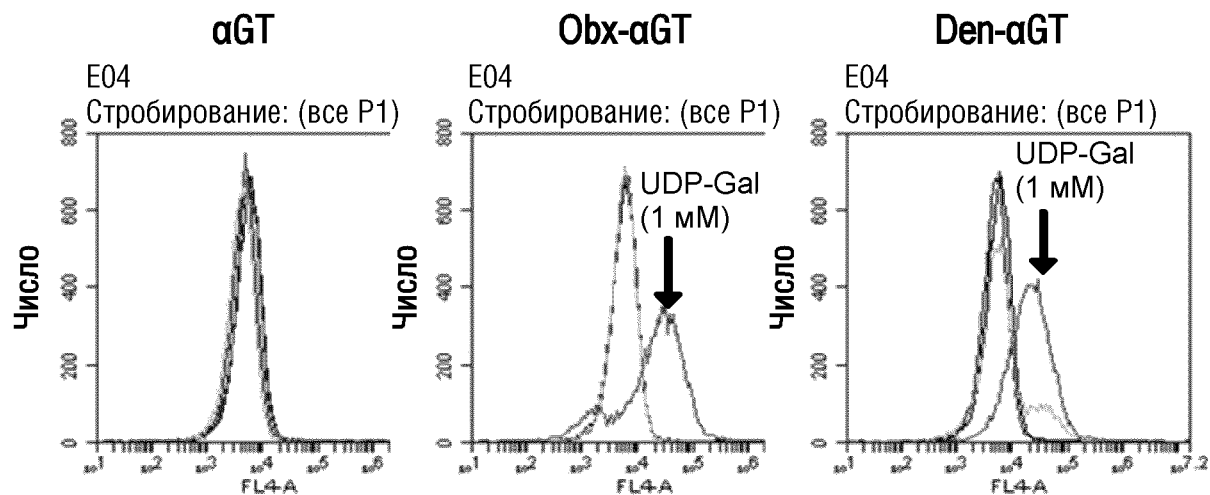


ФИГ.27

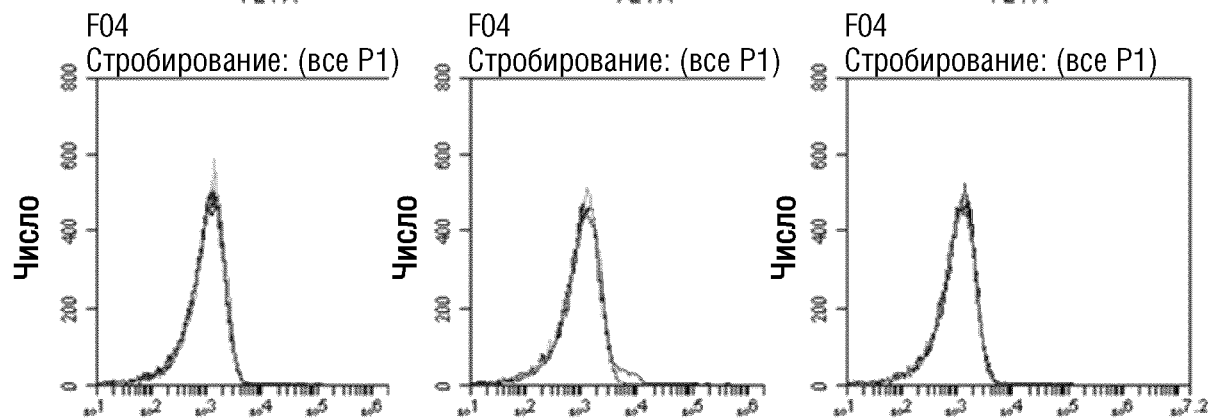


ФИГ.28

Ab против α Gal



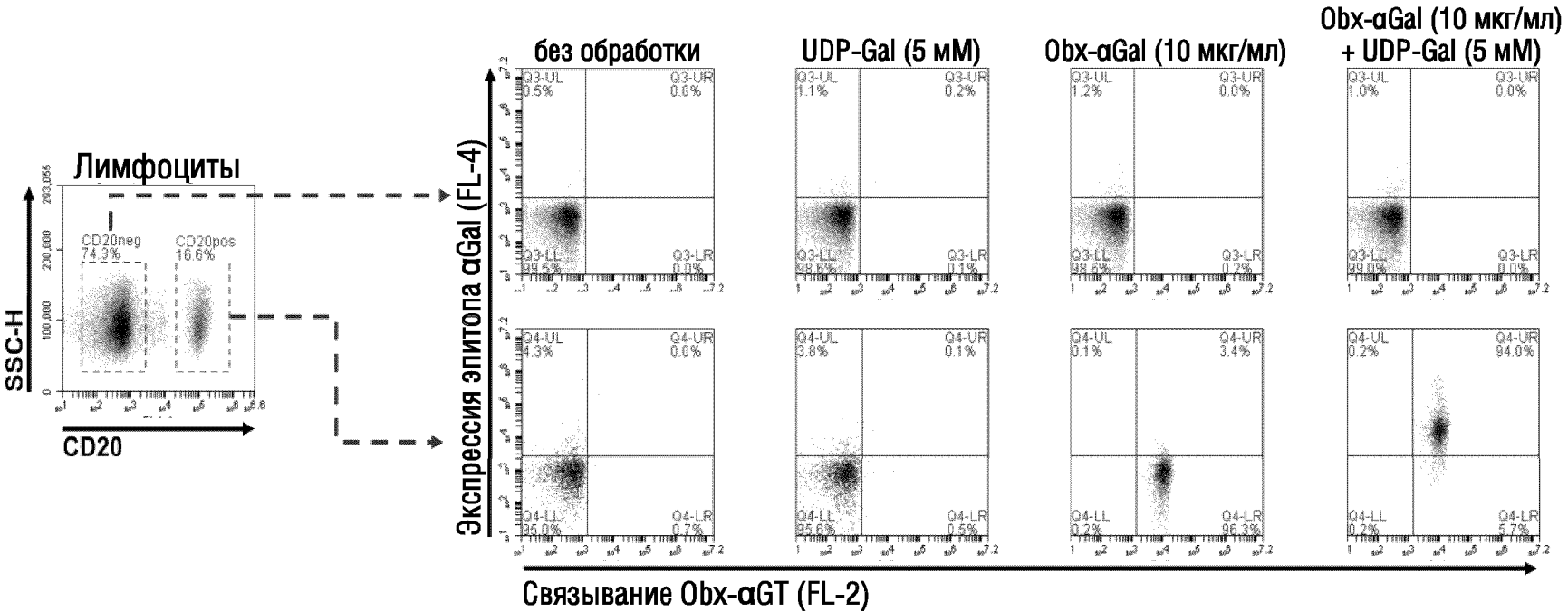
Ab против B



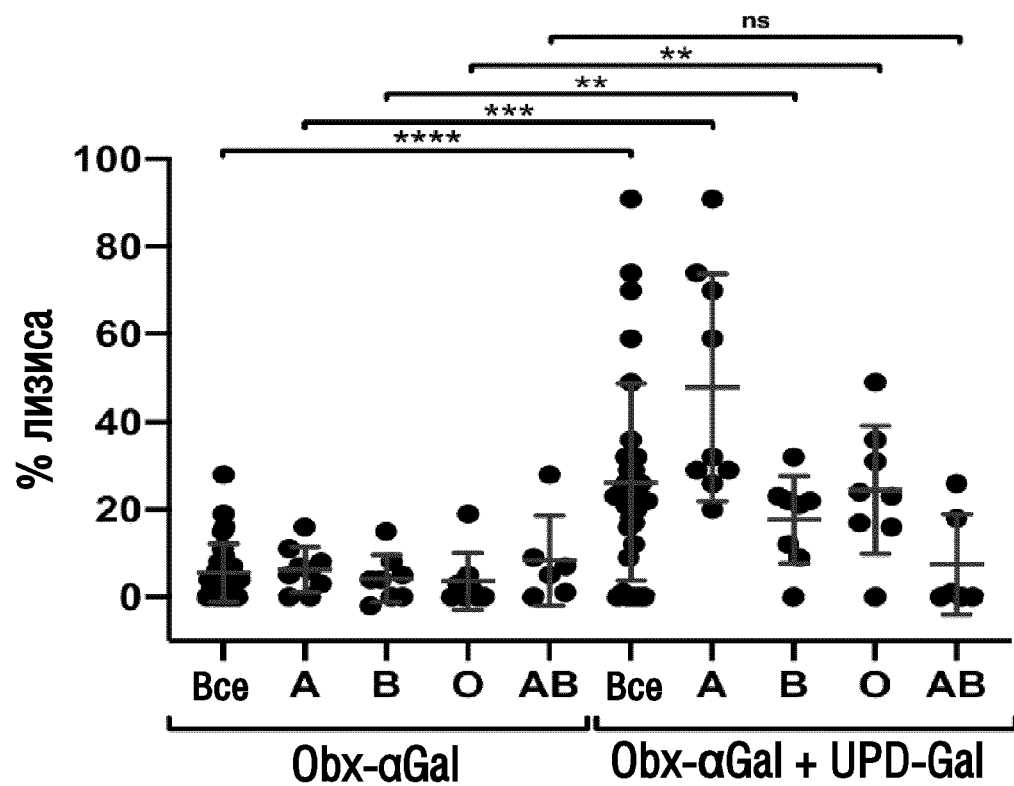
MFI (FL-4) →

- Второе Ab
- Без UDP-Gal
- ⋯ UDP-Gal (0.1 mM)
- UDP-Gal (1 mM)

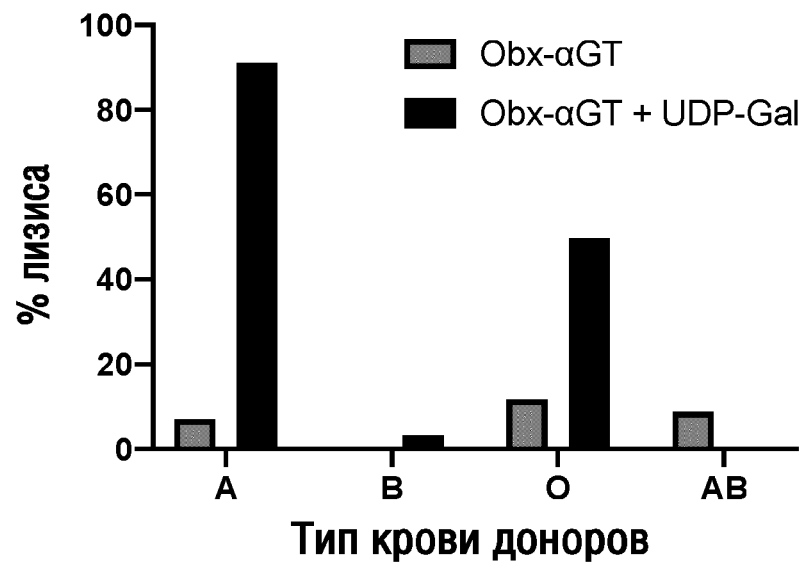
ФИГ.29



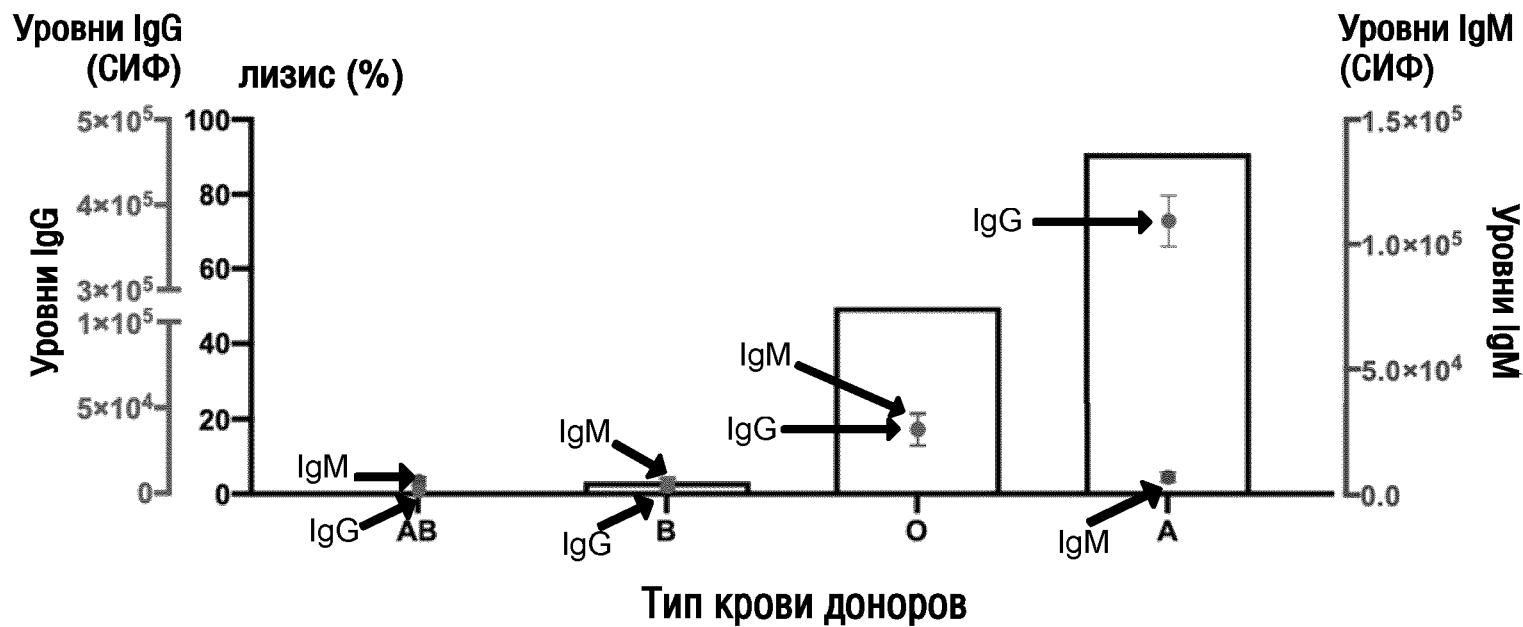
ФИГ.30



ФИГ.31А



ФИГ.31В



ФИГ.32А

		UDP-Gal (mM)				
		0	1	5	10	20
Обх-αGT (мкг/мл)	0	1	2.412	1.118	1.076	1.558
	10	24.63	24.9	24.08	26.37	27.34
	25	26.72	26.36	24.93	25.04	27.99
	50	30.51	31.33	27.03	27.02	26.67
	100	29.47	28.52	28.54	28.26	27.43

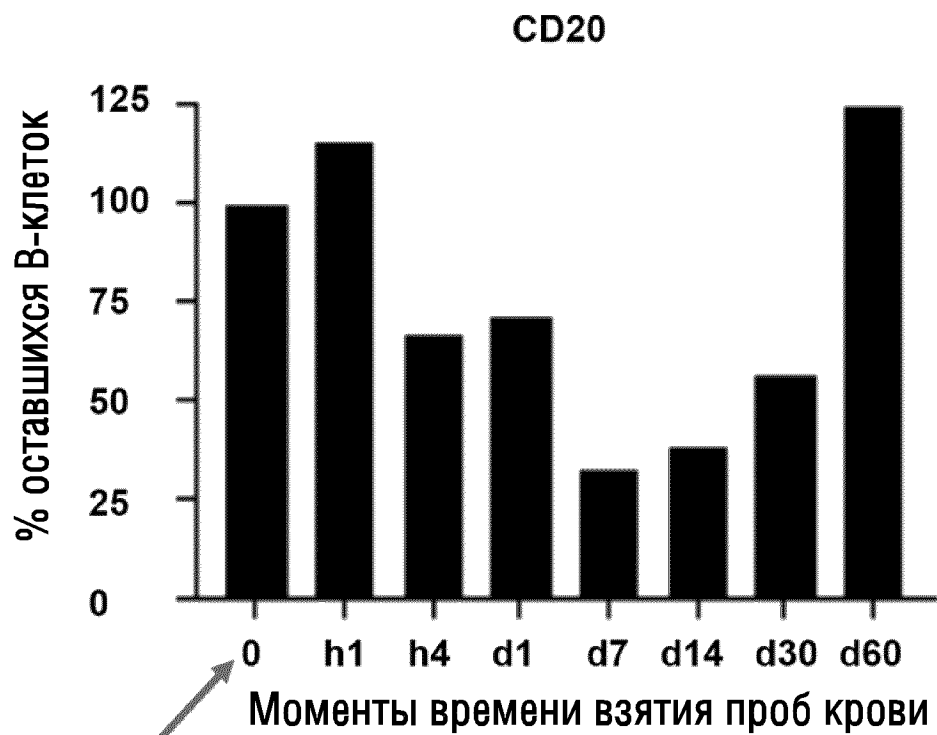
ФИГ.32В

		UDP-Gal (mM)				
		0	1	5	10	20
Обх-αGT (мкг/мл)	0	1	0.9	1.028	2.224	6.006
	10	0.7	1.875	11.77	21.44	16.36
	25	1.402	2.383	13.02	21.46	20.94
	50	1.14	1.6	12.35	22.72	26.24
	100	1.459	4.451	19.07	32.05	28.85

ФИГ.32С

		UDP-Gal (mM)				
		0	1	5	10	20
Obx- α GT (мкг/мл)	0	100%	99%	89%	81%	41%
	10	73%	37%	5%	5%	4%
	25	77%	27%	8%	16%	18%
	50	91%	57%	45%	41%	23%
	100	99%	60%	68%	50%	34%

ФИГ.33



Число исходных клеток на время 0 = 100%