

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046795**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.23</p> <p>(21) Номер заявки
202090583</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2018.09.21</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/555</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61K 45/00</i> (2006.01)
<i>A61K 47/54</i> (2017.01)
<i>A61K 51/04</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ А33 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В РАДИОИММУНОТЕРАПИИ**

- | | |
|--|--|
| <p>(31) 62/562,373; 62/562,374</p> <p>(32) 2017.09.23</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2020.08.14</p> <p>(86) PCT/US2018/052253</p> <p>(87) WO 2019/060750 2019.03.28</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕМОРИАЛ СЛОУН КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТР (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
У Чжихао, Сюй Хун, Чун Най-Кун
(US)</p> <p>(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)</p> | <p>(56) WO-A2-2016130539
KING et al. "Preparation and Precinical Evaluation of Humanised A33 Immunoconjugates for Radioimmunotherapy," British Journal of Cancer, 01 December 1995 (01.12.1995), Vol. 72, No. 6, Pgs. 1364-1372. entire document
US-B1-6307026
WO-A1-2016164308
US-A1-20020062009
WO-A1-2016054005</p> |
|--|--|

- (57) Настоящее изобретение в целом относится к композициям на основе иммуноглобулинов (например, антителам или их антиген-связывающим фрагментам), которые могут связываться и нейтрализовать активность белка А33. Антитела согласно технологии по настоящему изобретению применимы в способах обнаружения и лечения А33-положительного рака у нуждающегося в этом субъекта.

046795

B1

046795
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной заявке на патент США № 62/562,373, поданной 23 сентября 2017 г., а также предварительной заявке на патент США № 62/562,374, поданной 23 сентября 2017 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Технология согласно настоящему изобретению в целом относится к получению композиций на основе иммуноглобулинов (например, антител или их антиген-связывающих фрагментов), которые специфично связываются с белком A33, и к применению указанных композиций. В частности, технология согласно настоящему изобретению относится к получению нейтрализующих A33 антител и их применению для обнаружения и лечения ассоциированных с A33 типов рака.

Уровень техники

Следующее далее описание уровня техники приведено исключительно для облегчения понимания технологии согласно настоящему изобретению и не предназначено для описания или формирования предшествующего уровня техники для технологии согласно настоящему изобретению.

Колоректальный рак (colorectal cancer, CRC) является третьей ведущей причиной смертности от рака в США (Siegel RL, Miller KD, Jemal A, CA: A Cancer Journal for Clinicians 67:7-30 (2017)) и составляет 10% у мужчин и 9,2% у женщин от всех типов рака в мире (Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al., International Journal of Cancer 136:E359-E386 (2015)). Несмотря на устойчивое ежегодное снижение частоты случаев указанного типа рака на 3% с 2004 по 2013 гг., в 2017 ожидается 135000 новых случаев только в США. Несмотря на то что локальные и регионарные заболевания могут быть излечимыми, для метастатических CRC (mCRC) наблюдается плохой прогноз с частотой выживаемости в течение 5 лет, составляющей только 14% (Siegel RL, Miller KD, Jemal A, CA: A Cancer Journal for Clinicians 67:7-30 (2017)).

Стандартное лечение для mCRC состоит из химиотерапии в комбинации с моноклональными антителами, которые блокируют опухолевые сигнальные пути или ангиогенез. На сегодняшний день четыре лекарственных средства на основе моноклональных антител одобрены для лечения CRC Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and drug administration, FDA): бевацизумаб и рамицирумаб нацелены на путь ангиогенеза VEGF-VEGFR, тогда как цетуксимаб и панитумумаб нацелены на путь EGFR. Однако цетуксимаб и панитумумаб не обеспечивают клинических благоприятных эффектов в случае mCRC с мутациями RAS (Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al, Annals of Oncology 27:1386-1422 (2016)), которые обнаруживаются примерно в 40% всех случаев mCRC (Bencsikova B, Bortlicek Z, Halamkova J, et al., BMC Gastroenterology 15:37 (2015)). Более того, использование указанных антител приводит в целом к умеренному улучшению выживаемости (Peeters M et al, Journal of Clinical Oncology 28:4706-4713 (2010); Cutsem EV et al, Journal of Clinical Oncology 29:2011 - 2019 (2011); Saltz LB et al, Journal of Clinical Oncology 26:2013-2019 (2008)) и может быть связано с тяжелыми побочными эффектами. Благоприятный эффект ингибиторов контрольных точек иммунитета (immune checkpoint inhibitors, ICI) ограничивался подгруппой пациентов, страдающих CRC с микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability, MSI). Однако для большинства пациентов, страдающих mCRC, характерен статус микросателлитной стабильности (microsatellite stability, MSS), в связи с чем указанные пациенты предположительно не будут иметь благоприятного эффекта от монотерапии ICI. На сегодняшний день успешность применения антител для доставки токсинов в опухоли, например, радиоиммунотерапии (РИТ) с непосредственно конъюгированными антителами, ограничивается отчасти субоптимальной дозой в опухолевых тканях и субоптимальным терапевтическим индексом (ТИ). Кроме того, побочный токсический эффект в отношении нормальных тканей исключает возможность увеличения дозы, в связи с чем такая терапия приводит к ограниченному противоопухолевому эффекту.

Краткое описание технологии согласно настоящему изобретению

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H) и переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где (a) V_H содержит последовательность CDR1 V_H FTFSTYDMS (SEQ ID NO: 37), последовательность CDR2 V_H TISSGGSYTYLDSVKG (SEQ ID NO: 38), и последовательность CDR3 V_H TTVVPFAY (SEQ ID NO: 39) и/или (b) V_L содержит последовательность CDR1 V_L , последовательность CDR2 V_L и последовательность CDR3 V_L , выбранные из группы, состоящей из: KASQNVRTVVA (SEQ ID NO: 40), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42); KASQNVRTVVA (SEQ ID NO: 40), LASDRHT (SEQ ID NO: 43) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42); KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QHWSYPLT (SEQ ID NO: 45); и KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42).

Антитело может дополнительно содержать Fc-фрагмент иммуноглобулина изотипа, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD и IgE. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1, содержащую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и K322A. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4, содержащую мутацию S228P. Согласно конкретным вариантам реализации изо-

обретения, антиген-связывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fab', scF_v и F_v. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело или биспецифичное антитело. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела связывается с эпитопом белка A33, содержащим по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, или ее вариант, содержащий одну или более консервативных аминокислотных замен; и/или аминокислотную последовательность легкой цепи (LC), содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, или ее вариант, содержащий одну или более консервативных аминокислотных замен. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность HC и аминокислотную последовательность LC, выбранную из группы, состоящей из:

- SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H1/L1);
- SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H1/L2);
- SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H2/L1);
- SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H2/L2);
- SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17 (huA33-IgG1 (H2L2));
- SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21 (huA33-BsAb);
- SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (клон 31);
- SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (клон 32);
- SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (клон 48);
- SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (клон 49);
- SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (клон 53);
- SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (клон 56);
- SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (клон 57);
- SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 60 (huA33-huC825); и
- SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 (huA33-mC825), соответственно.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает антитело, содержащее (а) последовательность переменного домена легкой цепи иммуноглобулина, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности переменного домена легкой цепи иммуноглобулина, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 17, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 60 или 63; и/или (б) последовательность переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 15, 19, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 58 или 62.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает антитело, содержащее (а) последовательность LC, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности LC, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 17, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 60 или 63; и/или (б) последовательность HC, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности HC, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 15, 19, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 58 или 62.

Согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или биспецифичное антитело. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1, содержащую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и K322A. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело согласно технологии по настоящему изобретению содержит константную область IgG4, содержащую мутацию S228P. Согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, антитело связывается с эпитопом белка A33, содержащим по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эпитоп представляет собой конформационный эпитоп. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело согласно технологии по настоящему изобретению не содержит α-1,6-фукозную модификацию. Согласно одному аспекту, настоящее изобретение

обеспечивает рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую антитела, описанные в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 7, 8, 11, 12, 16, 18, 20, 22, 59 и 61.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина или вектор, содержащие любую из рекомбинантных последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в настоящей заявке.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела согласно технологии по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, где указанные антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела необязательно конъюгированы с агентом, выбранным из группы, состоящей из изотопов, красителей, хромогенов, контрастирующих агентов, лекарственных средств, токсинов, цитокинов, ферментов, ингибиторов ферментов, гормонов, антагонистов гормонов, факторов роста, радионуклидов, металлов, липосом, наночастиц, РНК, ДНК или любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифичного антитела согласно технологии по настоящему изобретению, указанное биспецифичное антитело связывается с Т-клетками, В-клетками, миелоидными клетками, плазматическими клетками или тучными клетками. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело связывается с CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, гамма/дельта-TCR, NKp46, KIR или низкомолекулярным DOTA-гаптеном. Низкомолекулярный DOTA-гаптен может быть выбран из группы, состоящей из

DOTA,
 DOTA-Bn,
 DOTA-десферриоксиамина,
 DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂,
 Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂,
 DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂;
 DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂,
 DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂,
 DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂,
 DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂,
 Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH₂,
 Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂,
 Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH₂,
 Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂,
 DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂,
 (Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH₂,
 Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂,
 (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂,
 Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH₂,
 Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂,
 Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ и
 Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения ассоциированного с А33 рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность HC и аминокислотную последовательность LC, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H1/L1); SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H1/L2); SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H2/L1); SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H2/L2); SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17 (huA33-IgG1 (H2L2)); SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21 (huA33-BsAb); SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (клон 31); SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (клон 32); SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (клон 48); SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (клон 49); SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (клон 53); SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (клон 56); SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (клон 57), SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 60 (huA33-huC825); и SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 (huA33-mC825) соответственно, где указанное антитело специфично связывается и нейтрализует активность белка А33.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, ассоциированный с А33 рак представляет собой колоректальный рак, псевдомиксому брюшины, рак аппендикса, рак поджелудочной железы или рак желудка. Ассоциированный с А33 рак может представлять собой колоректальный рак с генотипом MSI или генотипом MSS. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, колоректальный рак связан с мутацией KRAS G12D или мутацией p53. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации способа, антитело

вводят субъекту отдельно, последовательно или одновременно с дополнительным терапевтическим агентом. Примеры дополнительных терапевтических агентов включают один или более из алкилирующих агентов, агентов на основе платины, таксанов, агентов на основе барвинка, антиэстрогеновых лекарственных средств, ингибиторов ароматазы, подавляющих функцию яичников агентов, ингибиторов VEGF/VEGFR, ингибиторов EGF/EGFR, ингибиторов PARP, цитостатических алкалоидов, цитотоксических антибиотиков, антиметаболитов, эндокринных/гормональных агентов, агентов бисфосфонатной терапии.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ обнаружения (выявления) опухоли у субъекта *in vivo*, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества антитела согласно технологии по настоящему изобретению, где указанное антитело сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей A33, и является меченным радиоизотопом; и (b) обнаружение наличия опухоли у субъекта путем детектирования уровня радиоактивности антитела, превышающего контрольное значение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, у субъекта диагностирован или подозревается рак. Уровень радиоактивности, испускаемой антителом, может быть выявлен с применением позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ также включает введение субъекту эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антитело согласно технологии по настоящему изобретению, конъюгированное с радионуклидом. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, радионуклид представляет собой испускающий альфа-частицы изотоп, испускающий бета-частицы изотоп, радионуклид, испускающий оже-электроны, или любую их комбинацию. Примеры испускающих бета-частицы изотопов включают ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu и ^{67}Cu . Согласно некоторым вариантам реализации способа, неспецифичное FcR-зависимое связывание в нормальных тканях устраняется или снижается (например, благодаря мутации N297A в области Fc, которая приводит к агликозильрованию).

Кроме того, в настоящей заявке описаны наборы для обнаружения и/или лечения ассоциированных с A33 типов рака, содержащие по меньшей мере одну композицию на основе иммуноглобулина согласно технологии по настоящему изобретению (например, любое антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, описанные в настоящей заявке) или ее функциональный вариант (например, содержащий замену вариант) и инструкции по применению. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, композиция на основе иммуноглобулина соединена с одной или более поддающимися обнаружению метками. Согласно одному варианту реализации изобретения, одна или более подающихся обнаружению меток включают радиоактивную метку, флуоресцентную метку или хромогенную метку.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, набор также содержит вторичное антитело, которое специфично связывается с композицией на основе иммуноглобулина против A33, описанной в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, вторичное антитело связано по меньшей мере с одной подающейся обнаружению меткой, выбранной из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуоресцентной метки или хромогенной метки.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ обнаружения солидных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое связывается с указанным радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном A33, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в солидной опухоли, экспрессирующей антиген A33, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса; и (b) обнаружение наличия солидных опухолей у субъекта путем детектирования уровня радиоактивности комплекса, превышающего контрольное значение.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ выбора субъекта для претаргетной радиоиммунотерапии, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое связывается с указанным радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном A33, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в солидной опухоли, экспрессирующей антиген A33, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса; (b) детектирование уровня радиоактивности комплекса и (c) выбор для проведения претаргетной радиоиммунотерапии субъекта, у которого уровень радиоактивности комплекса превышает контрольное значение.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ повышения чувствительности опухоли к лучевой терапии у субъекта, у которого диагностирован A33-положительный рак, включающий введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое распознает и связывается с указанным радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном A33-мишенью, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое распознает и связывается с радиоактивно меченным DOTA-гаптеном и антигеном A33-мишенью, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса.

Согласно любому из приведенных выше вариантов реализации способов, описанных в настоящем изобретении, комплекс вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интратекально, интракаспулярно, внутриглазнично, внутрикожно, внутрибрюшинно, транстрахеально, подкожно, интрацеребровентрикулярно, перорально или интраназально. Согласно некоторым вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, субъект представляет собой человека. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно любому из приведенных выше вариантов реализации способов, описанных в настоящем изобретении, радиоактивно меченный DOTA-гаптен включает ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{255}Fm , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{68}Ga , ^{227}Th или ^{64}Cu и необязательно содержит испускающий альфа-частицы изотоп, испускающий бета-частицы изотоп или радионуклид, испускающий оже-электроны.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ повышения чувствительности опухоли к лучевой терапии у субъекта, у которого диагностирован A33-положительных рак, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению, где указанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень; и (б) введение указанному субъекту эффективного количества радиоактивно меченного DOTA-гаптена, где указанный радиоактивно меченный DOTA-гаптен сконструирован с возможностью связывания с биспецифичным антителом против DOTA-гаптена. Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению, где указанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень; и (б) введение указанному субъекту эффективного количества радиоактивно меченного DOTA-гаптена, где указанный радиоактивно меченный DOTA-гаптен сконструирован с возможностью связывания с биспецифичным антителом против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы согласно технологии по настоящему изобретению дополнительно включают введение указанному субъекту эффективного количества обеспечивающего клиренс агента до введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно любому из приведенных выше вариантов реализации способов, описанных в настоящем изобретении, радиоактивно меченный DOTA-гаптен содержит ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{255}Fm , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{68}Ga , ^{227}Th или ^{64}Cu и необязательно содержит испускающий альфа-частицы изотоп, испускающий бета-частицы изотоп или радионуклид, испускающий оже-электроны. Согласно любому из приведенных выше вариантов реализации способов, описанных в настоящей заявке, субъект представляет собой человека.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1(A) показан дизайн и конструкция гуманизированного биспецифичного антитела против A33 (huA33-BsAb). На фиг. 1(B) показано исследование стабильности очищенного huA33-BsAb методом "ускоренного старения" при температуре 37°C в течение 4 недель. На фиг. 1(C) показан анализ huA33-BsAb с помощью поверхностного плазмонного резонанса (НПР) при температуре 25°C и 37°C. Полученные данные приводили к модели связывания 1:1. На фиг. 1(D) показано окрашивание различных опухолевых клеточных линий и активированных Т-клеток с помощью метода сортировки клеток с активированной флуоресценцией (fluorescence-activated cell sorting, FACS). Значения средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) представляют собой геометрическое среднее.

На фиг. 2(A) показана активация маркеров CD25 и CD69 на Т-клетках через 24 часа после инкубирования с клетками Colo205 и различными антителами. На фиг. 2(B) показана количественная оценка делящихся клеток на основе разведения красителя карбоксифлуоресцеинсукцинимидилового эфира (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE) через 96 часов после инкубирования с клетками Colo205 и различными антителами.

На фиг. 2(C) показаны типичные изображения для фиг. 2(B). На фиг. 2(D) показано окрашивание клеток CD45RO через 96 часов после инкубирования с клетками Colo205 и huA33-BsAb в независимом эксперименте. На фиг. 2(E) показана стимулированная huA33-BsAb *in vivo* активация и пролиферации Т-клеток. Вкратце, CFSE-меченные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) смешивали с клетками Colo205 и полученную смесь имплантировали подкожно мышам DKO. На следующий день

проводили внутривенную инъекцию huA33-BsAb и опухоли выделяли через 4 дополнительных дня и анализировали с помощью FACS-анализа.

На фиг. 3 показан профиль секретируемых цитокинов и цитотоксических компонентов активированных huA33-BsAb Т-клеток в присутствии опухоли-мишени. Кинетика продукции цитокинов и цитолитических молекул Т-клетками в присутствии huA33-BsAb и клеток-мишеней Colo205 или клеток отрицательного контроля SKMEL5 определяли в течение 4 дней. Поскольку SKMEL5 секретируют большое количество IL-6, супернатант от Т-клеток, инкубированных с клетками Colo205 в отсутствие антитела, использовали в качестве отрицательного контроля в эксперименте кинетики IL-6.

На фиг. 4(A) показана вызванная huA33-BsAb цитотоксичность в отношении различных опухолевых клеточных линий-мишеней и контрольных клеток. Активированные Т-клетки применяли в качестве эффекторных клеток с отношением эффектор:мишень (Е:Т), составляющим 10:1. Клетки инкубировали в течение 16 часов перед считыванием данных. На фиг. 4(B) показана цитотоксичность в отношении клеток Colo205, вызванная huA33-BsAb. Отсортированные свежие субпопуляции Т-клеток применяли в качестве эффекторных клеток (Е:Т=5:1). Клетки инкубировали в течение 48 часов перед проведением считывания. ЕС50 для CD4 Т-клеток памяти составляла 25 пкМ.

На фиг. 5(A) показано краткое описание аффинного созревания huA33 (H2L2) с использованием дрожжевого скрининга. На фиг. 5 (B) показано краткое описание K_D исходного и аффинно созревшего huA33-BsAb (сверху) и карта скорости ассоциации/диссоциации для различных huA33-BsAb, полученная из ППР-анализа (снизу). На фиг. 5(C) показаны результаты анализа зависимой от Т-клеток цитотоксичности (Т-cell dependent cellular cytotoxicity, TDCC) исходного и аффинно созревшего huA33-BsAb.

На фиг. 6(A) показан рост опухоли LS174Т при подкожном введении клеток в лечебной группе и контрольных группах. Размеры опухолей оценивали по объему ($p=0,0133$ для группы "опухоль+sc МКПК" по сравнению с группой "опухоль+sc МКПК+huA33-BsAb"; $p=0,006$ для группы "только опухоль" по сравнению с группой "опухоль+sc МКПК+huBsAb-BsAb"). На фиг. 6(B) показан рост опухоли LS174Т при внутрибрюшинном введении клеток в лечебной группе и контрольных группах (сверху) ($p=0,0125$ для группы "опухоль+АТС" по сравнению с группой "опухоль+АТС+huA33-BsAb"; $p=0,0026$ для группы "только опухоль" по сравнению с группой "опухоль+АТС+huBsAb-B3Ab") и выживаемость мышей в лечебной группе и контрольных группах (снизу). На фиг. 6(C) показаны люминесцентные изображения опухоли LS174Т при абдоминальном введении клеток в различных группах. Группа "только опухоль" включала одну мышь (#4), у которой не наблюдалось приживления опухоли через 21 день и которая была исключена из анализа.

На фиг. 7(A) показаны люминесцентные изображения, демонстрирующие рост опухоли Colo205 при подкожном введении клеток в различных группах. На фиг. 7(B) показана количественная оценка сигналов из фиг. 7(A) (сверху) и выживаемости мышей из различных групп из фиг. 7(A) (снизу). На фиг. 7(C) показаны люминесцентные изображения опухоли SW1222 при внутрибрюшинном введении клеток; мышь #1 из группы "только опухоль" и мышь #3 из группы "опухоль+АТС", у которых не наблюдалось приживление опухоли через 21 день, были позднее исключены из анализов визуализации и не были включены в анализ выживаемости на фиг. 7(D). На фиг. 7(D) показана выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении клеток опухоли SW1222.

На фиг. 8(A) показан рост опухоли SNU16 при подкожном введении клеток в различные группы. На фиг. 8(B) показано приживление клеток человека из крови мышей с фиг. 8(A).

На фиг. 9 показан анализ с помощью НИР 4 вариантов гуманизированных антител против А33. Все антитела содержали константный домен IgG1. 3A3-H1L1, 3A3-H1L2, 3A3-H2L1 и 3A3-H2L2 представляли собой 4 варианта гуманизированных 3A3. 3A3-chA33 представляло собой химерное 3A3.

На фиг. 10 показаны результаты FACS-анализа различных клеточных линий, окрашенных huA33-BsAb.

На фиг. 11(A) показана стимуляция PD-1 на Т-клетках, активированных huA33-BsAb в присутствии клеток Colo205 через 24 часа (слева) и 96 часов (справа). На фиг. 11 (B) показано отсутствие деления Т-клеток после инкубирования с клетками SKMEL5 в присутствии huA33-BsAb через 96 часов. На фиг. 11(C) показана активация деления Т-клеток с помощью huA33-BsAb в присутствии клеток LS174Т. На фиг. 11(B) и 11(C) использовали одинаковые препараты Т-клеток.

На фиг. 12(A) и 12(B) показана окраска маркеров CD45RO и CD25 на Т-клетках через 48 часов после инкубирования с клетками Colo205 в присутствии различных антител. Клетки получали из TDCC-анализа после использования супернатанта для измерения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Фиг. 12(A): селекция CD4(+) Т-клеток; Фиг. 12(B): селекция CD8(+) Т-клеток.

На фиг. 13 показана стратегия для быстрого преобразования scFv в формат huA33-BsAb. Вектор экспрессии (1) линеаризовали с помощью рестриктаз HindIII/ApaI. Промоторный фрагмент (3) готовили из переваренного SapI содержащего промотор вектора. Как вектор, так и промоторный фрагмент могут быть получены в большом количестве для более высокопроизводительного клонирования. V_H (4) и V_L (2) амплифицировали непосредственно из дрожжей с использованием двух 5' праймеров для добавления лидерных последовательностей и расщепляли с помощью HindIII/SapI (VL) или ApaI/SapI (VH). 4 фрагмента лигировали в ходе одноэтапной реакции.

На фиг. 14 показаны аминокислотные последовательности доменов V_H и V_L мышинового антитела против A33 и соответствующие им гомологичные последовательности человека (SEQ ID NO: 1-4). Области доменов CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и V_L мышинового антитела против A33 обозначены подчеркнутым полужирным шрифтом.

На фиг. 15 показаны аминокислотные последовательности гуманизированных тяжелых цепей huA33-H1 (3A3-H1) (SEQ ID NO: 5) и huA33-H2 (3A3-H2) (SEQ ID NO: 6). Области CDR1, CDR2 и CDR3 3A3-H1 и 3A3-H2 обозначены подчеркнутым полужирным шрифтом.

На фиг. 16 показаны последовательности кДНК гуманизированных тяжелых цепей huA33-H1 (3A3-H1) (SEQ ID NO: 7) и huA33-H2 (3A3-H2) (SEQ ID NO: 8).

На фиг. 17 показаны аминокислотные последовательности гуманизированных легких цепей huA33-L1 (3A3-L1) (SEQ ID NO: 9) и huA33-L2 (3A3-L2) (SEQ ID NO: 10). Области CDR1, CDR2 и CDR3 3A3-L1 и 3A3-L2 обозначены подчеркнутым полужирным шрифтом.

На фиг. 18 показаны последовательности кДНК гуманизированных легких цепей huA33-L1 (3A3-L1) (SEQ ID NO: 11) и huA33-L2 (3A3-L2) (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 19 показано выравнивание исходных гуманизированных последовательностей hA33 в соответствии с источником King et al. (1995), выше, по сравнению с заново ре-гуманизированными последовательностями huA33 (3A3).

На фиг. 20 показана кинетика связывания гуманизированных вариантов IgG huA33, которые анализировали на предмет связывания с рекомбинантным белком GPA33 с применением ППП (Biacore T100). Все четыре варианта сохраняли высокую аффинность связывания химерного A33 (chA33).

На фиг. 21 показана кинетика связывания исходного гуманизированного hA33 (в биспецифичном формате hA33-mC825, как описано в источнике Cheal et al, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 43:925-937 (2016)) по сравнению с huA33 (3A3-H2L2) по результатам анализа связывания с рекомбинантным белком GPA33 с применением ППП (Biacore T100). Исходное гуманизированное hA33 утрачивало значительную степень аффинности по сравнению с huA33.

На фиг. 22 показана кинетика связывания исходного гуманизированного hA33 (в биспецифичном формате hA33-mC825, как описано в источнике Cheal et al, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 43:925-937 (2016)) по сравнению с huA33 (3A3-H2L2) по результатам анализа связывания с рекомбинантным белком GPA33 с применением ППП (Biacore T100). Исходное гуманизированное hA33 утрачивало значительную степень аффинности по сравнению с huA33.

На фиг. 23 показан анализ гуманизирования последовательностей тяжелых и легких цепей huA33 (3A3-H1, 3A3-H2, 3A3-L1, 3A3-L2) и исходных последовательностей hA33. Поскольку все четыре гуманизированных варианта сохраняли высокую аффинность связывания исходного chA33, вариант H2L2 была выбран для дальнейшей разработки на основании его более высокого T20-оценки гуманизирования.

На фиг. 24 показаны аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи химерного chA33-IgG1, которые соответствуют SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 соответственно.

На фиг. 25 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи huA33-IgG1 (H2L2), которые соответствуют SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно.

На фиг. 26 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи huA33-IgG1 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно.

На фиг. 27 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи биспецифичных антител huA33-BsAb-рекрутеров Т-клеток, которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 соответственно.

На фиг. 28 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи биспецифичных антител huA33-BsAb-рекрутеров Т-клеток, которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 29 показано краткое описание потенциальных модификаций биспецифичных антител huA33-BsAb-рекрутеров Т-клеток, описанных в настоящем изобретении.

На фиг. 30 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 31 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 31 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 32 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 32 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 48 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 33 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 49 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 34 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 53 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 35 показаны аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи аффинно-созревшего клона 56 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 36 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи аффинно-созревшего клона 57 в формате huA33-BsAb, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 37 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи биспецифичных антител huA33-huC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно.

На фиг. 38 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи биспецифичных антител huA33-huC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61, соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 39 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи и легкой цепи биспецифичных антител huA33-mC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 соответственно. Подчеркнутые последовательности соответствуют линкерным последовательностям GS.

На фиг. 40 показаны результаты оценки биораспределения *ex vivo* для анализа таргетинга в отношении GPA33-положительного (GPA33(+)) ксенотрансплантата колоректального рака человека у мышей, содержащих подкожно введенные ксенотрансплантаты колоректального рака человека GPA33(+) SW1222, которым проводили лечение регуманизированным биспецифичным антителом huA33-DOТА, описанным в настоящем изобретении, и индикаторными дозами ¹⁷⁷Lu-ООТА-биотина.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что конкретные аспекты, типы, варианты реализации, вариации и признаки способов согласно настоящему изобретению, описанные ниже с разной степенью подробности, приведены для фактического понимания технологии согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение в целом обеспечивает композиции на основе иммуноглобулинов (например, антитела или их антиген-связывающие фрагменты), которые могут специфично связываться и нейтрализовать биологическую активность полипептидов А33. Композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению применимы в способах обнаружения или лечения ассоциированных с А33 типов рака у нуждающегося в этом субъекта. Соответственно, различные аспекты способов согласно настоящему изобретению относятся к получению, характеристике и манипуляциям с антителами против А33. Композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению можно применять отдельно или в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиция на основе иммуноглобулина представляет собой гуманизированные антитело, химерное антитело или биспецифичное антитело.

При практическом осуществлении способов согласно настоящему изобретению используются многие стандартные методы молекулярной биологии, белковой биохимии, клеточной биологии, иммунологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК. См., например, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*, the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London) и Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*. Способы обнаружения и измерения уровня продуктов экспрессии генов полипептидов (т.е. уровня

трансляции генов) хорошо известны в данной области техники и включают использование методов обнаружения полипептидов, таких как методы обнаружения и количественной оценки антител (см. также Strachan & Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition., John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999).

Определения.

Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, в целом имеют такое же значение, как общепринятое значение для специалистов в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Употребление предметов в единственном числе в настоящем изобретении прилагаемой формуле изобретения включает множественное число указанных предметов, если иное явно не следует из контекста. Например, ссылка на "клетку" включает комбинацию двух или более клеток и т.д. В целом, номенклатура, используемая в настоящем изобретении, и лабораторные процедуры по клеточному культивированию, молекулярной генетике, органической химии, аналитической химии, химии нуклеиновых кислот и гибридизации нуклеиновых кислот, описанные ниже, хорошо известны и обычно используются в данной области техники.

При использовании в настоящем изобретении термин "примерно" со ссылкой на число в целом включает числа, которые находятся в пределах 1%, 5% или 10%-ного диапазона от указанного числа (в любую сторону, больше или меньше), если иное не указано или не следует из контекста (за исключением случаев, когда такое число составляет менее 0% или превышает 100% от возможного значения).

При использовании в настоящем изобретении "введение" агента или лекарственного средства субъекту включает любой способ введения или доставки субъекту соединения для осуществления его предполагаемой функции. Введение можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, включая, но не ограничиваясь указанными, пероральное, интраназальное, парентеральное (внутривенное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное или подкожное), ректальное, интратекальное, внутриопухолевое или местное введение). Введение включает самостоятельное введение и введение с помощью другого субъекта.

Термин "адъювант" относится к одному или более веществам, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант применяется для усиления иммунного ответа на один или более вакцинальных антигенов или антител. Адъювант можно вводить субъекту до, в комбинации или после введения вакцины. Примеры химических соединений, применяемых в качестве адъювантов, включают соединения алюминия, масла, блок-полимеры, стимулирующие иммунную систему комплексы, витамины и минералы (например, витамин E, витамин A, селен и витамин B12), Quil A (сапонины), компоненты оболочки бактериальной и грибковой клетки (например, липополисахариды, липопотеины и гликопротеины), гормоны, цитокины и костимулирующие факторы.

При использовании в настоящем изобретении термин "антитело" в общем относится к иммуноглобулинам или иммуноглобулин-подобным молекулам, включая, например, но не ограничиваясь указанными, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, их комбинации и сходные молекулы, продуцируемые во время иммунного ответа у любого позвоночного, например, у млекопитающего, такого как человек, коза, кролик и мышь, а также у видов, не являющихся млекопитающими, например, иммуноглобулины акулы. При использовании в настоящем изобретении "антитела" (включая интактные иммуноглобулины) и "антиген-связывающие фрагменты" специфично связываются с интересующей молекулой (или группой интересующих молекул с высокой степенью подобия) по существу с отсудим связывания с другими молекулами (например, антителами и фрагментами антител, которые имеют константу связывания для интересующей молекулы, превышающую по меньшей мере на $10^3 M^{-1}$, по меньшей мере на $10^4 M^{-1}$ или по меньшей мере $10^5 M^{-1}$ константу связывания для других молекул в биологическом образце). Термин "антитело" также включает генетически сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышинные антитела), антитела-гетероконъюгаты (такие как биспецифичные антитела). См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Рокфоррд, Иллинойс); Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997.

Более конкретно, антитело относится к полипептидному лиганду, содержащему по меньшей мере вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина или вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая специфично распознает и связывается с эпитопом антигена. Антитела состоят из тяжелой и легкой цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, называемую вариабельной областью тяжелой цепи (V_H) и вариабельной областью легкой цепи (V_L). Вместе область V_H и область V_L отвечают за связывание с антигеном, распознаваемым антителом. Как правило, иммуноглобулин содержит тяжелые (H) цепи и легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Существуют два типа легких цепей, лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изоформ), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и вариабельную область (области также известны как "домены"). В комбинации вариабельные области тяжелых и легких цепей специфично связываются с антигеном. Вариабельные области легкой и тяжелой цепи содержат "каркасную" область, которая прерывается тремя гипервариабельными областями, также называемым "определяющими комплементарность областями", или "CDR". Размеры каркасной области и CDR были определены (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services,

1991, который включен в настоящую заявку посредством ссылки). База данных Kabat сейчас поддерживается в режиме online. Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей являются относительно консервативными в пределах вида. Каркасные области антитела, которые включают каркасные области, составляющие легкую и тяжелую цепи, в значительной степени принимают β -складчатую конформацию, а области CDR образуют петли, которые соединяются с β -складчатой структурой, а в некоторых случаях образуют ее часть. Таким образом, каркасные области функционируют в качестве скаффолда, который обеспечивает расположение областей CDR в правильной ориентации с помощью внутрцепочечных нековалентных взаимодействий.

Области CDR главным образом отвечают за связывание с эпитопом антигена. Области CDR каждой цепи, как правило, называются CDR1, CDR2 и CDR3, с последовательной нумерацией, начиная с N-конца, и также, как правило, включают идентификацию по цепи, в которой расположена конкретная CDR. Таким образом, CDR3 V_H расположен в варибельном домене тяжелой цепи антитела, в которой она обнаруживается, тогда как CDR1 V_L представляет собой CDR1 из варибельного домена легкой цепи антитела, в котором она обнаруживается. Антитело, которое связывается с белком A33, имеет специфичную последовательность областей V_H и V_L и, таким образом, специфичные последовательности CDR. Антитела с различными специфичностями (т.е. различными сайтами связывания для различных антигенов) имеют различные CDR. Несмотря на то что именно области CDR варьируют между антителами, только ограниченное число аминокислотных положений в пределах областей CDR непосредственно вовлечены в связывание антигена. Указанные положения в пределах областей CDR называются определяющими специфичность остатками (specificity determining residues, SDR). Термин "композиции на основе иммуноглобулинов" при использовании в настоящем изобретении относится к антителам (включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, рекомбинантные антитела, мультиспецифичные антитела, биспецифичные антитела и т.д.), а также фрагментам антител. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент специфично связывается с антигеном.

При использовании в настоящем изобретении термин "относящийся к антителам полипептид" означает связывающиеся с антигеном фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, которые могут содержать варибельную область (области) отдельно или в комбинации со всеми или частью следующих элементов полипептида: шарнирная область, домены CH_1 , CH_2 и CH_3 молекулы антитела. Технология также включает любые комбинации варибельной области (областей) и шарнирной области, доменов CH_1 , CH_2 и CH_3 . Относящиеся к антителам молекулы, применимые в способах согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются указанными, Fab, Fab' и $F(ab')_2$, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие домен V_L или V_H . Примеры включают: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и CH_1 ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и CH_1 ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). В связи с этим "фрагменты антитела" или "антиген-связывающие фрагменты" могут содержать часть полноразмерного антитела, в целом, его антиген-связывающую или варибельную область. Примеры фрагментов антител или антиген-связывающих фрагментов включают Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "биспецифичное антитело" или "BsAb" при использовании в настоящем изобретении относится к антителу, которое может связываться одновременно с двумя мишенями, которые имеют различную структуру, например, двумя различными антигенами-мишенями, двумя различными эпитопами на одном антигене-мишени или гаптенем и антигеном-мишенью или эпитопом на антигене-мишени. Множество разнообразных структур биспецифичных антител известно в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, каждый антиген-связывающий фрагмент биспецифичного антитела содержит области V_H и/или V_L ; согласно некоторым из таких вариантов реализации изобретения, области V_H и/или V_L представляют собой области, обнаруживаемые в конкретном моноклональном антителе. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело содержит два антиген-связывающих фрагмента, каждый из которых содержит области V_H и/или V_L из различных моноклональных антител. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело содержит два антиген-связывающих фрагмента, где один из двух указанных антиген-связывающих фрагментов содержит молекулу иммуноглобулина, имеющую участки V_H и/или V_L , содержащие области CDR из первого моноклонального антитела, и другой антиген-связывающий фрагмент содержит фрагмент антитела (например, Fab, $F(ab')$, $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, scFv и т.д.), содержащий участки V_H и/или V_L , которые содержат области CDR из второго моноклонального антитела.

При использовании в настоящем изобретении "обеспечивающий клиренс агент" представляет собой агент, который связывается с избыточным количеством биспецифичного антитела, которое при-

сутствует в крови субъекта, для обеспечения быстрого почечного клиренса. Применение обеспечивающего клиренс агента до введения гаптена (например, DOTA) способствует достижению лучшего отношения уровень в опухоли:фоновый уровень в системах претаргетной радиоиммунотерапии (ПРИТ). Примеры обеспечивающих клиренс агентов включают конъюгат 500 кДа декстран-DOTA-Bn(Y) (Orcutt et al, Mol Cancer Ther. 11(6): 1365-1372 (2012)), 500 кДа аминоконъюгат-DOTA, антитела против претаргетного антитела и т.д.

При использовании в настоящем изобретении термин "конъюгированы" относится к ассоциации двух молекул с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники. Подходящие типы ассоциации включают химические связи и физические связи. Химические связи включают, например, ковалентные связи и координационные связи. Физические связи включают, например, водородные связи, биполярные взаимодействия, Ван-дер-ваальсовы силы, электростатические взаимодействия, гидрофобные взаимодействия и ароматический стэкинг.

При использовании в настоящем изобретении термин "диатела" относится к малым фрагментам антитела с двумя антиген-связывающими сайтами, которые содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в той же полипептидной цепи ($V_H V_L$). Применение линкера, слишком короткого для возможности спаривания между двумя доменами на одной цепи, вынуждает домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антиген-связывающих сайта. Диатела описаны более подробно, например, в европейском патенте EP 404 097; публикации международной заявки WO 93/11161; и 30 Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

При использовании в настоящем изобретении термины "одноцепочечные антитела" или "одноцепочечный Fv (scFv)" относятся к молекуле слияния двух доменов Fv фрагмента антитела, V_L и V_H . Одноцепочечные молекулы антитела могут содержать полимер из нескольких отдельных молекул, например, представлять собой димер, тример или другие полимеры. Более того, несмотря на то, что два домена фрагмента F_v - V_L и V_H кодируются отдельными генами, их можно соединять с применением рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединяются с образованием моновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv (scFv)). Bird et al. (1988) Science 242:423-426, и Huston et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85:5879-5883. Такие одноцепочечные антитела могут быть получены с помощью рекомбинантных методов или ферментативного или химического расщепления интактных антител.

Любой из указанных выше фрагментов антитела получают с применением стандартных методов, известных специалисту в данной области техники, и указанные фрагменты подвергают такому же скринингу, как и интактные антитела, на предмет специфичности связывания и нейтрализации активности.

При использовании в настоящем изобретении термин "антиген" относится к молекуле, с которой антитело (его антиген-связывающий фрагмент) может селективно связываться. Антиген-мишень может представлять собой белок, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антиген-мишень может представлять собой полипептид (например, полипептид A33). Антиген также можно вводить животному для индукции у него иммунного ответа.

Термин "антиген-связывающий фрагмент" относится к фрагменту полноразмерной структуры иммуноглобулина, который содержит часть полипептида, ответственную за связывание с антигеном. Примеры антиген-связывающих фрагментов, применимых в технологии согласно настоящему изобретению, включают scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab' и F(ab')₂, но не ограничиваются указанными.

"Аффинность связывания" означает общую силу нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном или антигенным пептидом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может в целом быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, включая методы, описанные в настоящем изобретении. Комплекс с низкой аффинностью содержит антитело, которое в целом имеет тенденцию легко диссоциировать от антигена, тогда как высокоаффинный комплекс содержит антитело, которое в целом имеет тенденцию оставаться связанным с антигеном в течение более продолжительного времени.

При использовании в настоящем изобретении термин "биологический образец" означает материал образца, происходящий из живых клеток. Биологические образцы могут включать ткани, клетки, белковые или мембранные экстракты клеток и биологические жидкости (например, асцитную жидкость или спинномозговую жидкость (СМЖ)), выделенные из организма субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, присутствующие у субъекта. Биологические образцы согласно технологии по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными, образцы, взятые из ткани молочной железы, ткани почек, шейки матки, эндометрия, головы или шеи, желчного пузыря, ткани околушной железы, предстательной железы, мозга, гипофиза, ткани почек, мышцы, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, печени, селезенки, поджелудочной железы, ткани щитовидной железы, ткани сердца, ткани легкого, мочевого пузыря, жировой ткани, ткани лимфатического узла, матки, ткани яичника, ткани надпочечников, ткани семенника, миндалин, тимуса, крови, волос, рта, кожи, сыворотки, плазмы, СМЖ, спер-

мы, секрета предстательной железы, семенной жидкости, мочи, фекалий, пота, слюны, мокроты, слизи, костного мозга, лимфы и слезной жидкости. Биологические образцы также могут быть получены из материала биопсии внутренних органов или опухоли. Биологические образцы могут быть получены от субъектов для диагностики или исследования или могут быть получены от не страдающих заболеванием субъектов для применения в качестве контролей или для фундаментальных исследований. Образцы могут быть получены с помощью стандартных методов, включая, например, венепункцию и хирургическую биопсию. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, биологический образец представляет собой образец ткани молочной железы, легкого, толстой кишки или предстательной железы, полученный с помощью пункционной биопсии.

При использовании в настоящем изобретении термин "антитело с привитыми CDR" означает антитело, в котором по меньшей мере одна CDR-область антитела-"акцептора" замещена на CDR-"трансплантат" из антитела-"донора", обладающего желаемой антигенной специфичностью.

При использовании в настоящем изобретении термин "химерное антитело" означает антитело, в котором константная область Fc моноклонального антитела из одного вида (например, константная область Fc мыши) замещена на константную область Fc из антитела другого вида (например, константную область Fc человека) с применением технологий рекомбинантной ДНК. См., в целом, Robinson et al, международную заявку на патент PCT/US86/02269; Akira et al, заявку на европейский патент 184,187; Taniguchi, заявку на европейский патент 171,496; Morrison et al, заявку на европейский патент 173,494; Neuberger et al, публикацию международной патентной заявки WO 86/01533; Cabilly et al. патент США № 4,816,567; Cabilly et al, заявку на европейский патент 0125,023; Better et al, Science 240: 1041-1043, 1988; Liu et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol 139: 3521-3526, 1987; Sun et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218, 1987; Nishimura et al., Cancer Res 47: 999-1005, 1987; Wood et al., Nature 314: 446-449, 1885; и Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559, 1988.

При использовании в настоящем изобретении термин "консенсусный FR" означает каркасный участок (FR) антитела в консенсусной последовательности иммуноглобулина. FR-участки антитела не контактируют с антигеном.

При использовании в настоящем изобретении "контроль" представляет собой альтернативный образец, используемый в эксперименте для сравнения. Контроль может быть "положительным" или "отрицательным". Например, когда целью эксперимента является определение корреляции эффективности терапевтического агента при лечении конкретного типа заболевания, как правило, используется положительный контроль (соединение или композиция, которая, как известно, проявляет желаемый терапевтический эффект) и отрицательный контроль (субъект или образец, который не получает терапию или получает плацебо).

При использовании в настоящем изобретении термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для достижения желаемого терапевтического и/или профилактического эффекта, например, количеству, которое приводит к предотвращению или ослаблению заболевания или состояния, описанного в настоящей заявке, или одного или более признаков или симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, описанным в настоящей заявке. В контексте терапевтического или профилактического применения количество композиции, вводимой субъекту, будет варьировать в зависимости от состава, степени, типа и тяжести заболевания и от характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость лекарственных средств. Специалист в данной области техники сможет определить подходящие дозы в зависимости от указанных и других факторов. Композиции также можно вводить в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими соединениями. Согласно способам, описанным в настоящем изобретении, терапевтическую композицию можно вводить субъекту, имеющему один или более признаков или симптомов заболевания или состояния, описанного в настоящей заявке. При использовании в настоящем изобретении "терапевтически эффективное количество" композиции относится к уровню композиции, при котором физиологические эффекты заболевания или состояния ослабляются или устраняются. Терапевтически эффективное количество может водиться за одно или более введений.

При использовании в настоящем изобретении термин "эффекторная клетка" означает клетку иммунной системы, которая вовлечена в эффекторную фазу иммунного ответа, в отличие от когнитивной фазы и фазы активации иммунного ответа. Примеры клеток иммунной системы включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (например, В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, природные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, полиморфоядерные клетки, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Эффекторные клетки экспрессируют специфичные Fc-рецепторы и осуществляют специфичные иммунные функции. Эффекторная клетка может вызывать антитело-зависимую опосредованную клетками цитотоксичность (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC), как, например, нейтрофил, способный индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и лимфоциты, которые экспрессируют Fc α R, вовлечены в специфичное уничтожение клеток-мишеней и презентирование антигенов другим компонентам иммунной системы или связывание с клетками, презентирющими антигены.

При использовании в настоящем изобретении термин "эпитоп" означает белковую детерминанту,

способную специфично связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационный и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с конформационными эпитопами, в отличие от неконформационных эпитопов, устраняется в присутствии денатурирующих растворителей. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, "эпитоп" белка А33 представляет собой область белка, с которой специфично связываются антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эпитоп представляет собой конформационный эпитоп. Для скрининга антител против А33, которые связываются с эпитопом, можно проводить стандартный анализ перекрестного блокирования, такой как анализ, описанный в источнике: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Указанный анализ можно использовать для определения того, связывается ли антитело против А33 с тем же сайтом или эпитопом, что и антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению. В качестве альтернативы или дополнительно, картирование эпитопа можно осуществлять с помощью методов, известных в данной области техники. Например, последовательность антитела может быть подвержена мутагенезу, такому как сканирование аланином, для идентификации контактных остатков. В различных способах пептиды, соответствующие различным областям белка А33, можно использовать в конкурентных анализах с исследуемыми антителами или исследуемым антителом и антителом с охарактеризованным или известным эпитопом.

При использовании в настоящем изобретении термин "экспрессия" включает один или более из следующих процессов: транскрипция гена в мРНК-предшественник; сплайсинг и другой процессинг мРНК-предшественника с получением зрелой мРНК; стабилизация мРНК; трансляция зрелой мРНК в белок (включая использование кодонов и доступность тРНК); и, при необходимости, гликозилирование и/или другие модификации продукта трансляции для надлежащей экспрессии и функционирования.

При использовании в настоящем изобретении термин "ген" означает сегмент ДНК, который содержит всю информацию для регулируемого биосинтеза продукта РНК, включая промоторы, экзоны, интроны и другие нетранслируемые области, которые контролируют экспрессию.

"Гомология" или "идентичность" или "подобие" относится к подобию по последовательности между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновых кислот. Гомологию можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которые могут быть выровнены для сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, тогда молекулы являются гомологичными в этом положении. Степень гомологии между последовательностями представляет собой функцию количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. То, что полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида) имеет определенную процентную "идентичность по последовательности" с другой последовательностью (например, по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) означает, что при выравнивании указанный процент оснований (или аминокислот) является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Указанное выравнивание и процентную гомологию или идентичность по последовательности можно определить с применением программ, известных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, для выравнивания применяются параметры по умолчанию. Одна из программ выравнивания представляет собой BLAST, использующая параметры по умолчанию. В частности, программы представляют собой BLASTN и BLASTP с применением следующих параметров по умолчанию:

```
Genetic code=standart;
filter=none;
strand=both;
cutoff=60;
expect=10;
Matrix=BLOSUM62;
Descriptions=50 sequenses;
sort by=HIGH SCORE;
Data bases=non-redundant,
GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss Белок+SPupdate+PIR.
```

Детали указанных программ можно найти в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). Биологически эквивалентные полинуклеотиды представляют собой полинуклеотиды, имеющие определенную процентную гомологию и кодирующие полипептиды, имеющие одинаковую или сходную биологическую активность. Две последовательности считаются "неродственными" или "негомологичными", если они идентичны друг другу менее чем на 40% или менее чем на 25%.

При использовании в настоящем изобретении "гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. По большей

части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки гипервариабельной области антител-"акцептора" заменены на остатки гипервариабельной области антитела из вида, не представляющего собой человека (такого как мышь, крыса, кролик или не представляющий собой человека примат), имеющего желаемую специфичность, аффинность и емкость (антитела-"донора"). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, остатки каркасной области (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в антителе-"акцепторе" или антителе-"доноре". Такие модификации создают для дополнительного улучшения характеристик антител, таких как аффинность связывания. В целом, гуманизированное антитело содержит практически все из по меньшей мере одного, как правило, двух вариабельных доменов (например, Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv), в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все области FR являются областями консенсусной последовательности FR иммуноглобулина человека, несмотря на то что области FR могут содержать одну или более аминокислотных замен, повышающих аффинность связывания. Количество указанных аминокислотных замен в области FR, как правило, составляет не более 6 для H-цепи и не более 3 для L-цепи. Гуманизированное антитело необязательно может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op.Struct. Biol. 2:593-596 (1992). См., например, Ahmed & Cheung, FEBS Letters 588(2):288-297 (2014).

При использовании в настоящем изобретении термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область в целом содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области", или "CDR", (например, примерно в области остатков 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в V_L и примерно в области остатков 31-35B (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в V_H (Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или указанные остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в V_L и 26-32 (H1), 52A-55 (H2) и 96-101 (H3) в V_H (Chothia и Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))).

При использовании в настоящем изобретении термины "идентичный" или процентная "идентичность" при использовании в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или частичным последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент идентичных аминокислотных остатков или нуклеотидов, т.е. имеют идентичность в указанной области примерно на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более (например, нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящей заявке, или аминокислотная последовательность антитела, описанная в настоящей заявке), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в пределах окна сравнения или обозначенной области по результатам измерения с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или с помощью выравнивания вручную и визуальной оценки, например, с использованием веб-сайта NCBI). Такие последовательности затем называются "по существу идентичными". Этот термин также относится или может применяться к последовательности, комплементарной исследуемой последовательности. Термин также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, а также последовательности, которые имеют замены. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, идентичными являются области области длиной по меньшей мере приблизительно в 25 аминокислот или нуклеотидов или 50-100 аминокислот или нуклеотидов.

При использовании в настоящем изобретении термин "интактное антитело" или "интактный иммуноглобулин" означает антитело, которое содержит по меньшей мере два полипептида тяжелой (H) цепи и два полипептида легкой (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (имеющей аббревиатуру в настоящей заявке HCVR или V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH₁, CH₂ и CH₃. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (имеющей аббревиатуру в настоящей заявке LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L могут дополнительно быть разделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарности областями (CDR) и чередующиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эфektorные клетки) и первый компонент (C1q) классического пути системы комплемента.

При использовании в настоящем изобретении термины "индивид", "пациент" или "субъект" могут

представлять собой отдельный организм, позвоночное, млекопитающее или человека. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, индивид, пациент или субъект представляет собой человека.

Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем изобретении относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, входящие в состав популяции, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительном количестве. Например, моноклональное антитело может представлять собой антитело, происходящее из единственного клона, включая любой эукариотный, прокариотный или фаговый клон, но не способ, с помощью которого получено указанное антитело. Композиция моноклональных антител проявляет специфичность связывания и аффинность только в отношении конкретного эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против единственного антигенного сайта. Более того, в отличие от стандартных (поликлональных) препаратов антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена. Определение "моноклональное" относится к характеристике антитела, указывающей на его получение из по существу гомогенной популяции антител и не ограничивается получением антитела с помощью любого конкретного способа. Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого разнообразия методов, известных в данной области техники, включая, например, но не ограничиваясь, методами гибридомы, рекомбинантными технологиями и технологиями фагового дисплея. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии со способами согласно настоящему изобретению могут быть созданы с помощью метода гибридомы, впервые описанного Кохлером и др. (Kohler et al, Nature 256:495 (1975)), или могут быть созданы с помощью методов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4 816 567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных в источниках: Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991), Marks et al, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), например.

Предполагается, что при использовании в настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой или все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые соединения, изотонические и замедляющие абсорбцию соединения и т.д., совместимые с фармацевтическим введением. Фармацевтически приемлемые носители и их лекарственные формы известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в источнике: Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.).

При использовании в настоящем изобретении термин "поликлональное антитело" означает препарат антител, происходящих по меньшей мере из двух (2) различных продуцирующих антитела клеточных линий. Указанный термин включает препараты по меньшей мере двух (2) антител, которые содержат антитела, которые специфично связываются с различными эпитопами или областями антигена.

При использовании в настоящем изобретении термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" означает любую РНК или ДНК, которая может представлять собой немодифицированную или модифицированную РНК или ДНК. Полинуклеотиды включают, но не ограничиваются указанными, одно- и двуцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двуцепочечных участков, одно- и двуцепочечную РНК, РНК, которая представляет собой смесь одно- и двуцепочечных участков, и гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или чаще двуцепочечными или представлять собой смесь одно- и двуцепочечных участков. Кроме того, "полинуклеотид" относится к трехспиральным участкам, содержащим РНК или ДНК или РНК и ДНК. Термин полинуклеотид также включает молекулы ДНК или РНК, содержащие одно или более модифицированных оснований, и молекулы ДНК или РНК, имеющие каркасы, модифицированные для повышения стабильности или для других целей.

При использовании в настоящем изобретении термины "полипептид", "пептид" и "белок" применяются взаимозаменяемо и означают полимер, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом с помощью пептидных связей или модифицированных пептидных связей, т.е. пептидные изостеры. Полипептид относится как к коротким цепям, обычно называемым пептидами, гликопептидами или олигомерами, так и к длинным цепям, в целом называемым белками. Полипептиды могут содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых генами аминокислот. Полипептиды включают аминокислотные последовательности, модифицированные в ходе естественных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или с помощью методов химической модификации, которые хорошо известны в данной области техники. Такие модификации хорошо описаны в базовых документах и более подробных монографиях, а также в многотомной научной литературе.

При использовании в настоящем изобретении "ПРИТ" или "претаргетная радиоиммунотерапия" относится к многоэтапному процессу, который решает проблему медленного почечного клиренса направленных на опухоль антител, вносящего вклад в нежелательную токсичность в отношении нормальных тканей, таких как костный мозг. В претаргетной терапии радионуклид или другой диагностический или терапевтический агент присоединяют к низкомолекулярному гаптену. Сначала вводят биспецифичное антитело для претаргетной терапии, которое имеет сайты связывания для гаптена, а также антигенамишени. Несвязанному антителу затем позволяют выводиться из кровотока и после этого вводят гаптен.

При использовании в настоящем изобретении термин "рекомбинантный" в отношении, например, клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора указывает на то, что указанная клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор, были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или путем изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка или на то, что материал происходит из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в нативной (нерекомбинантной) форме указанных клеток, или экспрессируют нативные гены, для которых в других случаях наблюдается аномальная экспрессия, недостаточная экспрессия или полное отсутствие экспрессии.

При использовании в настоящем изобретении термин "раздельное" терапевтическое применение относится к введению по меньшей мере двух активных ингредиентов в одно время или по существу в одно время разными способами.

При использовании в настоящем изобретении термин "последовательное" терапевтическое применение относится к введению по меньшей мере двух активных ингредиентов в разное время, где способы введения являются одинаковыми или разными. Более конкретно, последовательное применение относится в общем к введению одного из активных ингредиентов до введения другого или других элементов. Таким образом, возможно вводить один из активных ингредиентов за нескольких минут, часов или дней до введения другого активного ингредиента или ингредиентов. В этом случае не происходит одновременного лечения.

При использовании в настоящем изобретении термин "специфично связывается" относится к молекуле (например, антителу или его антиген-связывающему фрагменту), которая распознает и связывается с другой молекулой (например, антигеном), но которая по существу не распознает и не связывается с другими молекулами. Термины "специфичное связывание", "специфично связывается с" или "специфичный в отношении" конкретной молекулы (например, полипептида или эпитопа полипептида) при использовании в настоящей заявке могут относиться, например, к молекуле, имеющей K_D для молекулы, с которой она связывается, составляющую до примерно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М. Термин "специфичное связывания" также может относиться к связыванию, при котором молекула (например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент) связывается с конкретным полипептидом (например, полипептидом А33) или эпитопом на конкретном полипептиде по существу без связывания с любым другим полипептидом или эпитопом полипептида.

При использовании в настоящем изобретении термин "одновременное" терапевтическое применение относится к введению по меньшей мере двух активных ингредиентов одинаковым способом и в одно и то же время или по существу в одно и то же время.

Предполагается, что при использовании в настоящем изобретении термин "терапевтический агент" означает соединение, которое при присутствии в эффективном количестве производит желаемый терапевтический эффект у нуждающегося в этом субъекта.

"Лечить" или "лечение" при использовании в настоящем изобретении включает лечение заболевания или расстройства, описанного в настоящем изобретении, у субъекта, такого как человек, и включает: (i) подавление указанного заболевания или расстройства, т.е. сдерживание его развития; (ii) облегчение указанного заболевания или расстройства, т.е. стимуляцию регрессии указанного расстройства; (iii) замедление прогрессирования указанного расстройства и/или (iv) подавление, облегчение или замедление прогрессирования одного или более симптомов указанного заболевания или расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, термин "лечение" означает, что симптомы, связанные с заболеванием, облегчаются, снижаются, вылечиваются или переводятся в состояние ремиссии, например.

Также следует понимать, что различные способы лечения расстройств, описанные в настоящем изобретении, относятся к "по существу" лечению, включающему полное лечение, а также неполное лечение, при котором достигается некоторый релевантный с биологической или медицинской точки зрения результат. Лечение может представлять собой непрерывное пролонгированное лечение хронического заболевания или однократное или многократное введение для лечения острого состояния.

Рассматривается модификация (модификации) аминокислотной последовательности антител против А33, описанных в настоящем изобретении. Например, указанная модификация может быть желаемой для улучшения аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела против А33 получают путем введения подходящих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту антитела или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела. Можно осуществлять любые комбинации делеций, инсерций и замен для получения интересующего антитела, при условии что полученное антитело обладает желаемыми свойствами. Модификация также включает изменение паттерна гликозилирования белка. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения в FR. "Консервативные замены" показаны в таблице ниже.

Аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен	Консервативные замены
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; норлейцин	leu
Leu (L)	норлейцин; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; норлейцин	leu

Один тип содержащего замену варианта включает замещение одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела. Удобный способ для создания таких содержащих замену вариантов включает аффинное созревание с применением фагового дисплея. В частности, в несколько сайтов гипервариабельной области (например, сайты 6-7) вводят мутации для создания всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Варианты антитела, созданные таким образом, демонстрируются в моновалентной форме на нитевидных фаговых частицах в виде молекул слияния с продуктом гена III M13, упакованных в каждой частице. Варианты, подвергнутые фаговому дисплею, затем подвергаются скринингу на предмет их биологической активности (например, аффинности связывания), как описано в настоящем изобретении. Для идентификации сайтов гипервариабельной области, являющихся кандидатами для модификации, можно проводить мутагенез на основе сканирования аланином для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнительно, анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело может являться предпочтительным для идентификации контактных точек между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии с методами, разработанными в настоящем изобретении. После создания таких вариантов панель вариантов подвергается

ется скринингу, как описано в настоящем изобретении, и антитела со сходными или превосходящими свойствами по результатам одного или более релевантных анализов могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

CRC и A33.

CRC представляет собой гетерогенное заболевание и может быть разделен на 4 консенсусных молекулярных подтипа (CMS) на основе анализа экспрессии генов, т.е. CMS1-4. MSI-опухоль главным образом принадлежит CMS1 (14% всех пациентов CRC) и характеризуется геномной гипермутацией и микросателлитной нестабильностью благодаря недостаточности путей репарации ДНК. Предположительно, гипермутация создает множество неоантигенов, которые презентуются на клеточной поверхности и привлекают Т-клетки в опухоль. В самом деле, CMS 1 обладает сильными молекулярными признаками активации и уклонения от распознавания иммунной системой. ICI действуют путем активации репрессированных инфильтрирующих опухоли лимфоцитов (TIL) для восстановления их опухолецидных свойств и, таким образом, MSI-опухоль является наиболее чувствительными к ICI CRC. Однако MSI-опухоль приходится на <5% mCRC; для большинства mCRC эффективность ICI до сих пор была неутешительной. Канцероматоз брюшины, как правило, представляет собой конечную фазу неизлечимого CRC. В отличие от метастаза в печень и легкие он обычно является неоперабельным и не отвечает на химиотерапию и облучение, что приводит к значительной смертности. Современное лечение главным образом является паллиативным, состоящим из циторедуктивной хирургии (CRS) и гипертермической химиотерапии (HIPEC), которые являются эффективными только у небольшого процента пациентов, страдающих заболеванием с небольшим объемом.

Гликопротеин A33 человека (GPA33 или A33) представляет собой мембранный белок I типа с одним трансмембранным доменом, который принадлежит семейству CTX молекул клеточной адгезии в пределах семейства иммуноглобулинов. A33 экспрессируется в 95% тканей CRC с очень ограниченной экспрессией в нормальных тканях. A33 содержит один Ig-подобный домен типа C2 и один Ig-подобный домен V-типа. Предсказанный зрелый белок включает единственный трансмембранный домен, внеклеточную область и внутриклеточный хвост. A33 играет роль во внутриклеточном трафике, межклеточном распознавании/сигналинге и рециклинге к клеточной поверхности. Аминокислотная последовательность эктодомена A33 (Ile22-Val235) представлена ниже:

```
ISVETPQDVLRSQGKSVTLPTCTYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVVIWPFNSKNYIH
GELYKNRVSISSNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMSDLEGNTKSRVRLVLVPP
SKPECGIEGETIIGNNIQLTCQSKEGSPTPQYSWKRYNILNQEPLAQPASGQPVS LKNIST
DTSGYYICTSSNEEGTQFCNITVAVRSPSMNV (SEQ ID NO: 57).
```

Композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению.

Было обнаружено, что существующие гуманизированные антитела IgG1 против A33 являются иммуногенными у пациентов, страдающих раком толстой кишки. См. Ritter G et al., Cancer Res 61:6851-9 (2001). Технология согласно настоящему изобретению описывает способы и композиции для создания и применения композиций на основе иммуноглобулина против A33 (например, антител против A33 или их антиген-связывающих фрагментов). Композиции на основе иммуноглобулинов против A33 согласно настоящему изобретению могут быть применимы в диагностике или лечении A33-положительных типов рака. Композиции на основе иммуноглобулинов против A33 в пределах объема технологии согласно настоящему изобретению включают, например, но не ограничиваются указанными, моноклональные, химерные, гуманизированные антитела и диатела, которые специфично связываются с полипептидом-мишенью, его гомологом, производным или фрагментом. Настоящее изобретение также обеспечивает антиген-связывающие фрагменты любого из антител против A33, описанных в настоящей заявке, где указанный антиген-связывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab)'2, Fab', scF_v и F_v.

Согласно одному аспекту, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащий варибельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H) и варибельный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где (a) V_H содержит последовательность

V_H-CDR1 FTFSTYDMS (SEQ ID NO: 37), последовательность

V_H-CDR2 TISSGGSYTYLDSVKG (SEQ ID NO: 38) и последовательность

V_H-CDR3 TTVVPFAY (SEQ ID NO: 39) и/или (b) V_L содержит последовательность V_L-CDR1, последовательность V_L-CDR2 и последовательность V_L-CDR3, выбранную из группы, состоящей из: KASQNVRTVVA (SEQ ID NO: 40), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42); KASQNVRTVVA (SEQ ID NO: 40), LASDRHT (SEQ ID NO: 43), и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42); KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41), и QHWSYPLT (SEQ ID NO: 45); и KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело также содержит Fc-домен иммуноглобулина любого изотипа, включая, но не ограничиваясь, IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая IgA₁ и IgA₂), IgD, IgE или IgM и IgY. Неограничивающие примеры последовательностей константной

области включают следующие последовательности:

Константная область IgD человека, база данных Uniprot: P01880 (SEQ ID NO: 46)

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLAACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQPQRTFPEIQRR
 DSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTAQPQA
 EGS�AKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV
 QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRL
 TLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLL
 CEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSQPATY
 TCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPMK

Константная область IgG1 человека, база данных Uniprot: P01857 (SEQ ID NO:47)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG2 человека, база данных Uniprot: P01859 (SEQ ID NO:48)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCAPPVAGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG3 человека, база данных Uniprot: P01860 (SEQ ID NO:49)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
 DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH
 EALHNRFTQKSLSLSPGK

Константная область IgM человека, база данных Uniprot: P01871 (SEQ ID NO: 50)

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLR
 GGYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP
 RDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKV
 TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDPAIRVFAIPPSFASIFLTKS
 TKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSGE
 RFTCTVTHDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPAD
 VFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEA
 LPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

Константная область IgG4 человека, база данных Uniprot: P01861 (SEQ ID NO:51)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

Константная область IgA1 человека, база данных Uniprot: P01876 (SEQ ID NO:52)
 ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQDAS
 GDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPSTPPTSPSTPPTSPS
 CCHPRLSLHRPALEDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGP PERDLC
 GCYSVSSVLP GCAEPWNH GKFTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
 ALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGT TTTFAVTSILR
 VAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Константная область IgA2 человека, база данных Uniprot: P01877 (SEQ ID NO:53)
 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPPSQDAS
 GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPPPPCCHPRLSLHRPA
 LEDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLP GCG
 AQPWNHGETFTCTAANPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLA
 RGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGT TTTFAVTSILRVAAEDWKKGDT
 FSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Константная область Ig-каппа человека, база данных Uniprot: P01834 (SEQ ID NO: 54)
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению содержат константную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательностям SEQ ID NO: 46-53. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению содержат константную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или равен 100% идентична последовательности ID NO: 54. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению связываются с эпитопом полипептида A33, содержащим по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает выделенную композицию на основе иммуноглобулина (например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент), содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC), содержащую SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, или ее вариант, имеющий одну или более консервативных аминокислотных замен.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность легкой цепи (LC), содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63, или ее вариант, содержащий одну или более консервативных аминокислотных замен.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность HC и аминокислотную последовательность LC, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H1/L1);
 SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H1/L2);
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 9 (3A3-H2/L1);
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 10 (3A3-H2/L2);
 SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17 (huA33-IgG1 (H2L2));
 SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21 (huA33-BsAb);
 SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 (клон 31);
 SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (клон 32);
 SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 (клон 48);
 SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 (клон 49);
 SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 (клон 53);
 SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 (клон 56);

SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 (клон 57),
SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 60 (huA33-huC825); и
SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 (huA33-mC825) соответственно.

Согласно любому из указанных выше вариантов реализации композиций на основе иммуноглобулина последовательности переменных доменов HC и LC иммуноглобулина образуют антиген-связывающий сайт, который связывается с эпитопом полипептида A33, содержащим по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков эктодомена A33 (SEQ ID NO: 57). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, последовательности переменных доменов HC и LC иммуноглобулина представляют собой компоненты одной и той же полипептидной цепи. Согласно другим вариантам реализации изобретения, последовательности переменных доменов HC и LC иммуноглобулина представляют собой компоненты разных полипептидных цепей. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело представляет собой полноразмерное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению специфично связываются по меньшей мере с одним полипептидом A33. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению связываются по меньшей мере с одним полипептидом A33 с константной диссоциации (K_D), составляющей примерно 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M или 10^{-12} M. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов представляют собой моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела или биспецифичные антитела. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела содержат каркасную область антитела человека.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, композиция на основе иммуноглобулина имеет одну или более из следующих характеристик: (а) последовательность переменного домена легкой цепи иммуноглобулина по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности переменного домена легкой цепи иммуноглобулина, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 17, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 60 или 63; и/или (б) последовательность переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 15, 19, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 58 или 62. Согласно другому аспекту, один или более аминокислотных остатков в композициях на основе иммуноглобулинов, предложенных в настоящем изобретении, замещены на другую аминокислоту. Замена может представлять собой "консервативную замену", как определено в настоящем изобретении.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиция на основе иммуноглобулина содержит (а) последовательность LC, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности LC, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 10, 17, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 60 или 63; и/или (б) последовательность HC, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности HC, присутствующей в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 15, 19, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 58 или 62.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов содержат константную область IgG1, содержащую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и K322A. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов содержат константную область IgG4, содержащий мутацию S228P.

В некоторых аспектах, композиции на основе иммуноглобулинов против A33, описанные в настоящем изобретении, имеют структурные модификации для облегчения быстрого связывания и захвата клеткой и/или обеспечения медленного высвобождения. Согласно некоторым аспектам, композиция на основе иммуноглобулинов против A33 согласно технологии по настоящему изобретению (например, антитело) может содержать делецию в константной области CH2 тяжелой цепи для облегчения быстрого связывания и захвата клеткой и/или обеспечения медленного высвобождения. Согласно некоторым аспектам, Fab-фрагмент используется для облегчения быстрого связывания и захвата клеткой и/или обеспечения медленного высвобождения. Согласно некоторым аспектам, F(ab)₂-фрагмент используется для облегчения быстрого связывания и захвата клеткой и/или обеспечения медленного высвобождения.

Согласно одному аспекту, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или легкую цепь композиции на основе иммуноглобулина, описанной в настоящей заявке. Также в настоящем изобретении описаны рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие любые антитела, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, последовательность нуклеино-

вой кислоты выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 11, 12, 16, 18, 20, 22, 59 и 61. Согласно другому аспекту, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает клетку-хозяина, экспрессирующую любую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или легкую цепь композиции на основе иммуноглобулина, описанной в настоящей заявке.

Композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению (например, антитело против А33) могут являться моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или иметь более высокую степень мультиспецифичности. Мультиспецифичные антитела могут являться специфичными в отношении различных эпитопов одного или более полипептидов А33 или в отношении полипептида (полипептидов) А33, а также в отношении гетерологичных композиций, таких как гетерологичный полипептид или твердый поддерживающий материал (материал подложки). См., например, публикацию международной патентной заявки WO 93/17715; публикацию международной патентной заявки WO 92/08802; публикацию международной патентной заявки WO 91/00360; публикацию международной патентной заявки WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); патенты США № 5,573,920, 4,474,893, 5,601,819, 4,714,681, 4,925,648; 6,106,835; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов представляют собой химерные антитела. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, композиции на основе иммуноглобулинов представляют собой гуманизированные антитела.

Композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению могут дополнительно быть рекомбинантно слиты с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце или химически конъюгированы (включая ковалентное и нековалентное конъюгирование) с полипептидами или другими композициями. Например, композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению могут быть рекомбинантно слиты или конъюгированы с молекулами, применимыми в качестве меток в анализах детекции и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные средства или токсины. См., например, публикацию международной патентной заявки WO 92/08495; публикацию международной патентной заявки WO 91/14438; публикацию международной патентной заявки WO 89/12624; патенте США № 5,314,995 и EP 0 396 387.

Согласно любому из приведенных выше вариантов реализации композиции на основе иммуноглобулинов согласно технологии по настоящему изобретению, антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела может быть необязательно конъюгирован с агентом, выбранным из группы, состоящей из изотопов, красителей, хромогенов, контрастирующих агентов, лекарственных средств, токсинов, цитокинов, ферментов, ингибиторов ферментов, гормонов, антагонистов гормонов, факторов роста, радионуклидов, металлов, липосом, наночастиц, РНК, ДНК или любой их комбинации. Для химической связи или физической связи функциональная группа композиции на основе иммуноглобулина, как правило, связывается с функциональной группой агента. В качестве альтернативы, функциональная группа агента связывается с функциональной группой композиции на основе иммуноглобулина.

Функциональные группы агента и композиции на основе иммуноглобулина могут связываться прямо. Например, функциональная группа (например, сульфгидрильная группа) агента может связываться с функциональной группой (например, сульфгидрильной группой) композиции на основе иммуноглобулина с образованием дисульфида. В качестве альтернативы, функциональные группы могут соединяться через перекрестно сшивающий агент (т.е. линкер). Некоторые примеры перекрестно сшивающих агентов описаны ниже. Кросс-линкер может быть присоединен либо к агенту, либо к композиции на основе иммуноглобулина. Количество агента или композиции на основе иммуноглобулина в конъюгате также ограничивается количеством функциональных групп, присутствующих на партнере связывания. Например, максимальное количество агента, связанного с конъюгатом, зависит от количества функциональных групп, присутствующих на композиции на основе иммуноглобулина. В качестве альтернативы, максимальное количество композиции на основе иммуноглобулина, связанной с агентом, зависит от количества функциональных групп, присутствующих на агенте.

Согласно другому варианту реализации изобретения, конъюгат содержит одну композицию на основе иммуноглобулина, связанную с одним агентом. Согласно одному варианту реализации изобретения, указанный конъюгат содержит по меньшей мере один агент, химически связанный (например, конъюгированный) по меньшей мере с одной композицией на основе иммуноглобулина. Агент может быть химически связан с композицией на основе иммуноглобулина с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники. Например, функциональная группа на агенте может прямо присоединяться к функциональной группе на композиции на основе иммуноглобулина. Некоторые примеры подходящих функциональных групп включают, например, аминогруппу, карбоксигруппу, сульфгидрильную группу, малеимидную группу, изоцианатную группу, изотиоцианатную группу и гидроксильную группу.

Агент также может быть химически связан с композицией на основе иммуноглобулина посредством перекрестно сшивающих агентов, таких как диальдегиды, карбодиимиды, дималеимиды и т.д. Перекрестно сшивающие агенты могут, например, быть получены из компании Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорда, Иллинойс (для помощи см. Веб-сайт Pierce Biotechnology, Inc.). Дополнительные перекрестно сшивающие агенты включают перекрестно сшивающие агенты на основе платины от компании Kreatech

Biotechnology, B.V., Амстердам, Нидерланды, описанные в патентах США № 5,580,990; 5,985,566; и 6,133,038.

В качестве альтернативы, функциональная группа на агенте и композиции на основе иммуноглобулина могут являться одинаковыми. Гомобифункциональные кросс-линкеры, как правило, используются для перекрестного сшивания идентичных функциональных групп. Примеры гомобифункциональных кросс-линкеров включают EGS (т.е. этиленгликоль-бис[сукцинимидилсукцинат]), DSS (т.е. дисукцинимидилсуберат), DMA (т.е. диметиладипимидат, 2HCl), DTSSP (т.е. 3,3'-дителиобис[сульфосукцинимидилпропионат]), DPDPB (т.е. 1,4-ди-[3'-(2'-пиридилдитио)-пропионамидо]бутан) и BMH (т.е. бис-малеимидогексан). Такие гомобифункциональные кросс-линкеры также доступны из компании Pierce Biotechnology, Inc.

В других примерах может являться предпочтительным отщепление агента от композиции на основе иммуноглобулина. Веб-сайт компании Pierce Biotechnology, Inc., описанный выше, также может помочь специалисту в данной области техники в выборе подходящих кросс-линкеров, которые можно отщеплять, например, с помощью ферментов в клетке. Таким образом, агент можно отделять от композиции на основе иммуноглобулина. Примеры поддающихся отщеплению линкеров включают SMPT (т.е. 4-сукцинимидилоксикарбонилметил-а-[2-пиридилдитио]толуол), сульфо-LC-SPDP (т.е. сульфосукцинимидил 6-(3-[2-пиридилдитио]-пропионамидо)гексаноат), LC-SPDP (т.е. сукцинимидил 6-(3-[2-пиридилдитио]-пропионамидо)гексаноат), сульфо-LC-SPDP (т.е. сульфосукцинимидил 6-(3-[2-пиридилдитио]-пропионамидо)гексаноат), SPDP (т.е. N-сукцинимидил-3-[2-пиридилдитио]-пропионамидогексаноат) и AEDP (т.е. 3-[(2-аминоэтил)дитио]пропионовую кислоту, HCl).

Согласно другому варианту реализации изобретения, конъюгат содержит по меньшей мере один агент, физически связанный по меньшей мере с одной композицией на основе иммуноглобулина. Любой способ, известный специалистам в данной области техники, может применяться для физического связывания агентов с композициями на основе иммуноглобулинов. Например, композиции на основе иммуноглобулинов и агенты можно смешивать вместе с помощью любого способа, известного специалистам в данной области техники. Порядок смешения не важен. Например, агенты можно физически смешивать с композициями на основе иммуноглобулинов с помощью любого способа, известного специалистам в данной области техники. Например, композиции на основе иммуноглобулинов и агенты можно помещать в контейнер и взбалтывать, например, путем встряхивания указанного контейнера, для смешивания композиций на основе иммуноглобулина и агентов.

Композиции на основе иммуноглобулинов можно модифицировать с помощью любого способа, известного специалистам в данной области техники. Например, композицию на основе иммуноглобулина можно модифицировать с помощью перекрестно сшивающих агентов или функциональных групп, как описано выше.

A. Способы получения антител против A33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Общий обзор. Сначала выбирают полипептид-мишень, к которому может быть создано антитело согласно технологии по настоящему изобретению. Например, антитело может быть создано против полноразмерного белка A33 или части внеклеточного домена белка A33. Методы создания антител, направленных на такие полипептиды-мишени, хорошо известны специалисту в данной области техники. Примеры таких методов включают, например, но не ограничиваются указанными, методы, включающие библиотеки дисплея, ксеногбридомы или человеческие и мышинные гибридомы и т.д. Полипептиды-мишени в пределах объема технологии согласно настоящему изобретению включают любой полипептид, происходящий из белка A33, содержащего внеклеточный домен, способный вызывать иммунный ответ. Получение антител, специфичных в отношении белка A33, проиллюстрировано в Примерах 1, 2, 3 и 5.

Следует понимать, что рекомбинантно сконструированные антитела и фрагменты антител, например, относящиеся к антителам полипептиды, которые направлены на белок A33 и его фрагменты, подходят для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Антитела против A33, которые можно применять в способах, изложенных в настоящей заявке, включают моноклональные и поликлональные антитела и фрагменты антител, такие как Fab, Fasb', F(ab')₂, Fd, cFv, диатела, легкие цепи антител, тяжелые цепи антител и/или фрагменты антител. Были описаны способы, применимые для высокоэффективной продукции полипептидов, содержащих Fv-фрагменты антител, например, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты антител. См. патент США № 5,648,237.

В целом, антитело получают из исходного вида. Более конкретно, получают последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность варибельной части легкой цепи, тяжелой цепи или обеих цепей антитела исходного вида, имеющего специфичность в отношении антигена полипептида-мишени. Исходный вид представляет собой любой вид, применимый для создания антитела согласно технологии по настоящему изобретению или библиотеки антител, например, крысу, мышь, кролика, курицу, обезьяну, человека и т.д.

Технологии фагового или фагмидного дисплея представляют собой методы, применимые для получения антител согласно технологии по настоящему изобретению. Методы создания и клонирования моноклональных антитела хорошо известны специалисту в данной области техники. Экспрессию последовательностей, кодирующих антитела согласно технологии по настоящему изобретению, можно осуществ-

влять в E. coli.

Из-за вырождения последовательностей, кодирующих нуклеиновую кислоту, другие последовательности, которые кодируют по существу те же аминокислотные последовательности, что и последовательности природных белков, можно использовать при практическом осуществлении технологии согласно настоящему изобретению. Указанные последовательности включают, но не ограничиваются указанными, последовательности нуклеиновых кислот, включая целые или части последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих приведенные выше полипептиды, которые изменены путем замены различных кодонов, кодирующих функционально эквивалентный аминокислотный остаток в пределах последовательности, что приводит, таким образом, к получению "молчащего" изменения. Следует понимать, что нуклеотидная последовательность иммуноглобулина в соответствии с технологией согласно настоящему изобретению может выдерживать гомологичное изменение вплоть до 25% последовательности, как рассчитано с помощью стандартных методов ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.), при условии что такой вариант приводит к получению функционирующего антитела, которое распознает белки A33. Например, один или более аминокислотных остатков в пределах последовательности полипептида может быть замещен на другую аминокислоту со сходной полярностью, действующую как функциональный эквивалент, что приводит к "молчащему" изменению. Заместители аминокислот в пределах последовательности могут быть выбраны из других членов класса, к которому принадлежит аминокислота. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Также объем технологии согласно настоящему изобретению включает белки или их фрагменты или производные, которые по-разному модифицируются во время или после трансляции, например, путем гликозилирования, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела или другими клеточными лигандами и т.д. Дополнительно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуноглобулин, может быть мутирована *in vitro* или *in vivo* с созданием и/или разрушением последовательностей трансляции, инициации и/или терминации или с созданием вариаций в кодирующих областях и/или с образованием новых сайтов рестрикции эндонуклеазами или разрушения предсуществующих указанных сайтов для облегчения дополнительной *in vitro* модификацию. Любой метод мутагенеза, известный в данной области техники, можно использовать, включая, но не ограничиваясь, *in vitro* сайт-направленный мутагенез, J. Biol. Chem. 253:6551, применение Tab-линкеров (Pharmacia), и т.д.

Получение поликлональной антисыворотки и иммуногенов. Способы создания антител или фрагментов антител согласно технологии по настоящему изобретению, как правило, включают иммунизацию субъекта (в целом, субъекта, не представляющего собой человека, такого как мышь или кролик) очищенным белком A33 или его фрагментом или клеткой, экспрессирующей белок A33 или его фрагмент. Подходящий иммуногенный препарат может содержать, например, рекомбинантно экспрессированный белок A33 или химически синтезированный пептид A33. ЕСМ белка A33 или его часть или фрагмент можно использовать в качестве иммуногена для создания антитела против A33, которое связывается с белком A33 или его частью или фрагментом, с применением стандартных методов получения поликлонального и моноклонального антитела.

Полноразмерный белок A33 или его фрагменты, применимы в виде фрагментов в качестве иммуногенов. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, фрагмент A33 содержит по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57 и содержит эпитоп белка A33 таким образом, что антитело, созданное против пептида, образует специфичный иммунный комплекс с белком A33.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антигенный пептид A33, перекрывающийся с эктодоменом A33 (Ile22-Val235), содержит по меньшей мере 5, 8, 10, 15, 20 или 30 аминокислотных остатков. Более длинные антигенные пептиды иногда являются более желаемым по сравнению с более короткими антигенными пептидами в зависимости от применения и в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Мультимеры данного эпитопа иногда являются более эффективными, чем мономеры.

При необходимости иммуногенность белка A33 (или его фрагмента) можно повышать путем слияния или конъюгирования с гаптеном, таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH) или овалбумин (OVA). Многие такие гаптены известны в данной области техники. Также можно комбинировать белок A33 со стандартным адъювантом, таким как полный или неполный адъювант Фрейнда, для повышения иммунной реакции на полипептид у субъекта. Различные адъюванты, применимые для повышения иммунологического ответа, включают, но не ограничиваются указанными, адъювант Фрейнда (полный или неполный), минеральные гели (например, гидроксид алюминия), поверхностно-активные вещества (например, лизолецитин, полиолы плуроника, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, динитрофенол и т.д.), адъюванты для человека, такие как бацилла Кальметта-Герена и *Corynebacterium parvum* или

сходные иммуностимулирующие соединения. Указанные методы являются стандартными в данной области техники.

В описании технологии по настоящему изобретению иммунные ответы могут быть описаны как "первичные" или "вторичные" иммунные ответы. Первичный иммунный ответ, который также описывается как "защитный" иммунный ответ, относится к иммунному ответу, возникающему у человека в результате некоторого первоначального воздействия (например, начальной "иммунизации") на конкретный антиген, например, белок А33. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, иммунизация может происходить в результате вакцинации субъекта вакциной, содержащей антиген. Например, вакцина может представлять собой А33-вакцину, содержащую один или несколько антигенов, происходящих из белка А33. Первичный иммунный ответ может снижаться или ослабляться с течением времени и даже может исчезать или по меньшей мере становиться настолько ослабленным, что его невозможно выявить. Соответственно, технология согласно настоящему изобретению также относится к "вторичному" иммунному ответу, который также описывается в настоящей заявке как "ответ иммунологической памяти".

Термин "вторичный иммунный ответ" относится к иммунному ответу, возникающему у субъекта после того, как уже проявился первичный иммунный ответ.

Таким образом, вторичный иммунный ответ может возникать, например, для усиления существующего иммунного ответа, который стал сниженным или ослабленным, или для воссоздания предыдущего иммунного ответа, который исчез или больше не выявляется. Вторичный ответ или ответ иммунологической памяти может представлять собой либо гуморальный ответ (на основе антител), либо клеточный ответ. Вторичный или гуморальный ответ иммунологической памяти происходит при стимуляции В-клеток памяти, которые образовались при первом презентировании антигена. Реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) представляют собой тип клеточного вторичного или иммунного ответа памяти, который опосредуется CD4⁺ Т-клетками. Первое воздействие антигена примирует иммунную систему, а дополнительное воздействие (воздействия) приводит к ГЗТ.

После надлежащей иммунизации антитело против А33 можно получить из сыворотки субъекта. При желании молекулы антитела, направленные против белка А33, могут быть выделены из тела млекопитающего (например, из крови) и дополнительно очищены с помощью хорошо известных методов, таких как хроматография на полипептиде А, для получения фракции IgG.

Моноклональное антитело. Согласно одному варианту реализации технологии по настоящему изобретению антитело представляет собой моноклональное антитело против А33. Например, согласно некоторым вариантам реализации моноклональное антитело против А33 может представлять собой человеческое или мышиное моноклональное антитело против А33. Для получения моноклональных антител, направленных на белок А33, или его производных, фрагментов, аналогов или гомологов, может быть использован любой метод, который обеспечивает получение молекул антител путем непрерывного культивирования клеточных линий. Такие методы включают, но не ограничиваются указанными, метод гибридом (см., например, Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497); метод триомы; метод гибридомы В-клеток человека (см., например, Kozbor, et al., 1983. *Immunol. Today* 4: 72) и метод EBV-гибридомы для получения моноклональных антител человека (см., например, Cole, et al., 1985. In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Человеческие моноклональные антитела могут быть использованы при практическом осуществлении технологии согласно настоящему изобретению и могут быть получены с использованием гибридом человека (см., например, Cote, et al., 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) или путем трансформации В-клеток человека вирусом Эпштейна-Барра *in vitro* (см., например, Cole, et al., 1985. In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Например, может быть выделена популяция нуклеиновых кислот, которые кодируют области антител. ПНР с использованием праймеров, происходящих из последовательностей, кодирующих консервативные области антител, используют для амплификации последовательностей, кодирующих части антител из популяции, и затем ДНК, кодирующие антитела или их фрагменты, такие как переменные домены, реконструируют из амплифицированных последовательностей. Такие амплифицированные последовательности также могут быть слиты с ДНК, кодирующими другие белки, например, оболочку бактериофага или белок бактериальной клеточной поверхности, для экспрессии и демонстрации слитых полипептидов на фаге или бактериях. Затем амплифицированные последовательности могут быть экспрессированы и далее выбраны или выделены на основе, например, аффинности экспрессированного антитела или его фрагмента к антигену или эпитопу, присутствующему в белке А33. В качестве альтернативы, гибридомы, экспрессирующие моноклональные антитела против А33, могут быть получены путем иммунизации субъекта и затем выделения гибридом из селезенки субъекта с использованием стандартных методов. См., например, Milstein et al., (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73: 3-46). Скрининг гибридом с использованием стандартных методов позволяет получить моноклональные антитела различной специфичности (т.е. для разных эпитопов) и аффинности. Может использоваться выбранное моноклональное антитело с желаемыми свойствами, например, связыванием с А33. Поскольку указанное антитело экспрессируется в гибридоме, оно может быть связано с молекулой, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), для изменения его свойств или же можно выделять кодирующую его кДНК секвенировать и подвергать манипуляциям различными способами. Синтетические дендриме-

ры могут быть добавлены к реакционноспособным аминокислотным боковым цепям, например лизину, для усиления иммуногенных свойств белка А33. Кроме того, методы СРG-динуклеотида могут быть использованы для усиления иммуногенных свойств белка А33. Другие манипуляции включают замену или удаление определенных аминокислотных остатков, которые способствуют нестабильности антитела во время хранения или после введения субъекту, и методы созревания аффинности антитела к белку А33.

Метод гибридом. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения антитело согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело против А33, продуцируемое гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, не являющегося человеком, например трансгенной мыши, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитый с иммортализованной клеткой. Методы гибридомы включают в себя методы, известные в данной области и описанные в источниках: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981). Другие способы получения гибридом и моноклональных антител хорошо известны специалистам в данной области техники.

Метод фагового дисплея. Как отмечено выше, антитела согласно технологии по настоящему изобретению могут быть получены с применением методов рекомбинантной ДНК и фагового дисплея. Например, антитела против А33 могут быть получены с использованием различных методов фагового дисплея, известных в данной области. В методах фагового дисплея функциональные домены антител демонстрируются на поверхности фаговой частицы, которая содержит кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Фаги с желаемыми свойствами связывания выбирают из репертуара или библиотеки комбинаторных антител (например, человека или мыши) путем выбора непосредственно с использованием антигена, как правило, антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Фаги, используемые в указанных способах, как правило, представляют собой нитевидные фаги, включая fd и M13, в которых домены антител Fv, Fv или стабилизированные дисульфидом домены Fv рекомбинантно слиты с геном фагового белка III или белка VIII. Кроме того, методы можно адаптировать для создания библиотек экспрессии Fab (см., Например, Huse, et al., *Science* 246: 1275-1281, 1989), чтобы обеспечить быструю и эффективную идентификацию моноклональных Fab-фрагментов с желаемой специфичностью в отношении полипептида А33, например, полипептида или его производного, фрагментов, аналогов или гомологов. Другие примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител согласно технологии по настоящему изобретению, включают методы, описанные в источниках: Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070, 1990; Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50, 1995; Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186, 1995; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958, 1994; Persic et al., *Gene* 187: 9-18, 1997; Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280, 1994; PCT/GB91/01134; публикации международных заявок WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council et al.); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); и патенты США № 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727 и 5,733,743. Способы, применимые для дисплея полипептидов на поверхности частиц бактериофага путем присоединения полипептидов через дисульфидные связи, были описаны Лонингом (Lohning, патент США. № 6753366). Как описано в приведенных выше ссылках, после выбора фага кодирующие антитело области из фага могут быть выделены и использованы для создания полноразмерных антител, включая антитела человека, или любого другого желаемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессироваться в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжей и бактерий. Например, также можно применять способы рекомбинантного получения фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂ с помощью методов, известных в данной области, таких как методы, описанные в публикации международной патентной заявки WO 92/22324; источниках Mullinax et al., *BioTechniques* 12: 864-869, 1992; и Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34, 1995; Better et al., *Science* 240: 1041-1043, 1988.

В целом, гибридные антитела или фрагменты гибридных антител, которые клонируются в вектор дисплея, могут быть выбраны с использованием соответствующего антигена для идентификации вариантов, которые поддерживают хорошую активность связывания, поскольку антитело или фрагмент антитела будет присутствовать на поверхности фага или фагмидной частицы. См., например, Barbas III et al., *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Однако для указанного процесса можно использовать другие форматы вектора, такие как клонирование библиотеки фрагментов антител в литический фаговый вектор (модифицированные T7 или ламбда-Zap системы) для селекции и/или скрининга.

Экспрессия рекомбинантных антител против А33. Как отмечено выше, антитела согласно технологии по настоящему изобретению могут быть получены с помощью метода рекомбинантной ДНК. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкторы, кодирующие антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, как правило, включают последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антитела против А33, включая естественно ассоциированные или гетерологичные промоторные области. В связи с этим другой аспект техно-

логии включает векторы, содержащие одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению. Для рекомбинантной экспрессии одного или более из полипептидов согласно технологии по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, содержащую всю или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело против А33, встраивают в подходящий вектор клонирования или вектор экспрессии (т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей полипептид последовательности) с помощью методов рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники и подробно описанных ниже. Способы получения разнотипной популяций векторов были описаны Лернером и др. (Lerner et al., патенты США № 6,291,160 и 6,680,192).

В целом, векторы экспрессии, применимые в методах рекомбинантной ДНК, часто представлены в виде плазмид. Согласно настоящему изобретению, термин "плазида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, так как плазида представляет собой наиболее часто используемую форму вектора. Однако предполагается, что технология согласно настоящему изобретению включает такие другие формы векторов экспрессии, которые технически не представляют собой плазмиды, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы с нарушенной репликацией), которые выполняют эквивалентные функции. Такие вирусные векторы дают возможность инфицирования субъекта и экспрессии конструкта у указанного субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотные системы промоторов в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотные клетки-хозяева. После встраивания вектора в подходящего хозяина, указанный хозяин поддерживается в условиях, подходящих для экспрессии на высоком уровне нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело против А33, и сбор и очистку антитела против А33, например, перекрестно реагирующих антител против А33. См., в целом, заявку на патент США 2002/0199213. Указанные векторы экспрессии, как правило, способны к репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде интегральной части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например, ген устойчивости к ампициллину или устойчивости к гигромицину, для обеспечения возможности обнаружения указанных клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК. Векторы также могут кодировать сигнальный пептид, например, пектатлиазу, применимый для направленной секции внеклеточных фрагментов антител (см. патент США № 5,576,195).

Рекомбинантные векторы экспрессии согласно технологии по настоящему изобретению содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, обладающий свойствами связываться с А33 в виде, подходящем для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии содержат одну или более регуляторных последовательностей, выбранных с учетом клетки-хозяина, которую предполагается применять для экспрессии, где указанные последовательности функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии. Предполагается, что в контексте рекомбинантного вектора экспрессии "функционально связанный" означает, что интересующая нуклеотидная последовательность связана с регуляторной последовательностью (последовательностями) таким образом, который позволяет экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в *in vitro* системе транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, где вектор вводят в указанную клетку-хозяина). Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в источнике Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Регуляторные последовательности включают последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев и которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области техники очевидно, что дизайн вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии полипептида и т.д. Типичные регуляторные последовательности, применимые в качестве промоторов экспрессии рекомбинантного полипептида (например, антитела против А33), включают, например, но не ограничиваются указанными, промоторы 3-фосфоглицераткиназы и других гликолитических ферментов. Индуцибельные дрожжевые промоторы включают среди прочих промоторы из алкогольдегидрогеназы, изоцитохрома С и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы. Согласно одному варианту реализации изобретения, полинуклеотид, кодирующий антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, функционально связан с промотором ага В и поддается экспрессии в клетке-хозяине. См. патент США 5,028,530. Векторы экспрессии согласно технологии по настоящему изобретению можно вводить в клетки-хозяева для продукции таким образом полипептидов или пептидов, включая полипептиды слияния, закодированные нуклеиновыми кислотами, как описано в настоящей заявке (например, антитело против А33 и т.д.).

Другой аспект согласно технологии по настоящему изобретению относится к экспрессирующим антителом против А33 клеткам-хозяевам, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую одно или более антител против А33. Рекомбинантные векторы экспрессии согласно технологии по настоящему

изобретению могут быть сконструированы для экспрессии антитела против А33 в прокариотных или эукариотных клетках. Например, антитело против А33 может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как клетки *Escherichia coli*, клетках насекомых (с использованием бакуловирусных векторов экспрессии), клетках грибов, например, дрожжей, дрожжевых клетках или клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева дополнительно обсуждаются в источнике Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). В качестве альтернативы, рекомбинантный вектор экспрессии может быть транскрибирован и транслирован *in vitro*, например, с применением промотора регуляторных последовательностей T7 и полимеразы T7. Способы, применимые для получения и скрининга полипептидов, имеющих заранее определенное свойство, например, антител против А33, посредством экспрессии стохастически сгенерированных полинуклеотидных последовательностей, были описаны ранее. См. патенты США № 5,763,192; 5,723,323; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862; 6,492,107; 6,569,641.

Экспрессию полипептидов в прокариотах наиболее часто осуществляют в *E. coli* с векторами, содержащими конститутивные или индуцибельные промоторы, направляющие экспрессию полипептидов слияния или полипептидов, не представляющих собой полипептиды слияния. Векторы слияния добавляют ряд аминокислот к закодированному в нем полипептиду, обычно к аминоконцу рекомбинантного полипептида. Такие векторы слияния, как правило, служат для трех целей: (i) для повышения экспрессии рекомбинантного полипептида; (ii) для повышения растворимости рекомбинантного полипептида; и (iii) для помощи в очистке рекомбинантного полипептида путем действия в качестве лиганда в аффинной очистке. Часто в экспрессионных векторах слияния в область соединения фрагмента слияния и рекомбинантного полипептида вводят сайт протеолитического расщепления для обеспечения отделения рекомбинантного полипептида от фрагмента слияния после очистки указанного полипептида слияния. Такие ферменты и последовательности их когнатного распознавания включают фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Типичные экспрессионные векторы экспрессии слияния включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) и ПРИТ5 (Pharmacia, Пискатэвей, Нью Джерси), которые обеспечивают слияние глутатион-S-трансферазы (GST), связывающего мальтозу Е полипептида, или полипептида А, соответственно, с рекомбинантным полипептидом-мишенью.

Примеры подходящих индуцибельных векторов экспрессии *E. coli*, не представляющих собой векторы слияния, включают pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69: 301-315) и pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). Способы для направленной сборки отдельных активных доменов пептида или белка с получением мультифункциональных полипептидов путем слияния полипептида были описаны Паком и др. (Pack et al., патенты США № 6,294,353; 6,692,935). Одной из стратегий для максимизации экспрессии рекомбинантного полипептида, например, антитела против А33, в *E. coli*, является экспрессия полипептида в бактерии-хозяине с нарушенной способностью к протеолитическому расщеплению рекомбинантного полипептида. См., например, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Другой стратегией является изменение последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей inserции в вектор экспрессии, таким образом, чтобы отдельные кодоны для каждой аминокислоты представляли собой кодоны, предпочтительно используемые клеткой-хозяином, например, *E. coli*, для экспрессии (см., например, Wada, et al., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Такое изменение последовательностей нуклеиновых кислот согласно технологии по настоящему изобретению можно осуществлять с помощью стандартных методов синтеза ДНК.

Согласно другому варианту реализации изобретения, вектор экспрессии антитела против А33 представляет собой дрожжевой вектор экспрессии. Примеры векторов экспрессии из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* включают pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, Cell 30: 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz et al., Gene 54: 113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, Сан Диего, Калифорния) и picZ (Invitrogen Corp, Сан Диего, Калифорния). В качестве альтернативы, антитело против А33 может экспрессироваться в клетках насекомых с применением бакуловирусных векторов экспрессии. Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии полипептидов, например, антитела против А33, в культивируемых клетках насекомых (например, клетках SF9), включают группу pAc (Smith, et al., Mol Cell. Biol. 3: 2156-2165, 1983) и группу pVL (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

Согласно другому варианту реализации изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, экспрессируется в клетках млекопитающих с применением вектора экспрессии млекопитающих. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают, например, но не ограничиваются указанными, pCDM8 (Seed, Nature 329: 840, 1987) и pMT2PC (Kaufman, et al., EMBO J. 6: 187-195, 1987). При применении в клетках млекопитающих функции контроля вектора экспрессии часто обеспечиваются вирусными регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы происходят из полиома, аденовируса 2, цитомегаловируса и вируса обезьян 40. Другие подходящие системы экспрессии как для прокариотных, так и эукариотных клеток, применимые для экспрессии антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, см., например, в главах 16 и 17 источника Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd

ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный вектор экспрессии млекопитающих способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты в конкретный клеточный тип (например, тканеспецифичные регуляторные элементы). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают промотор альбумина (специфичный для печени; Pinkert, et al., *Genes Dev.* 1: 268-277, 1987), специфичные для лимфоидной ткани промоторы (Calame and Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275, 1988), промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733, 1989) и иммуноглобулины (Banerji, et al., 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore, *Cell* 33: 741-748, 1983.), специфичные для нейронов промоторы (например, промотор гена нейрофиламентов; Byrne and Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477, 1989), специфичные для поджелудочной железы промоторы (Edlund, et al., 1985. *Science* 230: 912-916) и специфичные для молочной железы промоторы (например, промотор генов белков молочной сыворотки; патент США № 4 873 316 и публикация европейской заявки № 264 166). Регулируемые в процессе развития промоторы также включены, например, мышинные промоторы *hox*-гена (Kessel and Gruss, *Science* 249: 374-379, 1990) и промотор α -фетопротеина (Campes and Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546, 1989).

Другой аспект способов согласно настоящему изобретению относится к клеткам-хозяевам, в которые был встроен рекомбинантный вектор экспрессии согласно технологии по настоящему изобретению. Термины "клетка-хозяин" и "рекомбинантная клетка-хозяин" применяются взаимозаменяемо в настоящей заявке. Необходимо понимать, что такие термины относятся не только к конкретной клетке субъекта, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку конкретные модификации могут происходить в последующих поколениях благодаря мутациям или влиянию внешней среды, такое потомство может фактически не быть идентичным исходной клетке, но все еще включено в объем термина при использовании в настоящей заявке.

Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотную или эукариотную клетку. Например, антитело против А33 может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых, клетках дрожжей или млекопитающих. Клетки млекопитающих являются подходящим хозяином для экспрессии сегментов нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты (см. Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники был разработан ряд подходящих клеточных линий-хозяев, которые способны секретировать интактные гетерологичные белки и включают линию клеток яичника китайского хомячка (СНО), различные клеточные линии COS, клетки HeLa, L-клетки и клеточные линии миеломы. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, клетки представляют собой не человеческие клетки. Векторы экспрессии для указанных клеток могут включать экспрессию контрольных последовательностей, таких как ориджин репликации, промотор, энхансер и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты РНК-сплайсинга, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986). Иллюстративные последовательности контроля экспрессии представляют собой промоторы, происходящее из эндогенных генов, цитомегаловируса, вируса SV40, аденовируса, бычьего вируса папилломы и т.д. (Co et al., *J Immunol.* 148: 1149, 1992). Другие подходящие клетки-хозяева известны специалисту в данной области техники.

ДНК-вектор можно вводить в прокариотные или эукариотные клетки с помощью стандартных методов трансформации или трансфекции. Предполагается, что при использовании в настоящем изобретении термины "трансформация" и "трансфекция" относятся к разнообразным известным в данной области техники методам введения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая копреципитацию фосфатом кальция или хлоридом кальция, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, липофекцию, электропорацию, биолистику или вирусную трансфекцию. Другие методы, применяемые для трансформации клеток млекопитающих, включают применение полибрана, слияние протопластов, использование липосом, электропорации и микроинъекции (см., в целом, Sambrook et al., *Molecular Cloning*). Подходящие способы трансформации или трансфекции клеток-хозяев можно найти в источнике: Sambrook, et al. (*MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) и других лабораторных инструкциях. Векторы, содержащие интересующие сегменты ДНК, могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов в зависимости от типа клетки-хозяина.

Известно, что в случае стабильной трансфекции клеток млекопитающих в зависимости от используемого вектора экспрессии и метода трансфекции только небольшая фракция клеток способна встраивать чужеродную ДНК в свой геном. Для идентификации и выбора указанных способных к встраиванию чужеродной ДНК клеток ген, кодирующий селективный маркер (например, ген устойчивости к антибиотикам) в целом вводят в клетки-хозяева наряду с интересующим геном. Различные селективные маркеры включают маркеры, которые предоставляют устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин и метотрексат. Нуклеиновую кислоту, кодирующую селективный маркер, можно вводить в клетку-хозяина в том же векторе, что и вектор, кодирующий антитело против А33, или можно вводить на отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфицированные введенной нуклеиновой кислотой, можно

идентифицировать путем селекции на основе лекарственного средства (например, клетки, которые встроили селективный маркерный ген, выживут, тогда как другие клетки погибнут).

Клетку-хозяина, содержащую антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, такую как прокариотная или эукариотная клетка-хозяин в культуре, можно использовать для продукции (т.е. экспрессии) рекомбинантного антитела против А33. Согласно одному варианту реализации изобретения, способ включает культивирование клетки-хозяина (в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий антитело против А33) в подходящей среде таким образом, что происходит продукция антитела против А33. Согласно другому варианту реализации изобретения, способ также включает этап выделения антитела против А33 из среды или указанной клетки-хозяина. После экспрессии собранные антитела против А33, например, антитела против А33 или антитело против А33-родственных полипептидов, очищают из культуральной среды и клеток-хозяев. Антитело против А33 может быть очищено в соответствии со стандартными процедурами в данной области техники, включая очистку с помощью ВЭЖХ, колоночной хроматографии, электрофореза в геле и т.д. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против А33 продуцируется в организме-хозяине с помощью метода в соответствии с Боссом и др. (Boss et al., патент США № 4 816 397). Как правило, цепи антитела против А33 экспрессируются с сигнальными последовательностями и, таким образом, высвобождаются в культуральную среду. Однако если цепи антитела против А33 не секретируются клетками-хозяевами в естественных условиях, указанные цепи антитела против А33 можно высвободить путем обработки слабым детергентом. Очистка рекомбинантных полипептидов хорошо известна в данной области техники и включает преципитацию сульфатом аммония, метод очистки аффинной хроматографией, колоночную хроматографию, метод ионообменной очистки, электрофорез в геле и т.д. (см. в целом Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела против А33, например, последовательности, кодирующие антитело против А33, могут быть встроены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке указанного трансгенного животного. См., например, патенты США № 5 741 957, 5 304 489 и 5 849 992. Подходящие трансгены включают трансгены, кодирующие последовательности легких и/или тяжелых цепей, функционально связанные с промотором и энхансером из специфического для молочной железы гена, такого как ген казеина или Р-лактоглобулина. Для получения трансгенных животных указанные трансгены можно вводить путем микроинъекции в оплодотворенные яйцеклетки или можно встраивать в геном эмбриональных стволовых клеток и переносить ядра таких клеток в яйцеклетки с удаленными ядрами.

Одноцепочечные антитела. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечное антитело против А33. В соответствии с технологией согласно настоящему изобретению, методы могут быть адаптированы для продукции одноцепочечных антител, специфичных в отношении белка А33 (см., например, патент США № 4,946,778). Примеры методов, которые могут применяться для производства одноцепочечных Fv-фрагментов и антител согласно технологии по настоящему изобретению, включают методы, описанные в патентах США № 4 946 778 и 5 258 498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88, 1991; Shu, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7995-7999, 1993; и Skerrae et al., Science 240: 1038-1040, 1988.

Химерные и гуманизированные антитела. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело против А33. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой гуманизированные антитело против А33. Согласно одному варианту реализации технологии согласно настоящему изобретению, антитело-"донор" и антитело-"акцептор" представляют собой моноклональные антитела из различных видов. Например, антитело-"акцептор" представляет собой антитело человека (для минимизации его антигенности у человека), в случае чего полученное антитело с привитыми CDR называется "гуманизированным" антителом.

Рекомбинантные антитела против А33, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, содержащие как части человеческого, так и не человеческого антитела, могут быть созданы с применением стандартных методов рекомбинантной ДНК и находятся в пределах объема технологии согласно настоящему изобретению. Для некоторых вариантов применения, включая *in vivo* применение у человека антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, а также применение указанных агентов в анализах обнаружения *in vitro*, возможно применять химерные или гуманизированные антитела против А33. Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены с помощью методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники. Такие применимые способы включают, например, но не ограничиваются указанными, способы, описанные в международной заявке на патент № PCT/US86/02269; патенте США № 5 225539; европейском патенте № 184187; европейском патенте № 171496; европейском патенте № 173494; публикации международной заявки WO 86/01533; патентах США № 4,816,567; 5,225,539; европейском патенте № 125023; Better, et al., 1988. Science 240: 1041-1043; Liu, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu, et al., 1987. J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura, et al., 1987.

Cancer Res. 47: 999-1005; Wood, et al., 1985. Nature 314: 446-449; Shaw, et al., 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi, et al. (1986) BioTechniques 4: 214; Jones, et al., 1986. Nature 321: 552-525; Verhoeyan, et al., 1988. Science 239: 1534; Morrison, Science 229: 1202, 1985; Oi et al., BioTechniques 4: 214, 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989; патенте США № 5,807,715; и Beidler, et al., 1988. J. Immunol. 141: 4053-4060. Например, антитела могут быть гуманизированы с применением разнообразных методов, включая прививку CDR (европейский патент EP 0 239 400; публикация международной патентной заявки WO 91/09967; патенты США № 5,530,101; 5,585,089; 5,859,205; 6,248,516; европейский патент EP460167), винирование и ремоделирование поверхности (европейский патент EP 0 592 106; европейский патент EP 0 519 596; Padlan E. A., Molecular Immunology, 28: 489-498, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering 7: 805-814, 1994; Roguska et al., PNAS 91: 969-973, 1994) и "перетасовку" цепей (патент США № 5 565 332). Согласно одному варианту реализации изобретения, кДНК кодирующая мышинное моноклональное антитело против А33, переваривают с помощью рестриционного фермента, выбранного для специфического удаления последовательности, кодирующей константную область Fc, которую замещают на эквивалентную часть кДНК, кодирующую константную область Fc человека (см. Robinson et al., PCT/US86/02269; Akira et al., заявку на европейский патент 184,187; Taniguchi, заявку на европейский патент 171,496; Morrison et al., заявку на европейский патент 173,494; Neuberger et al., публикацию международной патентной заявки WO 86/01533; Cabilly et al. патент США № 4,816,567; Cabilly et al., заявку на европейский патент 125,023; Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al. (1987) J Immunol 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449; и Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; патент США № 6,180,370; патенты США № 6,300,064; 6,696,248; 6,706,484; 6,828,422).

Согласно одному варианту реализации изобретения, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает конструирование гуманизированных антител против А33, которые с низкой вероятностью вызывают у человека ответ против мышинного антитела (здесь и далее называемый "НАМА"), при сохранении эффективной эффекторной функции антитела. При использовании в настоящей заявке термины "человеческий" и "гуманизированный" в отношении антител относятся к любому антителу, которое, как ожидается, вызывает терапевтически переносимый слабый иммуногенный ответ у субъекта, представляющего собой человека. Согласно одному варианту реализации изобретения, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает гуманизированные антитела против А33, тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов.

CDR-антитела. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой CDR-антитело против А33. В целом, антитела-"доноры" и антитела-"акцепторы", применяемые для создания CDR антител против А33, представляют собой моноклональные антитела из различных видов, как правило, антитело-"акцептор" представляет собой человеческое антитело (для минимизации его антигенности у человека), в этом случае полученное в результате антитело с привитыми CDR называется "гуманизированным" антителом. Прививать можно единственную CDR-область (или даже части единственной CDR) в пределах единственного V_H или V_L -участка антитела-"акцептора" или можно прививать множество CDR (или их частей) в пределах одного или обоих из V_H и V_L . Часто все три CDR-области из всех вариабельных доменов антитела-"акцептора" замещают на соответствующие CDR "донора", несмотря на необходимость замены только такого количества CDR, которое необходимо для обеспечения подходящего связывания с белком А33 полученного антитела с привитыми CDR. Способы создания антител с привитыми CDR и гуманизированных антител описаны в источниках: Queen et al. патенты США № 5,585,089; № 5,693,761; США № 5,693,762; и Winter, патент США № 5,225,539 и европейский патент EP 0682040. Способы, применимые для получения полипептидов V_H и V_L , описаны в источниках: Winter et al., патенты США № 4 816 397; 6 291 158; 6 291 159; 6 291 161; 6 545 142; европейский патент EP 0368684; EP0451216; и EP0120694.

После выбора подходящих кандидатов каркасной области из того же семейства и/или того же члена семейства, любую или обе из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи получают путем прививки CDR из исходных видов в гибридные каркасные области. Сборку гибридных антител или фрагментов гибридных антител, имеющих гибридные вариабельные области цепи, применительно к любому из указанных выше аспектов можно осуществлять с применением стандартных способов, известных специалисту в данной области техники. Например, последовательности ДНК, кодирующие гибридные вариабельные домены, описанные в настоящей заявке (т.е. каркасные области на основе видов-мишеней и областей CDR из исходного вида) можно получать путем синтеза олигонуклеотидов и/или ПНР. Нуклеиновая кислота, кодирующая CDR-область, также может быть выделена из антител исходного вида с применением подходящих рестриционных ферментов и лигирована в каркас вида-мишени путем лигирования с помощью подходящих лигирующих ферментов. В качестве альтернативы, каркасные области вариабельных цепей антитела исходного вида можно изменять с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Поскольку гибриды конструируют из выбранных с множеством кандидатов, соответствующих каждой каркасной области, существует множество комбинаций последовательностей, которые поддаются конструированию в соответствии с принципами, описанными в настоящей заявке. Соответственно, могут

быть собраны библиотеки гибридов, содержащие члены с различными комбинациями отдельных каркасных областей. Такие библиотеки могут представлять собой электронные коллекции в виде баз данных последовательностей или физические коллекции гибридов.

Указанный процесс, как правило, не изменяет FR антитела-"акцептора", фланкирующие привитые CDR. Тем не менее, специалист в данной области иногда может улучшать антигенсвязывающую аффинность полученного антитела против A33 с привитыми CDR путем замены определенных остатков данного FR, чтобы сделать FR более подобным соответствующему FR антитела-"донора". Подходящие положения замен включают аминокислотные остатки, смежные с CDR, или остатки, способные взаимодействовать с CDR (см., например, патент США 5,585,089, в частности, столбцы 12-16). Специалист в данной области техники также может начать с FR "донора" и модифицировать ее таким образом, чтобы указанная область обладала большим сходством с FR "акцептора" или человеческой консенсусной FR-областью. Методы создания этих модификаций известны в данной области техники. В частности, если полученная FR соответствует человеческой консенсусной FR в этом положении или, по меньшей мере, на 90% или более идентична указанной консенсусной FR, такие модификации не могут значительно повысить антигенность полученного модифицированного антитела против A33 с привитыми CDR по сравнению с тем же самым антителом, содержащим полностью человеческую FR-область.

Биспецифичные антитела (BsAb). Биспецифичное антитело представляет собой антитело, которое связывается одновременно с двумя мишенями, которые имеют разную структуру, например, двумя разными антигенами-мишенями, двумя разными эпитопами на одном и том же антигене-мишени или гаптеном и антигеном-мишенью или эпитопом на антигене-мишени. BsAb можно получать, например, путем соединения тяжелых цепей и/или легких цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же или разных антигенов. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, с точки зрения молекулярной функции биспецифичный связывающий агент связывает один антиген (или эпитоп) на одном из двух связывающих плеч (одна пара VH/VL) и связывает другой антиген (или эпитоп) на своем втором плече (другая пара VH/VL). Согласно данному определению, биспецифичный связывающий агент имеет два разных антигенсвязывающих плеча (как по специфичности, так и по CDR) и является моновалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

Биспецифичные антитела (BsAb) и биспецифичные фрагменты антител (BsFab) согласно технологии по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно плечо, которое специфично связывается, например, с A33, и по меньшей мере одно другое плечо, которое специфично связывается со вторым антигеном-мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, второй антиген-мишень представляет собой антиген или эпитоп В-клетки, Т-клетки, миелоидной клетки, плазматической клетки или тучной клетки. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно конкретным вариантам реализации изобретения, второй антиген-мишень выбран из группы, состоящей из CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, гамма/дельта-TCR, НКp46 и KIR. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, BsAb способны связываться опухолевыми клетками, которые экспрессируют антиген A33 на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, BsAb были сконструированы таким образом, чтобы способствовать уничтожению опухолевых клеток путем направления (или рекрутирования) цитотоксических Т-клеток к месту опухоли. Другие примеры BsAb включают антитела с первым антиген-связывающим сайтом, специфичным в отношении A33, и вторым антиген-связывающим сайтом, специфичным в отношении низкомолекулярного гаптена (например, DTP A, IMP288, DOTA, DOTA-Bn, DOTA-десферриоксиамины, других DOTA-хелатов, описанных в настоящей заявке, биотина, флуоресцеина или гаптенных, описанных в источнике Goodwin, D A. et al., 1994, *Cancer Res.* 54(22):5937-5946).

Различные биспецифичные белки слияния можно получать с применением методов молекулярной инженерии. Например, были сконструированы BsAb, которые используют целый каркас иммуноглобулина (например, IgG), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичный белок слияния является дивалентным, содержащим, например, scFv с единственным сайтом связывания для одного антигена и Fab фрагмент с единственным сайтом связывания для второго антигена. Согласно другим вариантам реализации изобретения, биспецифичный белок слияния является тетравалентным и содержит, например, иммуноглобулин (например, IgG) с двумя сайтами связывания для одного антигена и двумя идентичными scFv для второго антигена. Было показано, что BsAb, состоящие из двух scFv-единиц в тандеме, являются клинически успешным биспецифичным форматом антител. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, были сконструированы BsAb, содержащие два одноцепочечных варибельных фрагмента (scFvs) в тандеме таким образом, что scFv, которое связывается с опухолевым антигеном (например, A33), связан с scFv, который привлекает Т-клетки (например, путем связывания CD3). Вследствие этого Т-клетки рекрутируются к месту опухоли таким образом, что они могут опосредовать цитотоксическое уничтожение опухолевых клеток. См., например, Dreier et al., *J. Immunol.* 170:4397-4402 (2003); Bargou et al., *Science* 321 :974- 977 (2008)).

Недавно разработанные способы получения BsAb включают сконструированные рекомбинантные моноклональные антитела, которые содержат дополнительные цистеиновые остатки так, что указанные

антитела обладает более сильным перекрестным связыванием по сравнению с более распространенными изотипами иммуноглобулина. См., например, FitzGerald et al, *Protein Eng.* 10(10): 1221-1225 (1997). Другой подход представляет собой инженерию рекомбинантных белков слияния, связывающих два или более различных одноцепочечных антитела или сегментов фрагмента антитела с необходимостью двойной специфичности. См., например, Coloma et al., *Nature Biotech.* 15:159-163 (1997). Разнообразные биспецифичные белки слияния можно получать с применением молекулярной инженерии.

Биспецифичные белки слияния, связывающие два или более различных одноцепочечных антитела или фрагментов антитела получают сходным образом. Рекомбинантные способы можно использовать для получения разнообразных белков слияния. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации изобретения, BsAb в соответствии с технологией согласно настоящему изобретению содержит иммуноглобулин, который содержит тяжелую цепь и легкую цепь и scFv. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации изобретения, scFv связан с С-концом тяжелой цепи любого А33-иммуноглобулина, описанного в настоящей заявке. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации изобретения, scFv связаны с С-концом легкой цепи любого А33-иммуноглобулина, описанного в настоящей заявке. Согласно различным вариантам реализации изобретения, scFv связаны с тяжелыми или легкими цепями через линкерную последовательность. Подходящие линкерные последовательности для соединения внутри рамки считывания тяжелой цепи Fd и scFv вводят в домены V_L и V_{каппа} посредством ПЦР-реакций. ДНК фрагмент, кодирующий scFv, затем лигируют в Staging-вектор, содержащий ДНК последовательность, кодирующую домен CH1. Полученный конструкт scFv-CH1 вырезают и лигируют в вектор, содержащий ДНК последовательность, кодирующую область V_H антитела А33. Полученный в результате вектор можно использовать для трансфекции подходящей клетки-хозяина, такой как клетка млекопитающего, для экспрессии биспецифичного белка слияния.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, линкер составляет, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, линкер характеризуется тем, что имеет тенденцию не принимать жесткую трехмерную структуру, а скорее обеспечивает гибкость полипептиду (например, первому и/или второму сайтам связывания антигена). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, используемый линкер в BsAb, описанном в настоящей заявке, выбирается на основании специфических свойств, присущих BsAb, таких как, например, повышение стабильности. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, BsAb согласно технологии по настоящему изобретению содержит линкер G₄S. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации изобретения, BsAb согласно технологии по настоящему изобретению содержит линкер (G₄S)_n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15 или более.

Fc модификации. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению содержат вариантную область Fc, где указанная вариантная область Fc содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию по сравнению с областью Fc дикого типа (или исходной областью Fc) таким образом, что указанная молекула имеет измененную аффинность в отношении Fc-рецептора (например, FcγR), при условии что указанная вариантная Fc-область не содержит замены в положениях, непосредственно контактирующих с Fc-рецептором по результатам кристаллографического и структурного анализа взаимодействия Fc/рецептор Fc, таких как анализы, описанные в источнике: Sonderrmann et al., *Nature*, 406: 267-273 (2000). Примеры положений в области Fc, которые осуществляют прямой контакт с рецептором Fc, таким как FcγR, включают аминокислоты 234-239 (шарнирная область), аминокислоты 265-269 (В/С-петля), аминокислоты 297-299 (С7Е-петля) и аминокислоты 327-332 (F/G-петля).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению обладает измененной аффинностью в отношении активирующих и/или ингибирующих рецепторов, имеющих вариантную область Fc с одной или более аминокислотными модификациями, где указанная одна или более аминокислотных модификаций представляют собой замену N297 на аланин или замену K322 на аланин.

Модификации гликозилирования. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению содержат область Fc с вариантным гликозилированием по сравнению с исходной областью Fc. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, вариантное гликозилирование включает отсутствие фукозы; согласно некоторым вариантам реализации изобретения, вариантное гликозилирование является результатом экспрессии в клетках СНО с недостаточностью GnT1.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела согласно технологии по настоящему изобретению могут содержать модифицированный сайт гликозилирования по сравнению с подходящим референсным антителом, которое связывается с интересующим антигеном (например, А33), без изменения функциональности указанного антитела, например, активности связывания с антигеном. При использовании в настоящем изобретении "сайты гликозилирования" включают любую специфичную аминокислотную последовательность антитела, к которой специфично и ковалентно присоединяется

олигосахарид (т.е. углеводов, содержащий два или более простых сахара, связанных вместе).

Олигосахаридные боковые цепи, как правило, связаны с каркасом антитела через N- или O-связи. N-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. O-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к гидроксикарбонильной группе, например серину, треонину. Например, Fc-гликоформ (huA33-IgG1n), в котором отсутствуют определенные олигосахариды, включая фукозу и концевой N-ацетилглюкозамин, может продуцироваться в специальных клетках CHO и проявлять повышенную эффекторную функцию ADCC.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, содержание углеводов в композиции на основе иммуноглобулина, описанной в настоящей заявке, модифицируют путем добавления или удаления сайта гликозилирования. Способы модификации содержания углеводов в антителах хорошо известны в данной области и включены в технологию согласно настоящему изобретению (см., например, патент США № 6218149; европейский патент EP 0359096B1; публикацию заявки на патент США № 2002/0028486; публикацию международной патентной заявки WO 03/035835; публикацию заявки на патент США № 2003/0115614; патент США № 6218149; патент США № 6472511; все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, содержание углеводов в антителе (или его соответствующей части или компоненте) модифицируют путем удаления одного или нескольких эндогенных углеводных фрагментов антитела. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации изобретения, технология по настоящему изобретению включает удаление сайта гликозилирования Fc-области антитела путем модификации положения 297 с аспарагина на аланин.

Сконструированные гликоформы могут быть применимы для множества целей, включая, но не ограничиваясь указанными, усиление или уменьшение эффекторной функции. Сконструированные гликоформы могут быть получены любым способом, известным специалисту в данной области, например с использованием сконструированных или вариантных экспрессионных штаммов, путем коэкспрессии с одним или несколькими ферментами, например DI N-ацетилглюкозаминилтрансферазой III (GnTIII), путем экспрессии молекулы, содержащей область Fc в различных организмах или клеточных линиях из различных организмов, или путем модификации углевода (углеводов) после того, как молекула, содержащая область Fc, была экспрессирована. Способы получения инженерных гликоформ известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, методы, описанные в источниках: Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; патенте США № 6,602,684; заявках на патенты США № 10/277,370; 10/113,929; публикациях международных заявок WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; WO 02/30954A1; технологии POTILLEGENT™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); инженерной технологии гликозилирования GLYCOMAB™ (GLYCART biotechnology AG, Цюрих, Швейцария), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. См., например, публикацию международной патентной заявки WO 00/061739; публикацию заявки на патент США № 2003/0115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

Белки слияния. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против A33 согласно технологии по настоящему изобретению представляет собой белок слияния. Антитело против A33 согласно технологии по настоящему изобретению при слиянии со вторым белком можно использовать в качестве антигенной метки. Примеры доменов, которые можно сливать с полипептидами, включают не только гетерологичные сигнальные последовательности, но также другие гетерологичные функциональные области. Слияние не обязательно должно быть прямым, но может происходить через линкерные последовательности. Более того, белки слияния согласно технологии по настоящему изобретению также могут быть сконструированы для улучшения характеристик антител против A33. Например, область дополнительных аминокислот, в частности, заряженных аминокислот, можно добавлять к N-концу антитела против A33 для улучшения стабильности и устойчивости во время очистки из клетки-хозяина или последующей обработки и хранения. Кроме того, пептидные фрагменты можно добавлять к антителу против A33 для облегчения очистки. Такие области можно удалять перед окончательным получением антитела против A33. Добавление пептидных фрагментов для облегчения обработки полипептидов представляет собой изученные и рутинные методы в данной области техники. Антитело против A33 согласно технологии по настоящему изобретению можно сливать с маркерными последовательностями, такими как пептид, который способствует очистке слитого полипептида. Согласно выбранным вариантам реализации изобретения, маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид, такой как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в источнике Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989, например, гексагистидин обеспечивает удобную очистку белка слияния. Другая пептидная метка, применимая для очистки - метка "HA" - , соответствует эпитопу, происходящему из белка гемагглютинина вируса гриппа. Wilson et al., Cell 37: 767, 1984.

Таким образом, любой из указанных выше белков слияния может быть сконструирован с использо-

ванием полинуклеотидов или полипептидов согласно технологии по настоящему изобретению. Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, белки слияния, описанные в настоящей заявке, имеют повышенное время полужизни *in vivo*.

Белки слияния, имеющие связанные дисульфидными связями димерные структуры (благодаря IgG), могут быть более эффективными в связывании и нейтрализации других молекул по сравнению с мономерным секретированным белком или фрагментом белка отдельно (Fountoulakis et al., *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995).

Сходным образом, в европейском патенте EP-A-0 464 533 (канадский эквивалент 2045869) описаны белки слияния, содержащие различные части константной области молекул иммуноглобулина вместе с другим человеческим белком или его фрагментом. Во многих случаях Fc-часть в белке слияния является благоприятной для терапии и диагностики и, таким образом, может приводить, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (см. европейский патент EP-A 0232 262). В качестве альтернативы, может быть желательным удаление или модифицирование Fc-части после того, как белок слияния был экспрессирован, вывлечен и очищен. Например, Fc-часть может препятствовать терапии и диагностике, если белок слияния применяется в качестве антигена для иммунизации. Для поиска лекарственных средств человеческие белки, например, такие как hIL-5, сливают с Fc-частями для высокоэффективных скрининговых анализов для идентификации антагонистов hIL-5. Bennett et al., *J. Molecular Recognition* 8: 52-58, 1995; Johanson et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471, 1995.

Меченные антитела против ASS. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против A33 согласно технологии по настоящему изобретению соединяют с метящим фрагментом, т.е. поддающейся обнаружению группой. Конкретная метка или выявляемая группа, конъюгированная с антителом против A33, не является критичным аспектом технологии, при условии, что она значительно не препятствует специфичному связыванию антитела против A33 согласно технологии по настоящему изобретению с белком A33. Поддающаяся обнаружению группа может представлять собой любой материал, обладающий выявляемым физическим или химическим свойством. Такие поддающиеся обнаружению метки хорошо разработаны в области иммуноанализов и визуализации. В целом, почти любая метка, применимая в таких способах, может применяться согласно технологии по настоящему изобретению. Таким образом, метка представляет собой любую композицию, поддающуюся обнаружению с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, электрических, оптических или химических способов. Метки, применимые при практическом осуществлении технологии согласно настоящему изобретению, включают магнитные гранулы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, флуоресцеинизотиоцианат, техасский красный, родамин и т.д.), радиометки (например, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹²¹I, ¹³¹I, ¹¹²In, ^{99m}Tc), другие визуализирующие агенты, такие как микропузырьки (для ультразвуковой визуализации), ¹⁸F, ¹¹C, ¹⁵O (для позитронно-эмиссионной томографии), ^{99m}Tc, ¹¹¹In (для однофотонной эмиссионной томографии), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и другие обычно используемые в ИФА метки) и калориметрические метки, такие как коллоидное золото или гранулы из цветного стекла или пластика (например, полистирола, полипропилена, латекса и т.д.). Все патенты, которые описывают применение таких меток, включают патенты США № 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 и 4,366,241, каждый из которых полностью и для любых целей включен в настоящую заявку посредством ссылки. См. также Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR).

Метка может быть соединена прямо или непрямо с желаемым компонентом анализа в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники. Как указано выше, можно использовать широкое разнообразие меток, при этом выбор метки зависит от факторов, таких как необходимая чувствительность, простота конъюгирования с соединением, требуемая стабильность, доступное оборудование и возможности утилизации.

Нерадиоактивные метки часто присоединяют непрямыми способами. В целом, молекулы лиганда (например, биотин) ковалентно присоединяют к молекуле. Затем лиганд связывается с молекулой, направленной против указанного лиганда (например, стрептавидином), которая либо само по себе поддается обнаружению, либо ковалентно связана с сигнальной системой, такой как поддающийся обнаружению фермент, флуоресцентное соединение или хемилюминесцентное соединение. Можно применять ряд лигандов и направленных против лигандов соединений. Когда существует природное направленное против лиганда соединение (например, как в случае биотина, тироксина и кортизола), указанный лиганд можно использовать вместе с меченым соединением. В качестве альтернативы, любое гаптенное или антигенное соединение можно использовать в комбинации с антителом, например, антителом против A33.

Молекулы также можно конъюгировать прямо с генерирующими сигнал соединениями, например, путем конъюгирования с ферментом или флуорохромом. Интересующие ферменты, применимые в качестве меток, в первую очередь представляют собой гидролазы, в частности, фосфатазы, эстеразы и гликозидазы или оксидоредуктазы, в частности, пероксидазы. Флуоресцентные соединения, применимые в качестве метящих фрагментов, включают, но не ограничиваются указанными, например, флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон и т.д. Хемилюминесцентные соединения, применимые в качестве метящих фрагментов, включают, но не ограничиваются указанными,

например, люциферин и 2,3-дигидрофталазиндионы, например, люминол. Для обзора различных систем мечения или сигнал-продуцирующих систем, которые могут применяться, см. патент США № 4,391,904.

Способы обнаружения (детектирования) меток хорошо известны специалистам в данной области техники. Таким образом, например, когда метка представляет собой радиоактивную метку, способы обнаружения включают сцинтилляционный счетчик или фотопленку, как в случае автордиографии. Когда метка представляет собой флуоресцентную метку, ее можно выявлять путем возбуждения флуорохрома подходящей длиной световой волны и выявлять полученную в результате флуоресценцию. Флуоресценцию можно выявлять визуально с помощью фотопленки, путем применения детекторов электронов, таких как устройства с зарядовой связью (CCD) или фотоумножители и т.д. Сходным образом, ферментативные метки можно выявлять путем обеспечения подходящих субстратов для фермента и детектирование полученного продукта реакции. Наконец, простые колориметрические метки можно выявлять просто путем наблюдения цвета, связанного с меткой. Таким образом, в различных анализах на основе индикаторных полосок, конъюгированное золото часто приобретает розовый цвет, тогда как при использовании различных конъюгированных гранул указанные гранулы приобретают цвет.

Некоторые форматы анализов не требуют применения меченных компонентов. Например, анализы агглютинации можно использовать для обнаружения присутствия антител-мишеней, например, антител против А33. В данном случае, покрытые антигеном частицы агглютинируются образцами, содержащими антитела-мишени. При указанном формате нет необходимости метить какой-либо из компонентов, присутствие антитела-мишени выявляется путем простой визуальной оценки.

В. Идентификация и характеристика антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Способы идентификации и/или скрининга антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению. Способы, применимые для идентификации и скрининга антител против полипептидов А33 на предмет антител, обладающих желаемой специфичностью в отношении белка А33, включают любые иммунологически-опосредованные методы, известные в данной области техники. Компоненты иммунного ответа можно выявлять *in vitro* с помощью различных способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, (1) цитотоксические Т-лимфоциты можно инкубировать с радиоактивно мечеными клетками-мишенями, и лизис указанных клеток-мишеней выявляется по высвобождению радиоактивности; (2) хелперные Т-лимфоциты можно инкубировать с антигенами и антигеном-презентирующими клетками и синтез, и секреция цитокинов измеряется с помощью стандартных способов (Windhagen A et al., *Immunity*, 2: 373-80, 1995); (3) антиген-презентирующие клетки можно инкубировать с целым белковым антигеном, и презентацию антигена на МНС выявляют либо по анализам активации Т-лимфоцитов, либо с помощью биофизических методов (Harding et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989); (4) тучные клетки можно инкубировать с реагентами, которые перекрестно сшивают их Fc-эпсилон рецепторы, и высвобождение гистамина измеряют по ферментативному иммуноанализу (Siganian et al., *TIPS*, 4: 432-437, 1983); и (5) твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Сходным образом, продукты иммунного ответа в любом модельном организме (например, мыши) или у субъекта, представляющего собой человека, также можно выявлять с помощью различных способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, (1) продукцию антител в ответ на вакцинацию можно легко выявлять с помощью стандартных способов, используемых в настоящее время в клинических лабораториях, например, ИФА; (2) миграцию иммунных клеток к местам воспаления можно выявлять путем нанесения царапин на поверхности кожи и размещения стерильного контейнера для захвата мигрирующих клеток на месте царапин (Peters et al., *Blood*, 72: 1310-5, 1988); (3) пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) в ответ на митогены или смешанную реакцию лимфоцитов можно измерять с использованием ³H-тимидина; (4) фагоцитарную способность гранулоцитов, макрофагов и других фагоцитов в МКПК можно измерять путем помещения МКПК в лунки вместе с мечеными частицами (Peters et al., *Blood*, 72: 1310-5, 1988); и (5) дифференцировку клеток иммунной системы можно измерять путем мечения МКПК антителами к молекулам CD, такими как CD4 и CD8, и измерения фракции МКПК, экспрессирующих указанные маркеры.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению выбирают с применением дисплея пептидов А33 на поверхности реплицируемых единиц генетической информации. См., например, патенты США № 5,514,548; 5,837,500; 5,871,907; 5,885,793; 5,969,108; 6,225,447; 6,291,650; 6,492,160; европейские патенты EP 585 287; EP 605522; EP 616640; EP 1024191; EP 589 877; EP 774 511; EP 844 306. Были описаны способы, применимые для продукции/селекции нитевидной бактериофаговой частицы, содержащей фагмидный геном, кодирующий молекулу связывания, обладающую желаемой специфичностью. См., например, европейский патент EP 774 511; патенты США US 5871907; US 5969108; US 6225447; US 6291650; US 6492160.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению выбирают с применением дисплея пептидов А33 на поверхности дрожжевой клетки-хозяина. Способы, применимые для выделения scFv-полипептидов с помощью дисплея дрожжевой поверхности, были описаны в источнике: Kieke et al., *Protein Eng.* 1997 Nov; 10(11): 1303-10.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии

по настоящему изобретению выбирают с применением рибосомного дисплея. Способы, применимые для идентификации лигандов в пептидных библиотеках с применением рибосомного дисплея были описаны в источниках: Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-26, 1994; Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-42, 1997.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению выбирают с применением тРНК-дисплея пептидов А33. Способы, применимые для селекции *in vitro* лигандов с применением тРНК-дисплея, были описаны Мерриманом и др. (Merryman et al., Chem. Biol. 9: 741-46, 2002).

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению выбирают с применением РНК-дисплея. Способы, применимые для выбора пептидов и белков с применением библиотек РНК-дисплея были описаны Робертсом и др. и Немото и др. (Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-302, 1997; и Nemoto et al., FEBS Lett., 414: 405-8, 1997). Способы, применимые для выбора пептидов и белков с применением библиотек дисплея природных РНК были описаны Франкелем и др. (Frankel et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 13: 506-12, 2003).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению экспрессируют в периплазме грамм-отрицательных бактерий и смешивают с меченым белком А33. См. публикацию международной патентной заявки WO 02/34886. В клонах, экспрессирующих рекомбинантные полипептиды с аффинностью в отношении белка А33, концентрация меченого белка А33, связанного с антителом против А33, повышается и позволяет выделять клетки из оставшейся части библиотеки, как описано в источнике: Harvey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 22: 9193-98 2004 и U.S. Pat. Publication No. 2004/0058403.

Предполагается, что после селекции желаемых антител против А33 указанные антитела можно получать в большом объеме с помощью любого метода, известного специалисту в данной области техники, например, экспрессии в прокариотной или эукариотной клетке и т.д. Антитела против А33, которые представляют собой, например, но не ограничиваются указанными, гибридные антитела против А33 или их фрагменты, можно получать с использованием стандартных методов конструирования вектора экспрессии, который кодирует тяжелую цепь антитела, в которой CDR-область и, если необходимо, минимальная часть каркаса вариабельной области, которые требуются для сохранения специфичности связывания антитела из исходного вида (сконструированного в соответствии с методиками, описанными в настоящей заявке), происходит из антитела исходного вида, а остальная часть антитела получена из иммуноглобулина вида-мишени, с которым можно проводить манипуляции, как описано в настоящей заявке, с получением, таким образом, вектора для экспрессии гибридной тяжелой цепи антитела.

Измерение связывания А33. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, анализ связывания А33 относится к формату анализа, в котором белок А33 и антитело против А33 смешивают в условиях, подходящих для связывания между указанным белком А33 и антителом против А33 и количественной оценки связывания между ними. Количественное связывание сравнивается с подходящим контролем, который может представлять собой количественное связывание в отсутствие белка А33, количественное связывание в присутствии неспецифичной композиции иммуноглобулина, или в отсутствие белка А33 и в присутствии неспецифичной композиции иммуноглобулина.

Количественное связывание можно оценивать любым подходящим способом. Методы анализа связывания включают, например, ИФА, радиоиммуноанализ, сцинтилляционный анализ близости, анализ переноса энергии флуоресценции, жидкостную хроматографию, анализ мембранного фильтрования и т.д. Биофизические анализы для прямого измерения связывания белка А33 с антителом против А33 представляют собой, например, ядерный магнитный резонанс, флуоресценцию, флуоресцентную поляризацию, поверхностный плазмонный резонанс (чипы BIACORE) и т.д. Специфичное связывание определяют с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники, например, анализов связывания радиолигандов, ИФА, FRET, иммунопреципитации, ПИР, ЯМР (2D-ЯМР), масс-спектрометрии и т.д. Если специфичное связывание антитела против А33-кандидата по меньшей мере на 1 процент превышает связывание, наблюдаемое в отсутствие указанного антитела против А33-кандидата, указанное антитело является применимым в качестве антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Измерение нейтрализации А33. При использовании в настоящем изобретении "нейтрализация А33" относится к снижению активности и/или экспрессии белка А33 в результате связывания с антителом против А33. Способность антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению нейтрализовать активность/экспрессию А33 можно оценить *in vitro* или *in vivo* с применением методов, известных в данной области техники.

Способы применения антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Общие положения. Антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению применимы в методах, известных в данной области техники, относящихся к определению локализации и/или количественной оценке белка А33 (например, для применения в измерении уровня белка А33 в подходящих физиологических образцах, для применения в диагностических способах, для применения в визуализации полипептида и т.д.). Антитела согласно технологии по настоящему изобретению применимы

для выделения белка А33 с помощью стандартных методов, таких как аффинная хроматография или иммунопреципитация. Антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению может облегчать очистку природных иммунореактивных белков А33 из биологических образцов, например, сыворотки крови или клеток млекопитающего, а также полученных рекомбинантным путем иммунореактивных белков А33, экспрессирующихся в системе хозяина. Более того, антитела против А33 можно применять для детектирования иммунореактивного белка А33 (например, в плазме, клеточном лизате или клеточном супернатанте) для оценки количества и паттерна экспрессии иммунореактивного полипептида. Антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению можно применять в диагностических целях для отслеживания уровня иммунореактивного белка А33 в ткани как часть процедуры клинического исследования, например, для определения эффективности данного режима лечения. Как отмечено выше, детектирование можно облегчать путем соединения (т.е. физического связывания) антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению с поддающимся обнаружению веществом.

Детектирование белка А33. Пример способа определения присутствия или отсутствия иммунореактивного белка А33 в биологическом образце включает получение биологического образца от исследуемого субъекта и подверженное указанному биологическому образцу взаимодействию с антителом против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, способным выявлять иммунореактивный белок А33 таким образом, что присутствие указанного иммунореактивного белка А33 определяется в биологическом образце. Детектирование можно осуществлять с помощью поддающейся обнаружению метки, присоединенной к антителу.

Предполагается, что термин "меченное" в отношении антитела против А33 включает прямое мечение антитела путем соединения (т.е. физического связывания) поддающегося обнаружению вещества с указанным антителом, а также не прямое мечение антитела путем проведения реакции с другим соединением, которое является прямо меченным, таким как вторичное антитело. Примеры непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с применением флуоресцентно меченных вторичных антител и концевое мечение ДНК-зонда биотином таким образом, чтобы его можно было детектировать с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против А33, описанные в настоящей заявке, конъюгированы с одной или более поддающимися обнаружению метками. Для таких вариантов применения антитела против А33 могут быть мечены поддающейся обнаружению меткой путем ковалентного или нековалентного присоединения хромогенного, ферментативного, радиоизотопного, изотопного, флуоресцентного, токсичного, хемилюминесцентного агента, контрастирующего агента для ядерного магнитного резонанса или другой метки.

Примеры подходящих хромогенных меток включают диаминобензидин и 4-гидроксиазобензол-2-карбоновую кислоту. Примеры подходящих ферментативных меток включают малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, Δ -5-стероидизомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, α -глицеринфосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкоза-оксидазу, β -галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу.

Примеры подходящих радиоизотопных меток включают ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd и т.д. ^{111}In представляет собой пример изотопа, при использовании которого применяется *in vivo* визуализация, поскольку она позволяет избежать проблем, связанных с дегаденированием в печени меченных ^{125}I или ^{131}I А33-связывающих антител. Кроме того, указанный изотоп испускает более предпочтительную для визуализации энергию гамма-излучения (Perkins et al., Eur. J. Nucl. Med. 70:296-301 (1985); Carasquillo et al., J. Nucl. Med. 25:281-287 (1987)). Например, для ^{111}In , сопряженного с моноклональными антителами с 1-(*p*-изотиоцианатбензил)-ДРТА, наблюдается слабый захват в неопухолевые ткани, в частности, печень, и усиление специфичности опухолевой локализации (Esteban et al., J. Nucl. Med. 28:861-870 (1987)). Примеры подходящих нерадиоактивных изотопных меток включают ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tl и ^{56}Fe .

Примеры подходящих флуоресцентных меток включают метку ^{152}Eu , флуоресцеиновую метку, изотиоцианатную метку, родаминовую метку, фикоэритринную метку, фикоцианиновую метку, аллофикоцианиновую метку, зеленый флуоресцентный белок, *o*-фталдегидную метку и флуоресцамигиаминовую метку. Примеры подходящих меток на основе токсинов включают дифтерийных токсин, рицин и холерный токсин.

Примеры хемилюминесцентных меток включают люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридина, имидазольную метку, соль акридина, сложный эфир аксалата, люциферин, люциферазу и экворин. Примеры контрастирующих агентов для ядерного магнитного резонанса включают ядра тяжелых металлов, таких как Gd, Mn и железо.

Способ обнаружения согласно технологии по настоящему изобретению можно использовать для обнаружения присутствия иммунореактивного белка А33 в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. *In vitro* методы обнаружения иммунореактивного белка А33 включают твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, радиоиммуноанализ и иммунофлюо-

ресценцию. Более того, *in vivo* методы обнаружения иммунореактивного белка А33 включают введение субъекту меченого антитела против А33. Например, антитело против А33 может быть мечено радиоактивным маркером, присутствие и локализацию которого у субъекта можно выявлять с помощью стандартных методов визуализации. Согласно одному варианту реализации изобретения, биологический образец содержит молекулы белка А33 из исследуемого субъекта.

Иммуноанализ и визуализация. Антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению можно использовать для анализа уровня иммунореактивного белка А33 в биологическом образце (например, плазме крови человека) с применением методов на основе антитела. Например, экспрессию белка в тканях можно изучать с помощью классических методов иммуногистологии (Jalkanen, M. et al., *J. Cell. Biol.* 101: 976-985, 1985; Jalkanen, M. et al., *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096, 1987). Другие методы на основе антител, применимые для обнаружения экспрессии генов белка включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммуноанализ (РИА). Подходящие метки для анализа на основе антител известны в данной области техники и включают ферментативные метки, такие как оксидаза глюкозы, и радиоизотопы или другие радиоактивные агенты, такие как йод (^{125}I , ^{121}I , ^{131}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{112}In) и технеций ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин, родамин и зеленый флуоресцентный белок (GFP), а также биотин.

Помимо анализа уровня иммунореактивного белка А33 в биологическом образце антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению можно применять для *in vivo* визуализации А33. Антитела, применимые для указанного способа, включают антитела, поддающиеся обнаружению с помощью рентгенографии, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) или электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Для рентгенографии подходящие метки включают радиоизотопы, такие как барий или цезий, которые испускают поддающееся детектированию излучение, но не наносят очевидного вреда субъекту. Подходящие маркеры для ЯМР и ЭПР включают маркеры с поддающимся детектированию характерным спином, такие как дейтерий, который может быть включен в антитела против А33 путем мечения питательных элементов для соответствующего scFv-клона.

Субъекту вводят (например, парентерально, подкожно или внутривенно) антитело против А33, которое было мечено подходящим поддающимся обнаружению фрагментом для визуализации, таким как радиоизотоп (например, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), рентгеноконтрастное вещество или материал, поддающийся обнаружению с помощью ядерного магнитного резонанса. Специалисту в данной области техники будет понятно, что размер субъекта и используемая система визуализации будут определять количество фрагмента для визуализации, необходимое для получения диагностических изображений. В случае радиоактивного изотопного фрагмента для субъекта, представляющего собой человека, вводимая радиоактивная доза в норме составляет от 5 до 20 милликюри $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Меченое антитело против А33 затем накапливается в месте расположения клеток, которые содержат специфичный полипептид-мишень. Например, меченые антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению будут накапливаться у субъекта в клетках и тканях, в которых локализуется белок А33.

Таким образом, технология согласно настоящему изобретению обеспечивает способ диагностики медицинского состояния, который включает: (а) анализ экспрессии иммунореактивного белка А33 путем измерения связывания антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению в клетках или жидкости организма субъекта; (б) сравнение количества иммунореактивного белка А33, присутствующего в образце, со стандартным эталоном/референсным образцом, где увеличение или уменьшение уровня иммунореактивного белка А33 по сравнению со стандартом является показателем медицинского состояния.

Аффинная очистка. Антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению можно использовать для очистки иммунореактивного белка А33 из образца. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения антитела иммобилизованы на твердом носителе. Примеры таких твердых носителей включают пластики, такие как поликарбонат, сложные углеводы, такие как агароза и сефароза, акриловые смолы и такие как гранулы из полиакриламида и латекса. Методы связывания антител с такими твердыми носителями хорошо известны в данной области техники (Weir et al., "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10 (1986); Jacoby et al., *Meth. Enzym.* 34 Academic Press, N.Y. (1974)).

Простейшим способом связывания антигена с матрицей-носителем антитела является сбор гранул в колонку и пропускание раствора антигена через указанную колонку. Эффективность этого метода зависит от времени взаимодействия между иммобилизованным антителом и антигеном, которое можно увеличить путем снижения скорости потока. Иммобилизованное антитело захватывает антиген по мере его прохождения. В качестве альтернативы, антиген может взаимодействовать с матрицей-носителем антитела в результате смешивания раствора антигена с носителем (например, гранулами) и вращения или раскачивания полученной суспензии с обеспечением максимального контакта между антигеном и иммобилизованным антителом. После завершения реакции связывания суспензию наносят на колонку для сбора гранул. Гранулы промывают с использованием подходящего промывочного буфера и затем элюируют чистый или по существу чистый антиген.

Интересующее антитело или полипептид может быть конъюгировано с твердым носителем, таким

как гранула. Кроме того, первый твердый носитель, такой как гранула, также при желании может быть конъюгирован со вторым твердым носителем, который может представлять собой вторую гранулу или другой носитель, с помощью любых подходящих способов, включая способы, описанные в настоящей заявке для конъюгирования полипептида с носителем. Таким образом, любой из способов и средств конъюгации, описанных в настоящей заявке со ссылкой на конъюгирование полипептида с твердым носителем, также можно применять для конъюгирования первого носителя со вторым носителем, где указанные первый и второй носитель могут быть одинаковыми или различаться.

Подходящие линкеры, которые могут представлять собой перекрестно сшивающие агенты, для применения для конъюгирования полипептида с твердым носителем включают множество агентов, которые могут реагировать с функциональной группой, присутствующей на поверхности носителя, или с полипептидом, или с указанной функциональной группой и полипептидом. Реагенты, применимые в качестве перекрестно сшивающих агентов, включают гомобифункциональные и, в частности, гетеробифункциональные реагенты. Применимые бифункциональные перекрестно сшивающие агенты включают, но не ограничиваются указанными, N-SIAB, дималеимид, DTNB, N-SATA, N-SPDP, SMCC и 6-HYNIC. Перекрестно сшивающий агент может быть выбран для обеспечения селективно расщепляемой связи между полипептидом и твердым носителем. Например, фотолabile перекрестно сшивающий агент, такой как 3-амино(2-нитрофенил)пропионовая кислота, может быть использован в качестве средства для отщепления полипептида от твердого носителя (Brown et al., *Mol. Divers*, pp. 4-12 (1995); Rothschild et al., *Nucl. Acids Res.*, 24:351-66 (1996); патент США № 5,643,722). Другие перекрестно сшивающие реагенты хорошо известны в данной области техники (см., например, Wong (1991), выше, и Hermanson (1996), выше).

Антитело или полипептид может быть иммобилизован на твердом носителе, таком как гранула, посредством ковалентной амидной связи, образованной между гранулой, содержащей карбоксильную функциональную группу, и аминоконцом полипептида, или, наоборот, посредством ковалентной амидной связи, образованной между гранулой, содержащей функциональную аминогруппу, и карбоксиконцом полипептида. Кроме того, бифункциональный тритильный линкер можно присоединять к носителю, например, к 4-нитрофениловому активному сложному эфиру на смоле, такой как смола Ванга, с помощью аминогруппы или карбоксигруппы на смоле через аминосмолу. При использовании подхода на основе бифункционального тритильного линкера может потребоваться обработка твердого носителя летучей кислотой, такой как муравьиная кислота или трифторуксусная кислота, для обеспечения отщепления полипептида и возможности его удаления. В таком случае полипептид можно наносить в виде аппликации без использования гранул на дно лунки твердой подложки или на плоскую поверхность твердой подложки. После добавления матричного раствора полипептид можно десорбировать для проведения МС.

Гидрофобные тритильные линкеры также можно применять в качестве кислотолabile линкеров с использованием летучей кислоты или подходящего матричного раствора, например матричного раствора, содержащего 3-НРА, для отщепления аминоксвязанной тритильной группы от полипептида. Кислотолabile также может быть изменена. Например, тритил, монометокситритил, диметокситритил или триметокситритил полипептида могут быть заменены на соответствующие р-замещенные или более кислотолabile производные тритиламина, то есть тритилэфирные и тритиламинные связи могут быть созданы в полипептиде. Соответственно, полипептид может быть удален от гидрофобного линкера, например, путем нарушения гидрофобного притяжения или путем расщепления тритилэфирных или тритиламинных связей в кислых условиях, в том числе, при желании, в типичных условиях МС, где матрица, такая как 3-НРА, действует в качестве кислоты.

Ортогонально расщепляемые линкеры также могут быть применимы для связывания первого твердого носителя, например гранулы, со вторым твердым носителем или для связывания интересующего полипептида с твердым носителем. При использовании таких линкеров первый твердый носитель, например гранула, может быть селективно отщеплен от второго твердого носителя без отщепления полипептида от носителя; после этого указанный полипептид может быть позднее отщеплен от гранулы. Например, дисульфидный линкер, который может быть отщеплен с использованием восстановителя, такого как DTT, можно использовать для связывания гранулы со вторым твердым носителем, а расщепляемую кислотой бифункциональную тритильную группу можно использовать для иммобилизации полипептида на носителе. При желании, сначала может быть расщеплена связь полипептида с твердым носителем, например, при сохранении интактной связи между первым и вторым носителем. Тритильные линкеры могут обеспечивать ковалентную или гидрофобную конъюгацию и, независимо от природы конъюгации, тритильная группа легко расщепляется в кислых условиях.

Например, гранула может быть связана со вторым носителем через связующую группу, которая может быть выбрана таким образом, чтобы указанная группа имела длину и химическую природу, обеспечивающую связывание гранул с твердым носителем с высокой плотностью или связывание полипептидов с гранулами с высокой плотностью. Такая связующая группа может иметь, например, "древовидную" структуру, обеспечивающую множество функциональных групп на сайт присоединения к твердому носителю. Примеры такой связующей группы включают полилизин, полиглутаминовую кислоту, пента-

эритрол и трис-гидрокси-аминометан.

Соединение посредством нековалентного связывания. Антитело или полипептид может быть конъюгирован с твердым носителем, или первый твердый носитель также может быть конъюгирован со вторым твердым носителем посредством нековалентного взаимодействия. Например, магнитная гранула, изготовленная из ферромагнитного материала, способного намагничиваться, может притягиваться к магнитному твердому носителю и может высвободиться от носителя при удалении магнитного поля. В качестве альтернативы, твердый носитель может быть снабжен ионным или гидрофобным фрагментом, позволяющим взаимодействие указанного ионного или гидрофобного фрагмента соответственно с полипептидом, например полипептидом, содержащим присоединенную тритильную группу, или со вторым твердым носителем, имеющим гидрофобные характеристики.

Твердый носитель также может быть снабжен партнером специфического связывания и, следовательно, может быть конъюгирован с полипептидом или вторым твердым носителем, содержащим комплементарный связывающий фрагмент. Например, гранула, покрытая авидином или стрептавидином, может быть связана с полипептидом, содержащим включенный в него биотиновый фрагмент, или со вторым твердым носителем, покрытым биотином или производным биотина, таким как иминобиотин.

Следует понимать, что любых из партнеров связывания, описанных в настоящем изобретении или известных другим образом в данной области техники, можно менять местами. Таким образом, биотин, например, может быть встроен в полипептид или твердый носитель, и, наоборот, авидин или другой биотин-связывающий фрагмент может быть включен в носитель или полипептид соответственно. Другие пары специфического связывания, предполагаемые для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются указанными, гормоны и их рецепторы, ферменты и их субстраты, нуклеотидную последовательность и ее комплементарную последовательность, антитело и антиген, с которым он специфично взаимодействует, и другие такие пары, известные специалистам в данной области техники.

А. Способы диагностического применения антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Общие положения. Антитела против А33 согласно технологии согласно настоящему изобретению применимы в диагностических способах. Таким образом, технология по настоящему изобретению обеспечивает способы применения антител в диагностике активности А33 у субъекта. Антитела против А33 согласно технологии согласно настоящему изобретению могут быть выбраны таким образом, чтобы они имели любой уровень специфичности связывания эпитопа и очень высокую аффинность связывания с белком А33. В целом, чем выше аффинность связывания антитела, тем более жесткие условия промывки могут осуществляться в иммуноанализе для удаления неспецифически связанного материала без удаления полипептида-мишени. Соответственно, антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, применимые в диагностических анализах, обычно имеют аффинность связывания, составляющую примерно 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} или 10^{12} M^{-1} . Кроме того, желательно, чтобы антитела против А33, используемые в качестве диагностических реагентов, имели достаточную кинетику скорости ассоциации для достижения равновесия при стандартных условиях в течение по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере пяти (5) часов или по меньшей мере одного (1) часа.

Антител против А33 можно использовать для обнаружения иммунореактивного белка А33 в различных стандартных форматах анализов. Такие форматы включают иммунопреципитацию, Вестерн-блоттинг, ИФА, радиоиммуноанализ и иммунометрические анализы. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); патенты США № 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,879,262; 4,034,074, 3,791,932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; и 4,098,876. Биологические образцы могут быть получены из любой ткани или жидкости тела субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, субъект имеет раннюю стадию рака. Согласно одному варианту реализации изобретения, ранняя стадия рака определяется по уровню или паттерну экспрессии белка А33 в образце, полученном от субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, образец выбран из группы, состоящей из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (СМЖ) и биопсии ткани тела.

Иммунометрические или сэндвич-анализы представляют собой один из форматов диагностических способов согласно технологии по настоящему изобретению (см. патенты США 4,376,110, 4,486,530, 5,914,241 и 5,965,375). В таких анализах используют одно антитело, например, антитело против А33, или популяцию антител против А33, иммобилизованных на твердом носителе, и другое антитело против А33 или популяцию антител против А33 в растворе. Как правило, антитело против А33 в растворе или популяция антител против А33 в растворе является меченой. При использовании популяции антител, указанная популяция может содержать антитела, связывающиеся с разными антигенными детерминантами на полипептиде-мишени. Соответственно, одну и ту же популяцию можно использовать как в качестве твердой фазы, так и в качестве антител в растворе. При использовании моноклональных антитела против А33 первое и второе моноклональные антитела против А33, обладающие разной специфичностью связывания, используются для твердой фазы и фазы раствора. Антитела твердой фазы (также называемые "захватывающими") и антитела в растворе (также называемые "выявляющими") могут связываться с анти-

геном-мишенью в любом порядке или одновременно. Если сначала происходит взаимодействие с антигеном твердой фазы, анализ называется прямым анализом. И наоборот, если сначала происходит взаимодействие с антителом в растворе, то анализ называют обратным анализом. Если мишень контактирует с обоими антителами одновременно, анализ называют одновременным анализом. После взаимодействия белка А33 с антителом против А33 образец инкубируют в течение времени, которое обычно варьирует от примерно 10 минут до примерно 24 часов и, как правило, составляет примерно 1 час. Затем выполняют стадию промывки для удаления компонентов образца, не связавшихся специфично с антителом против А33, используемым в качестве диагностического реагента. Когда антитела твердой фазы и антитела из раствора связываются на отдельных этапах, промывку можно осуществлять после одной или обеих стадий связывания. После промывки проводят количественную оценку связывания, как правило, путем детектирования метки, связанной с твердой фазой, посредством связывания меченого антитела из раствора. Обычно для данной пары антител или популяций антител и данных условий реакции строят калибровочную кривую на основе образцов, содержащих известные концентрации антигена-мишени. Концентрации иммунореактивного белка А33 в исследуемых образцах затем определяют путем интерполяции данных из калибровочной кривой (то есть стандартной кривой). Количество анализируемого компонента можно измерять либо по количеству меченого антитела из раствора, связанного в равновесии, либо путем кинетических измерений связанного меченого антитела из раствора в нескольких моментах времени до достижения равновесия. Наклон такой кривой является показателем концентрации белка А33 в образце.

Подходящие носители для применения в указанных выше способах включают, например, нитроцеллюлозные мембраны, нейлоновые мембраны и дериватизированные нейлоновые мембраны, и также частицы, такие как агароза, гель на основе декстрана, индикаторные полоски, микрочастицы, микросферы, магнитные частицы, тест-пробирки, лунки титрационного микропланшета, SEPHADEX™ (Amersham Pharmacia Biotech, Пискатавэй, Нью Джерси) и т.д. Иммунизацию можно осуществлять путем абсорбции или ковалентного присоединения. Необязательно антитела против А33 можно соединять с линкерной молекулой, такой как биотин, для присоединения к связанному с поверхностью линкеру, такому как авидин.

Согласно некоторым вариантам реализации, настоящее изобретение обеспечивает антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению, конъюгированное с диагностическим агентом. Диагностический агент может содержать радиоактивную или нерадиоактивную метку, контрастирующий агент (такой как агент для магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии или ультразвукового анализа), и радиоактивная метка может представлять собой изотоп, испускающий гамма-, бета-, альфа-частицы, оже-электроны или позитроны. Диагностический агент представляет собой вводимую молекулу, конъюгированную с фрагментом антитела, т.е. антитела или его фрагментом или субфрагментом, и применимую для диагностики или обнаружения заболевания путем определения локализации клеток, содержащих антиген.

Применимые диагностические агенты включают, но не ограничиваются указанными, радиоизотопы, красители (такие как красители с комплексом биотин-стрептавидин), контрастирующие агенты, флуоресцентные соединения или молекулы и энхансеры (например, парамагнитные ионы) для магнитно-резонансной томографии (МРТ). В патенте США № 6,331,175, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки, описан метод МРТ и получение антител, конъюгированных с энхансером для МРТ. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, диагностические агенты выбраны из группы, состоящей из радиоизотопов, энхансеров для применения в магнитно-резонансной томографии и флуоресцентные соединения. Для нагрузки компонента антитела радиоактивными металлами или парамагнитными ионами может потребоваться подвержение его реакции с реагентом, имеющим длинный хвост, к которому присоединено множество хелатирующих групп для связывания ионов. Такой хвост может представлять собой полимер, такой как полилизин, полисахарид или другую дериватизированную или поддающуюся дериватизации цепь, имеющую боковые группы, с которыми могут связываться хелатирующие группы, такие как, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), порфирины, полиамины, краун-эфиры, бис-тиосемикарбазоны, полиоксимы и подобные группы, которые, как известно, являются применимыми для этой цели. Хелаты можно соединять с антителами согласно технологии по настоящему изобретению с применением стандартных методов химии. Хелат в норме соединяют с антителом с помощью группы, которая обеспечивает образование связи с молекулой с минимальной потерей иммунореактивности и минимальной агрегацией и/или внутренним перекрестным связыванием. Другие способы и реагенты для конъюгирования хелатов с антителами описаны в патенте США № 4,824,659. В частности, применимые комбинации металл-хелат включают 2-бензил-ДТПА и его монометильные и циклогексильные аналоги, используемые с диагностическими изотопами для радиовизуализации. Эти же хелаты при объединении с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, применимы для МРТ при использовании наряду с антителами против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Макроциклические хелаты, такие как NOTA (1,4,7-триазаацетилонан- N,N',N'' -триуксусная кислота), DOTA и ТЕТА (p-бромометамидабензилтетраэтиламинтетрауксусная кислота) применяются с различными металлами и радиоактивными металлами, таких как радионуклиды галлия, иттрия и меди

соответственно. Такие комплексы металл-хелат могут быть стабилизированы путем подгонки размера кольца для интересующего металла. Примеры других DOTA-хелатов включают

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (ii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (iii) DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (iv) DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (v) DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (vi) DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (vii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (viii) Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH₂;
- (ix) Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂;
- (x) Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH₂;
- (xi) Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (xii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (xiii) (Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH₂;
- (xiv) Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (xv) (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (xvi) Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH₂;
- (xvii) Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂;
- (xviii) Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ и
- (xix) Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂.

Также рассматриваются другие хелаты кольцевого типа, такие как макроциклические полиэферы, которые представляют интерес в случае использования стабильно связывающихся нуклидов, таких как ²²³Ra, для RAIT.

В. Терапевтическое применение антител против A33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Композиции на основе иммуноглобулинов (например, антитела или их антиген-связывающие фрагменты) согласно технологии по настоящему изобретению применимы для лечения ассоциированных с A33 типов рака. Такое лечение можно использовать у пациентов, у которых выявлен патологически высокий уровень A33 (например, пациентов, которым проводили диагностику с помощью способов, описанных в настоящей заявке), или у пациентов, у которых диагностировано заболевание, которое, как известно, связано с таким патологическим уровнем. Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения ассоциированного с A33 рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела (или его антиген-связывающего фрагмента) согласно технологии по настоящему изобретению. Примеры рака, который можно лечить с помощью антитела согласно технологии по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными: колоректальный рак, псевдомиксомомы брюшины, рак аппендикса, рак поджелудочной железы и рак желудка. Ассоциированный с A33 рак может представлять собой колоректальный рак с MSI-генотипом или MSS-генотипом. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, колоректальный рак связан с мутацией KRAS G12D или мутацией p53.

Композиции согласно технологии по настоящему изобретению могут применяться вместе с другими терапевтическими агентами, применимыми в лечении ассоциированных с A33 типов рака. Например, антитела согласно технологии по настоящему изобретению можно вводить отдельно, последовательно или одновременно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из алкилирующих агентов, агентов на основе платины, таксанов, агентов на основе барвинка, антиэстрогеновых лекарственных средств, ингибиторов ароматазы, подавляющих функцию яичников агентов, ингибиторов VEGF/VEGFR, ингибиторов EGF/EGFR, ингибиторов PARP, цитостатических алкалоидов, цитотоксических антибиотиков, антиметаболитов, эндокринных/гормональных агентов, агентов бисфосфонатной терапии и агентов направленной биологической терапии (например, терапевтических пептидов, описанных в публикации заявки на патент США 6306832, публикации международной патентной заявки WO 2012007137, публикации международной патентной заявки WO 2005000889, публикации международной патентной заявки WO 2010096603 и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Конкретные химиотерапевтические агенты включают, но не ограничиваются указанными, циклофосфамид, фторурацил (или 5-фторурацил, или 5-FU), метотрексат, эдотрексат (10-этил-10-дезааминоптерин), тиотепу, карбоплатин, цисплатин, таксаны, паклитаксел, связанный с белком паклитаксел, доцетаксел, винорелбин, тамоксифен, ралоксифен, торемифен, фульвестрант, гемцитабин, иринотекан, иксабепилон, темозоломид, топотекан, винкристин, винбластин, эрибулин, мутамицин, капецитабин, анастрозол, экземестан, летрозол, лейпролид, абареликс, бусерлин, гoserелин, мегестрол ацетат, ризедронат, памидронат, ибандронат, алендронат, денозумаб, золедронат, трастузумаб, тикурб, антрациклины (например, даунорубин и доксорубин), бевацизумаб, оксалиплатин, мелфалан, этопозид, мехлоретамин, блеомицин, яды микротрубочек, аноновые ацетогенины или

их комбинации.

Композиции согласно технологии по настоящему изобретению можно необязательно вводить в виде одной болюсной дозы нуждающемуся в этом субъекту. В качестве альтернативы, режим дозирования может включать множество введений, осуществляемых в различное время после появления опухоли.

Введение можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, включая пероральное, интраназальное, парентеральное (внутривенное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное или подкожное), ректальное, интракраниальное, интратекальное или местное введение. Введение включает самостоятельное введение и введение с помощью другого субъекта. Также следует понимать, что различные способы лечения описанных медицинских состояний, как предполагается, означают лечение "по существу", включающее полное, а также неполное лечение, при котором достигается некоторый релевантный с биологической или медицинской точки зрения результат.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела согласно технологии по настоящему изобретению содержат фармацевтические лекарственные формы, которые можно вводить нуждающимся в этом субъектам в одной или более дозах. Режимы дозирования можно регулировать для получения желаемого ответа (например, терапевтического эффекта).

Как правило, эффективное количество композиции антитела согласно технологии по настоящему изобретению, достаточное для достижения терапевтического эффекта, варьирует от примерно 0,000001 мг на килограмм массы тела в день до примерно 10,000 мг/кг массы тела в день. Как правило, диапазоны доз составляют от примерно 0,0001 мг/кг массы тела в день до примерно 100 мг/кг массы тела в день. Для введения антител против A33 доза варьирует от примерно 0,0001 до 100 мг/кг, и, как правило, составляет от 0,01 мг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела субъекта в неделю, в каждые две недели или каждые три недели. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела в неделю, каждые две недели или каждые три недели или находиться в пределах диапазона 1-10 мг/кг в неделю, каждые две недели или каждые три недели. Согласно одному варианту реализации изобретения, одна доза антитела варьирует от 0,1-10,000 микрограмм на кг массы тела. Согласно одному варианту реализации изобретения, концентрация антитела в носителе варьирует от 0,2 до 2000 микрограмм на доставляемый миллилитр. Примеры режимов лечения предусматривают введение один раз в каждые две недели или один раз в месяц или один раз в каждые 3-6 месяцев. Антитела против A33 можно вводить периодически. Интервалы между однократными дозами могут составлять час, день, неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть неодинаковыми и определяться на основе измерения уровня антитела в крови субъекта. В некоторых способах дозу регулируют для достижения концентрации антитела в сыворотке у субъекта, составляющей от примерно 75 мкг/мл до примерно 125 мкг/мл, от примерно 100 мкг/мл до примерно 150 мкг/мл, от примерно 125 мкг/мл до примерно 175 мкг/мл или от примерно 150 мкг/мл до примерно 200 мкг/мл. В качестве альтернативы, антитела против A33 можно вводить в виде лекарственной формы с замедленным высвобождением, в случае чего требуется менее частое введение. Доза и частота варьируют в зависимости от периода полужизни антитела в теле субъекта. Доза и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводится относительно низкая доза с относительно длинными интервалами в течение длительного периода времени. При терапевтическом применении иногда требуется введение относительно высокой дозы с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не снизится или не закончится или пока у субъекта не будет наблюдаться частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту можно осуществлять введение в соответствии с профилактическим режимом.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ обнаружения опухоли у субъекта *in vivo*, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества антитела (или его антиген-связывающего фрагмента) согласно технологии по настоящему изобретению, где указанное антитело сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей A33 и является меченым радиоизотопом; и (б) обнаружение наличия опухоли у субъекта путем детектирования уровня радиоактивности антитела, превышающего контрольное значение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, контрольное значение выражают в единицах инъекционной дозы на грамм (%ID/g). Контрольное значение может быть рассчитано путем измерения уровня радиоактивности в неопухолевых (нормальных) тканях и расчета значения среднего уровня радиоактивности в неопухолевых (нормальных) тканях \pm стандартное отклонение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, соотношение уровня радиоактивности между опухолевой и нормальной тканью составляет примерно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 или 100:1.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, у субъекта диагностирован или подозревается рак. Уровень радиоактивности антитела может быть определен с применением позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ также включает введение субъекту эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антитело согласно технологии по настоящему изобретению, конъюгированное с радионуклидом. Со-

гласно некоторым вариантам реализации изобретения, радионуклид представляет собой испускающий альфа-частицы изотоп, испускающий бета-частицы изотоп, радионуклид, испускающий оже-электроны, или любые их комбинации. Примеры испускающих бета-частицы изотопов включают ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu и ^{67}Cu . Примеры испускающих альфа-частицы изотопов включают ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At и ^{255}Fm . Примеры испускающих оже-электроны радионуклидов включают ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl и ^{203}Pb . Согласно некоторым вариантам реализации способа, неспецифичное FcR-зависимое связывание в нормальных тканях устраняется или снижается (например, с помощью мутации N297A в области Fc, приводящей к агликозилированию). Терапевтическая эффективность такого иммуноконъюгата может быть определена путем вычисления отношения площадь под кривой (ППК) опухоли:ППК нормальной ткани. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, отношение ППК опухоли: ППК нормальной ткани для иммуноконъюгата составляет примерно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 или 100:1.

ПРИТ. Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ обнаружения солидных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое связывается с указанным радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном A33, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в солидной опухоли, экспрессирующей антиген A33, распознающийся биспецифичным антителом комплекса; и (b) обнаружение наличия солидных опухолей у субъекта путем детектирования уровня радиоактивности комплекса, превышающего контрольное значение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ выбора субъекта для претаргетной радиоиммунотерапии, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое связывается с радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном A33, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в солидной опухоли, экспрессирующей антиген A33, распознающийся биспецифичным антителом комплекса; (b) детектирование уровня радиоактивности комплекса; и (c) выбор для претаргетной радиоиммунотерапии субъекта, у которого уровень радиоактивности комплекса превышает контрольное значение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

Примеры DOTA-гаптеней включают

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂;
- (ii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (iii) DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (iv) DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (v) DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (vi) DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (vii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (viii) Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH₂;
- (ix) Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂;
- (x) Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH₂;
- (xi) Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (xii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (xiii) (Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH₂;
- (xiv) Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (xv) (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂;
- (xvi) Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH₂;
- (xvii) Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂;
- (xviii) Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂;
- (xix) Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ и
- (xx) DOTA.

Радиоактивная метка может представлять собой испускающий альфа-частицы изотоп, испускающий бета-частицы изотоп или радионуклид, испускающий оже-электроны. Примеры радиоактивных меток включают ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{152}Dy , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{211}Bi , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{255}Fm , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{165}Dy , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Cr , ^{58}Co , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{103\text{m}}\text{Rh}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$, ^{119}Sb , ^{161}Ho , $^{189\text{m}}\text{Os}$, ^{192}Ir , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{68}Ga , ^{227}Th или ^{64}Cu . Согласно некоторым вариантам реализации способа, описанного в настоящем изобретении, уровень радиоактивности комплекса выявляется с применением позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, у субъекта диагностирован или подозревается A33-положительный рак, такой как колоректальный рак, псевдомиксома брюшины, рак аппендикса, рак поджелудочной железы и рак желудка.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, комплекс вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интратекально, интракаспулярно, внутриглазнично, интуйрикожно, внутрибрюшинно, транстрахеально, подкожно, интрацеребровентрикулярно, перорально или интраназально. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, комплекс вводят в спинномозговую жидкость или кровь субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, уровень радиоактивности комплекса выявляют между 2 и 120 часами после введения комплекса. Согласно конкретным вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, уровень радиоактивности комплекса выражается как процент инъецируемой дозы на грамм ткани (%ID/г). Контрольное значение может быть рассчитано путем измерения уровня радиоактивности в неопухолевых (нормальных) тканях и расчета значения среднего уровня радиоактивности в неопухолевых (нормальных) тканях \pm стандартное отклонение. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, контрольное значение представляет собой стандартизированное значение накопления (SUV, см. Thie JA, J Nucl Med. 45(9): 1431-4 (2004)). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, соотношение уровня радиации между опухолью и нормальной тканью составляет примерно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 или 100:1.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ повышения чувствительности опухоли к лучевой терапии у субъекта, у которого диагностирован A33-положительных рак, включающий (а) введение указанному субъекту эффективного количества биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению, где указанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень; и (b) введение указанному субъекту эффективного количества радиоактивно меченного DOTA-гаптена, где указанный радиоактивно меченный DOTA-гаптен сконструирован с возможностью связывания с биспецифичным антителом против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

Биспецифичное антитело против DOTA-гаптена вводят в условиях и в течение периода времени (например, в соответствии с режимом дозирования), достаточного для насыщения опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, несвязанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена удаляют из кровеносного русла после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят после периода времени, который может быть достаточным для клиренса несвязанного биспецифичного антитела против DOTA-гаптена.

Радиоактивно меченный DOTA-гаптен можно вводить в любое время между 1 и 4 минутами или более чем через день после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят через 1 минут, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 1 час, 1,25 часов, 1,5 часов, 1,75 часов, 2 часа, 2,5 часов, 3 часа, 3,5 часов, 4 часа, 4,5 часов, 5 часов, 5,5 часов, 6 часов, 6,5 часов, 7 часов, 7,5 часов, 8 часов, 8,5 часов, 9 часов, 9,5 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов или любой диапазон пределах указанных значений после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. В качестве альтернативы, радиоактивно меченный DOTA-гаптен можно вводить в любое время через 4 или более дней после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена.

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ также включает введение субъекту эффективного количества обеспечивающего клиренс агента до введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена. Обеспечивающий клиренс агент может представлять собой любую молекулу (декстран или дендример или полимер), которая может быть конъюгирована с S825-гаптенем. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, обеспечивающий клиренс агент имеют молекулярную массу не более чем 2000 кДа, 1500 кДа, 1000 кДа, 900 кДа, 800 кДа, 700 кДа, 600 кДа, 500 кДа, 400 кДа, 300 кДа, 200 кДа, 100 кДа, 90 кДа, 80 кДа, 70 кДа, 60 кДа, 50 кДа, 40 кДа, 30 кДа, 20 кДа, 10 кДа или 5кДа. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, обеспечивающий клиренс агент представляет собой конъюгат 500 кДа аминокдекстран-DOTA (например, 500 кДа декстран-DOTA-Bn (Y), 500 кДа декстран-DOTA-Bn (Lu) или 500 кДа декстран-DOTA-Bn (In) и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, обеспечивающий клиренс агент и радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят без дополнительного введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению вводят в соответствии с режимом, который включает по меньшей мере один цикл: (i) введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению (необязательно таким образом, чтобы соответствующие опухолевые клетки были насыщены); (ii) введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена и необязательно обеспечивающего клиренс агента; (iii) необязательного дополнительного введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена и/или

обеспечивающего клиренс агента без дополнительного введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ может включать множество таких циклов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более циклов).

Дополнительно или в качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам реализации способ, биспецифичное антитело против DOTA-гаптена и/или радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интракостально, интракаспулярно, внутриглазнично, внутрикостно, внутрибрюшинно, транстрахеально, подкожно, интрацеребровентрикулярно, перорально или интраназально. Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ повышения чувствительности опухоли к лучевой терапии у субъекта, у которого диагностирован АЗЗ-положительных рак, включающий введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое распознает и связывается с указанным радиоактивно меченным DOTA-гаптенем и антигеном АЗЗ-мишенью, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген АЗЗ-мишень, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса. Указанный комплекс можно вводить внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интракостально, интракаспулярно, внутриглазнично, внутрикостно, внутрибрюшинно, транстрахеально, подкожно, интрацеребровентрикулярно, перорально или интраназально. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий (а) введение эффективного количества биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению субъекту, где указанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена сконструировано с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген АЗЗ-мишень; и (б) введение эффективного количества радиоактивно меченного DOTA-гаптена субъекту, где указанный радиоактивно меченный DOTA-гаптен сконструирован с возможностью связывания с биспецифичным антителом против DOTA-гаптена. Биспецифичное антитело против DOTA-гаптена вводят в условиях и в течение периода времени (например, в соответствии с режимом дозирования), достаточного для насыщения опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, несвязанное биспецифичное антитело против DOTA-гаптена удаляют из кровеносного русла после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят после периода времени, который может быть достаточным для клиренса несвязанного биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, субъект представляет собой человека.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ также включает введение субъекту эффективного количества обеспечивающего клиренс агента до введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена. Радиоактивно меченный DOTA-гаптен можно вводить в любое время между 1 и 4 минутами или более чем через день после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят через 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 1 час, 1,25 часа, 1,5 часа, 1,75 часов, 2 часа, 2,5 часа, 3 часа, 3,5 часа, 4 часа, 4,5 часов, 5 часов, 5,5 часов, 6 часов, 6,5 часов, 7 часов, 7,5 часов, 8 часов, 8,5 часов, 9 часов, 9,5 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 часов, 22 часов, 23 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов или любой диапазон в пределах указанных значений после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. В качестве альтернативы, радиоактивно меченный DOTA-гаптен можно вводить в любое время через 4 или более дней после введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена.

Обеспечивающий клиренс агент может представлять собой конъюгат 500 кДа аминокислот-ДОТА (например, 500 кДа декстран-ДОТА-Bn (Y), 500 кДа декстран-ДОТА-Bn (Lu) или 500 кДа декстран-ДОТА-Bn (In) и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, обеспечивающий клиренс агент и радиоактивно меченный DOTA-гаптен вводят без дополнительного введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело против DOTA-гаптена вводят в соответствии с режимом, который включает по меньшей мере один цикл: (i) введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена согласно технологии по настоящему изобретению (необязательно таким образом, чтобы происходило насыщение соответствующих опухолевых клеток); (ii) введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена и, необязательно, обеспечивающего клиренс агента; (iii) необязательного дополнительного введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена и/или обеспечивающего клиренс агента без дополнительного введения биспецифичного антитела против DOTA-гаптена. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способ может включать множество таких циклов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более циклов).

Также в настоящем изобретении предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего

радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело согласно технологии по настоящему изобретению, которое распознает и связывается с указанным радиоактивно меченым DOTA-гаптенем и антигеном A33-мишенью, где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей антиген A33-мишень, распознаваемый биспецифичным антителом комплекса. Терапевтическую эффективность такого комплекса можно определить путем вычисления отношения площади под кривой (ППК) опухоли:ППК нормальной ткани. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, отношение ППК опухоль ЛПК нормальной ткани для комплекса составляет примерно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 или 100:1.

Токсичность. Оптимально эффективное количество (например, доза) антитела против A33, описанного в настоящем изобретении, обеспечивает терапевтический благоприятный эффект и по существу не вызывает токсичности у субъекта. Токсичность антитела против A33, описанного в настоящем изобретении, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, путем определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) или LD100 (дозы, летальной для 100% популяции). Отношение между дозами, вызывающими токсический и терапевтический эффект, представляет собой терапевтический индекс. Данные, полученные по результатам трех анализов на клеточных культурах, и исследования на животных можно использовать при составлении диапазона доз, которые не являются токсичными для применения у человека. Доза антитела против A33, описанного в настоящей заявке, находится в пределах диапазона концентраций циркулирующего в крови антитела, которые включают эффективную дозу с низкой токсичностью или отсутствием токсичности. Доза может варьировать в пределах указанного диапазона в зависимости от используемой формы дозирования и используемого способа введения. Точная лекарственная форма, способ введения и доза могут быть выбраны лечащим врачом с учетом состояния субъекта. См., например, Fingl et al., In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1 (1975).

Лекарственные формы фармацевтических композиций. В соответствии со способами согласно технологии по настоящему изобретению, антитело против A33 может быть включено в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Фармацевтические композиции в целом содержат рекомбинантное или по существу очищенное антитело и фармацевтически приемлемый носитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые носители определяются отчасти конкретной вводимой композицией, а также конкретным применяемым способом введения указанной композиции. Соответственно, существует широкое разнообразие подходящих лекарственных форм фармацевтических композиций для введения композиций антитела (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990). Фармацевтические композиции в целом получают в стерильном, по существу изотоническом виде в строгом соответствии со всеми правилами Надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (U.S. Food and Drug Administration, FDA).

Термины "фармацевтически приемлемые", "физиологически приемлемые" и их грамматические вариации при употреблении в отношении композиций, носителей, разбавителей и реагентов применяются взаимозаменяемо и означают, что указанные материалы можно вводить субъекту или наносить на тело субъекта, не вызывая нежелательных физиологических эффектов в той степени, которая будет препятствовать введению указанной композиции. Например, "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" означает вспомогательное вещество, которое применимо в приготовлении фармацевтической композиции, которая в целом является безопасной, не токсичной и желаемой и включает вспомогательные вещества, которые являются приемлемыми для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения у человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или газообразными в случае аэрозольной композиции. Термин "фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры" означает соли и сложные эфиры, которые являются фармацевтически приемлемыми и обладают желаемыми фармакологическими свойствами. Такие соли включают соли, которые могут образовываться при способности присутствующих в композиции кислых протонов реагировать с неорганическими или органическими основаниями. Подходящие неорганические соли включают соли, образованные с щелочными металлами, например натрием и калием, магнием, кальцием и алюминием. Подходящие органические соли включают соли, образованные с органическими основаниями, такими как аминные основания, например этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, трометамин, N-метилглюкамин и т.д. Такие соли также включают соли присоединения кислоты, образованные с неорганическими кислотами (например, соляной и бромистоводородной кислотами) и органическими кислотами (например, уксусной кислотой, лимонной кислотой, малеиновой кислотой и алкан- и аренсульфоновыми кислотами, такими как метансульфоновая кислота и бензолсульфоновая кислота). Фармацевтически приемлемые сложные эфиры включают сложные эфиры, образованные из карбокси-, сульфонилокси- и фосфоноксигрупп, присутствующих в антителе против A33, например, C₁₋₆ сложные алкиловые эфиры. При наличии двух кислотных групп фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир может представлять собой монокислоту/моносоль или сложный эфир, или двухосновную соль или сложный эфир; и подобным образом, если присутствует более двух кислотных групп, некоторые или все такие группы

могут быть превращены в соли или этерифицированы. Антитело против А33, упомянутое согласно технологии по настоящему изобретению, может присутствовать не в форме соли или в неэтерифицированной форме или в форме соли и/или этерифицированной форме, и предполагается, что упоминание такого антитела против А33 включает как исходное (не в форме соли и в неэтерифицированной форме) соединение, так и его фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры. Кроме того, определенные варианты реализации технологии по настоящему изобретению могут присутствовать в более чем одной стереоизомерной форме. Предполагается, что упоминание такого антитела против А33 включает все отдельные стереоизомеры и все смеси (рацемические или иные) таких стереоизомеров. Специалист в данной области техники без труда определит подходящие сроки, последовательность и дозы введения для конкретных лекарственных средств и композиций по технологии согласно настоящему изобретению.

Примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются указанными, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% раствор человеческого сывороточного альбумина. Также можно применять липосомы и неводные носители, такие как жирные масла. Использование таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или соединение несовместимо с антителом против А33, предполагается их применение в композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композицию.

Фармацевтическую композицию согласно технологии по настоящему изобретению составляют таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым способом введения. Композиции антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению можно вводить парентерально, местно, внутривенно, перорально, подкожно, интратракарально, интратрикулярно, интратрикулярно, интратрикулярно, интраназально или внутримышечным путем или в виде ингаляций. Антитело против А33 необязательно можно вводить в комбинации с другими агентами, которые по меньшей мере частично эффективны при лечении различных видов рака, ассоциированных с А33.

Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутривенного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и соединения для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многоразовые флаконы, сделанные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекции, включают стерильные водные растворы (при условии их растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, кремфор EL™ (BASF, Парсипанни, Нью-Джерси.) или физиологический буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна являться жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко шприцевать. Указанная композиция должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.д.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых соединений, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.д. Во многих случаях желательно включать в композицию изотонические соединения, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Длительная абсорбция композиций для инъекции может быть достигнута путем включения в указанную композицию соединения, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения необходимого количества антитела против А33 согласно технологии по настоящему изобретению в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией посредством фильтрования. В целом, дисперсии готовят путем включения антитела против А33 в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка активного ингредиента с любым дополнительным

желаемым ингредиентом из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора. Антитела согласно технологии по настоящему изобретению можно вводить в виде инъекции замедленного всасывания или имплантируемого препарата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить замедленное или прерывистого высвобождения активного ингредиента.

Композиции для перорального введения в целом включают инертный разбавитель или пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального терапевтического введения антитело против А33 может быть представлено вместе со вспомогательными веществами и использоваться в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального применения также могут быть приготовлены с использованием жидкого носителя для применения в качестве жидкости для полоскания рта, где указанное соединение в жидком носителе наносится в ротовую полость, полощется и выплевывается или проглатывается. Фармацевтически совместимые связывающие соединения и/или адьювантные материалы могут быть включены в состав композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.д. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза; дезинтегрирующее соединение, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; глидант, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Для введения путем ингаляции антитело против А33 доставляют в виде аэрозольного спрея из подходящего под давлением контейнера или распылителя, который содержит подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

Системное введение также может осуществляться трансслизистым или трансдермальным способом. Для трансслизистого или трансдермального введения в препарате используются пенетранты, подходящие для проникновения через соответствующий барьер. Такие пенетранты, как правило, являются известными в данной области техники и включают, например, в случае введения через слизистую оболочку детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансслизистое введение может быть достигнуто путем использования назальных спреев или суппозиторий. Для трансдермального введения антитело против А33 готовят в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как в целом известно в данной области техники.

Антитело против А33 также можно получать в виде фармацевтических композиций в форме суппозиторий (например, с обычными основами для суппозиторий, такими как масло какао и другие глицериды) или микроклизм с удержанием для ректальной доставки.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против А33 получают с носителями, защищающими антитело против А33 от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны для специалистов в данной области техники. Материалы также могут быть получены коммерческим путем из компаний Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, направленные на инфицированные клетки с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам) также могут применяться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

С. Наборы.

Технология согласно настоящему изобретению обеспечивает наборы для обнаружения и/или лечения ассоциированных с А33 типов рака, содержащие по меньшей мере одну композицию на основе иммуноглобулина согласно технологии по настоящему изобретению (например, любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящей заявке) или ее функциональный вариант (например, содержащих замену вариант). Необязательно описанные выше компоненты наборов согласно технологии по настоящему изобретению упаковывают в подходящие контейнеры и маркируют для диагностики и/или лечения рака, ассоциированного с А33. Вышеупомянутые компоненты могут храниться в одно- или многодозовых контейнерах, например, в герметичных ампулах, флаконах, бутылках, шприцах и тест-пробирках, в виде водного, предпочтительно стерильного, раствора или в виде лиофилизованного, предпочтительно стерильного, состава для восстановления. Набор может дополнительно содержать второй контейнер, который содержит разбавитель, подходящий для разбавления фармацевтической композиции с получением большего объема. Подходящие разбавители включают, но не ограничиваются указанными, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество фармацевтической композиции и солевой раствор. Кроме того, набор может содержать инструкции по разбавлению фармацевтической композиции и/или инструкции по введению разведенной или не разведенной фармацевтической композиции. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик, и могут иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для рас-

твор для внутривенного введения или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Набор может также содержать дополнительные контейнеры, содержащие фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может содержать другие материалы, являющиеся желаемыми с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы, культуральную среду для одной или нескольких подходящих клеток-хозяев. Наборы могут необязательно включать инструкции, обычно содержащиеся в коммерческих упаковках терапевтических или диагностических продуктов, которые содержат информацию, например, о показаниях, применении, дозировке, изготовлении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических или диагностических продуктов.

Наборы применимы для обнаружения присутствия иммунореактивного белка А33 в биологическом образце, например, любой жидкости организма, включая, например, но не ограничиваясь указанными, сыворотку, плазму, лимфу, кистозную жидкость, мочу, стул, спинномозговую жидкость, асцитическая жидкость или кровь и включая образцы биопсии тканей тела. Например, набор может содержать одно или несколько гуманизированных, химерных или биспецифичных антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению (или их антигенсвязывающих фрагментов), способных связываться с белком А33 в биологическом образце; средство для определения количества белка А33 в образце; и средство для сравнения количества иммунореактивного белка А33 в образце со стандартом. Одно или более антител против А33 могут быть мечеными. Компоненты набора (например, реагенты) могут быть упакованы в подходящий контейнер. Набор может дополнительно содержать инструкции по применению указанного набора для обнаружения иммунореактивного белка А33.

В случае наборов на основе антител указанный набор может содержать, например, 1) первое антитело, например, гуманизированное, химерное или биспецифичное антитело против А33 согласно технологии по настоящему изобретению (или его антиген-связывающий фрагмент), которое связывается с белком А33, присоединенное к твердому носителю, и, необязательно; 2) второе, отличное, антитело, которое связывается либо с белком А33, либо с первым антителом, и конъюгировано с поддающейся обнаружению меткой.

Набор также может содержать, например, буферный агент, консервант или стабилизирующий белок агент. Набор может дополнительно содержать компоненты, необходимые для детектирования поддающейся обнаружению метки, например, фермента или субстрата. Набор также может содержать контрольный образец или набор контрольных образцов, которые можно анализировать и сравнивать с исследуемым образцом. Каждый компонент набора можно заключать в индивидуальный контейнер, и все из различных контейнеров могут быть представлены в одной упаковке наряду с инструкциями по интерпретации результатов анализа, осуществленного с помощью указанного набора. Наборы согласно технологии по настоящему изобретению могут содержать письменное приложение на контейнере или внутри контейнера набора. Письменное приложение описывает, как применять реагенты, содержащиеся в наборе, например, для обнаружения белка А33 *in vitro* или *in vivo* или для лечения ассоциированных с А33 типов рака у нуждающегося в этом субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, реагенты можно применять в соответствии со способами технология согласно настоящему изобретению.

Примеры

Технология согласно настоящему изобретению дополнительно проиллюстрирована с помощью следующих далее Примеров, которые никоим образом не ограничивают настоящее изобретение. Следующие Примеры демонстрируют получение, характеристику и применение иллюстративных антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению. Следующие Примеры демонстрируют получение химерных, гуманизированных и биспецифичных антител согласно технологии по настоящему изобретению, а также характеристику специфичности их связывания и *in vivo* биологической активности.

Пример 1: Материалы и способы для создания и характеристики антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению.

Клеточные линии и лейкоциты человека. Клеточные линии LS174Т, Colo205, SNU-16 и клетки 293Т были приобретены из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC, Манассас, Вирджиния); SW1222 были получены из Европейской коллекции клеточных культур животных (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Солсбери, Великобритания). Все клетки аутентифицировали с помощью типирования STR-локусов. Клетки поддерживали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, Sigma, Сент-Луис, Миссури), 0,03% L-глутамина (Gibco Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) и раствора пенициллин/стрептомицин (Gibco Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Лейкоцитарную пленку от здоровых доноров получали Центра крови Нью-Йорка (New York Blood Center, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк), и МКПК человека выделяли из лейкоцитарных пленок с помощью градиента фикола.

Установление клеточных линий, экспрессирующих люциферазу. Клетки 293Т сначала трансфицировали ретровирусной конструкцией, содержащей гены люциферазы и GFP, с использованием реагента для трансфекции PolyJet (SignaGen, Роквилл, Мэриленд) в соответствии с инструкциями производителя. Спустя тридцать шесть часов вирусосодержащий супернатант собирали и фильтровали через фильтр

(0,45 мкм). Два миллилитра отфильтрованного супернатанта аликвотировали в каждую лунку 12-луночного планшета, предварительно покрытого ретронектином (Clontech Laboratories, Маунтин-Вью, Калифорния). Планшет откручивали при 3500 об./мин при 4° С в течение 45 мин. Процесс повторяли от 2 до 3 раз. После откручивания планшет один раз промывали PBS, после чего опухолевые клетки в концентрации 0.2×10^6 высевали и инкубировали при температур 37°С. Инокуляцию посредством центрифугирования повторяли еще раз через 24 часа. Затем клетки дополнительно инкубировали в течение по меньшей мере 48 часов перед сортировкой для обнаружения GFP-экспрессирующих клеток. Для сортировки клеток трансдуцированные клетки распределяли по меньшей мере в 4 лунки 96-луночного планшета с плотностью 1 клетка/лунку и инкубировали в течение 2 недель перед сбором колоний. Собранные колонии оценивали и отбирали на основе экспрессии люциферазы, GFP и GPA33 по сравнению с исходными клеточными линиями.

Анализ с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Размер и чистоту huA33-BsAb анализировали с применением системы ВЭЖХ (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Колумбия, Мерилэнд). Мономерные варианты идентифицировали с применением стандартов молекулярной массы (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния) и процентное содержание мономера рассчитывали на основе относительной площади под кривой (ПИК) различных не связанных с буфером пиков.

Гуманизирование мышиногo A33. Осуществляли гуманизирование мышиногo A33 с получением IgG₁ путем прививки CDR. Две различные последовательности V_H и V_L комбинируют с получением 4 различных гуманизированных антител против A33. Кинетику связывания сравнивали с кинетикой связывания химерного антитела chA33 с применением анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Последовательность тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO: 6 (3A3-H2), и последовательность легкой цепи представляла собой SEQ ID NO: 10 (3A3-L2).

Последовательность тяжелой цепи, включая лидерную последовательность, представляла собой
MGWSCIIILFLVATATGEVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CA}ASGF^{AF}STYDMSWV^{RQ}APG
 KRLEWVATISSGGSYTY^YLDSVKGRFTISRDN^{AK}NSLYLQ^MNSLRAЭДТАV^YYCAPTT
 VVPFA^YWGQGLT^VTVSS (SEQ ID NO: 55),

и последовательность легкой цепи, включая лидерную последовательность, представляла собой
MGWSCIIILFLVATATGDIQMTQ^SSSLT^SVGDRV^TITCKASQ^NVRTV^VAWYQ^KPGKS
 PKTLI^YLASNRHTG^VPSR^FSGSG^GTEFTLT^{IS}NVQ^PEDFAD^YFCLQ^HWSY^{PL}TFGSG^TKL
 EIKR (SEQ ID NO: 56).

Подчеркнутая последовательность соответствует лидерной последовательности.

ППР-анализ. Человеческий GPA33 (Novoprotein, Саммит, Нью-Джерси) иммобилизовали на CM5-чипах. huA33 IgG1 или huA33-BsAb в пяти концентрациях (начиная с 20 нМ) в 2-кратных серийных разведениях прогоняли через чип с применением системы Biacore™ T100 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс). Кинетику связывания huA33 измеряли при температуре 25°С и кинетику связывания huA33-BsAb измеряли при температуре 25°С и 37°С. Сенсограммы приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 для обоих антител для выведения кинетических параметров.

Создание биспецифичного антитела huA33-BsAb. HuA33-BsAb конструировали путем слияния гуманизированного scFv ОКТ3 с С-концом легкой цепи антитела huA33 через линкер (G₄S)₃, как ранее было описано в источниках: Xu H et al., Cancer Immunology Research 3:266-277 (2015) и Lopez-Albaitero A et al., Oncoimmunology 6:e1267891 (2017). Мутации N297A и K322A вводили в Fc-область антитела для устранения активности связывания с FcR и комплементом соответственно (Shields RL et al., Journal of Biological Chemistry 276:6591-6604 (2001); Idusogie EE et al., Journal of Immunology 164:4178-4184 (2000)). ДНК конструктор затем трансфицировали в клетки CHO-S и стабильные клоны выбирали для продукции антитела на высоком уровне. Для очистки антитела в более крупном масштабе выбранный стабильный клон размножали в смесительных колбах. Биспецифичное антитело очищали из супернатанта с применением одноэтапной аффинной хроматографии на основе белка А.

Анализы Т-клеточной цитотоксичности (TDCC). Анализ цитотоксичности проводили с применением анализа высвобождения ⁵¹Сг и анализа высвобождения ЛДГ, Pierce (Thermo Fisher Scientific, Кембридж, Массачусетс). Для обоих анализов Т-клетки, активированные путем обработки в течение 14 дней микрочастицами Dynabeads (анти-CD3/анти-CD28) впоследствии использовали в качестве эффекторных клеток, за исключением сортированных клеток из МКПК, которые использовали для анализа TDCC без предварительной стимуляции. Анализ ⁵¹Сг проводили, как описано ранее в источнике Cheng M et al., International Journal of Cancer 136:476-486 (2015). Анализ ЛДГ проводили в соответствии с инструкциями производителя со следующими далее модификациями. Вкратце, в каждой аналитической лунке 96-луночного планшета с круглым дном клетки-мишени в концентрации $1,5 \times 10^4$ инкубировали с различным количеством эффекторных клеток в зависимости от предполагаемых отношений Е:Т. Затем добавляли антитела в различных разведениях и планшеты инкубировали при 37°С в течение 16 часов. Каждый вариант эксперимента проводили в трех повторностях. Супернатант затем переносили в планшет с плоским дном, содержащий субстрат реакции, и инкубировали в течение 30 мин перед считыванием планшетов

при 490 нм с использованием длины волны 680 нм в качестве референсной длины волны. Значения EC_{50} рассчитывали путем приведения кривых к 4-параметрической нелинейной регрессионной модели с применением GraphPad Prism.

Анализ высвобождения цитокинов и цитолитических молекул. Т-клетки очищали из МКПК с применением набора для выделения тотальной фракции Т-клеток (Miltenyi Biotec, Кембридж, Массачусетс). Таргентные и контрольные опухолевые клетки инкубировали в трех повторностях в 24-луночных планшетах в концентрации 2×10^6 клеток/лунку в общем объеме 2 мл на лунку при отношении эффектор:мишень, составляющем 5:1. Супернатанты культур собирали через 24 часа, 48 часов, 72 часа и 96 часов и уровень цитокинов измеряли с помощью проточной цитометрии с применением панели CD8/NK человека LEGENDplex™ (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния) в соответствии с протоколом изготовителя.

Анализ Т-клеточной пролиферации. Свежие МКПК от здоровых доноров метили 2,5 нМ CFSE (Life Technologies Corp., Карлсбад, Калифорния) в течение 5 мин при комнатной температуре с последующей нейтрализацией с применением ФСБ, содержащего 5% ЭБС. Клетки-мишени затем инкубировали с мечеными МКПК при различных условиях при температуре 37°C до анализа экспрессии поверхностных маркеров активации и Т-клеточной пролиферации через 24 часа и 96 часов.

In vivo терапия опухоли. Для моделей подкожного (ПК) введения опухоли клетки LS174T, Colo205 или SNU16 объединяли со свежими МКПК в отношении 1:1, смешивали с матригелем (клетки:гель=1:2 по объему) и имплантировали (100 мкл/мышь) в бок мышей Balb/c Rag2^{-/-}IL2Rγ^{-/-} (DKO) (в настоящее время коммерчески доступны из компании Taconic как мыши CIEA BRG). Лечение начинали после подтверждения наличия опухоли со схемы два раза в неделю (BIW) в дозе 100 мкг/мышь и продолжали лечение в течение 3-4 недель. За ростом опухоли следили путем еженедельного измерения объема опухоли с применением штангенциркуля или цифрового устройства Peira TM900 Scanner (Peira Scientific Instruments, Тюрнхаут, Бельгия).

Для моделей внутрибрюшинного (ВБ) введения опухоли экспрессирующие люциферазу клетки LS174T-luc или SW1222-luc ресуспендировали в среде RPMI и инъецировали внутрибрюшинно мышам DKO. Эффекторные клетки человека представляли собой активированные Т-клетки, которые инъецировали внутривенно. Мышам проводили 2-3 раза в неделю циклы лечения по схеме антитело-Т-клетка-антитело, где интервал между введениями каждого из компонентов составлял 3-4 дня. За ростом опухоли наблюдали еженедельно путем измерения люминесцентных сигналов на системе in vivo визуализации IVIS Spectrum (PerkinElmer Inc., Уолтам, Массачусетс) после инъекции 3,3 мг/мышь люциферина. Люминесценцию анализировали и рассчитывали с применением программы прижизненной визуализации Living Image Software (PerkinElmer Inc., Уолтам, Массачусетс).

Антитела и проточная цитометрия. Антитела против hCD25-PE, против CD69-PE, против hCD8-APC, против hCD45-PECy7, против hCD4-PE, против hCD4-BV421, против hCD62L-PercpCy5,5, против hPD1-BV421, против hCD45RO-PECy7, получали из Biolegend (Сан Диего, Калифорния). Козьи антитела против IgG человека (IgG-PE) получали из SouthernBiotech (Бирмингем, Алабама). Стрептавидин-PE, антитела против hCD4-APC и против hCD25-APC получали из BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния). Все анализы FACS проводили с применением системы FACSCalibur или LSRII (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и анализировали с применением системы FlowJo (FLOWJO, Эшленд, Орегон).

Аффинное созревание с применением дрожжевого дисплея. Исходное huA33 превращали в формат scFv с линкером (G4S)₄, содержащим 20 аминокислот, и клонировали в вектор дрожжевого дисплея. HuA33 scFv случайно мутировали с применением набора для мутагенеза GeneMorph II (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). Продукты ПЦР подвергали электропорации вместе с линейризованным вектором в дрожжи и библиотеку подвергали 4 циклам сортировки с применением биотинилированного GPA33. Отдельные клоны из последнего цикла амплифицировали с помощью ПЦР и секвенировали для анализа паттерна мутаций. Превращение выбранных клонов scFv в формат huA33-BsAb осуществляли с применением одноэтапного способа лигирования 4 фрагментов с использованием 50 нг лианиризованного вектора и вектора для встраивания в молярным отношением к другим 3 компонентам, составляющим 1:3. Лигирование осуществляли с помощью набора для лигирования Rapid DNA ligation (Thermo Fisher Scientific, Кембридж, Массачусетс) при комнатной температуре в течение 1 часа. Рестрикционный фермент II типа SapI (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс) использовали для обеспечения непрерывного соединения различных компонентов (фиг. 13). Осуществляли временную экспрессию выбранных клонов с применением экспрессионной системы Expi293 (Thermo Fisher Scientific, Кембридж, Массачусетс) в соответствии с инструкциями производителя. Супернатант от клеток Expi293, полученный через 4-5 дней культивирования в смесительных флаконах, использовали для очистки антител с применением MabSelect SuRe (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс) и диализовали против цитратного буфера (pH 8,0) на диализной мембране (Spectrum Laboratories, Inc., Ранчо-Домингез, Калифорния).

Статистический анализ. Достоверность ($p < 0,05$) оценивали с применением t-критерия Стьюдента.

Пример 2: Структура и аффинность связывания гуманизированных антител против A33 согласно технологии по настоящему изобретению.

На фиг. 14 показаны аминокислотные последовательности доменов V_H и V_L мышинового антитела

против А33 и соответствующих им гомологичных последовательностей человека (SEQ ID NO: 1-4). Аминокислотные последовательности доменов V_H и V_L 3A3-H1/L1, 3A3-H1/L2, 3A3-H2/L1 и 3A3-H2/L2 гуманизированных антител против А33 согласно технологии по настоящему изобретению показаны на фиг. 15 и на фиг. 17. Последовательности кДНК доменов V_H и V_L 3A3-H1/L1, 3A3-H1/L2, 3A3-H2/L1 и 3A3-H2/L2 гуманизированных А33 антител показаны на фиг. 16 и на фиг. 18. На фиг. 19 показано выравнивание исходных гуманизированных аминокислотных последовательностей hA33 из источника King et al. (1995), выше, по сравнению с заново регуманизированными аминокислотными последовательностями huA33 (3A3).

На фиг. 24 показаны аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи химерного chA33-IgG1, которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 соответственно. На фиг. 25 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи huA33-IgG1 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно. На фиг. 26 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи huA33-IgG1 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно.

При сравнении с химерным антителом против А33 все четыре заново гуманизированных антитела против А33 имеют немного улучшенное k_{off} при связывании с иммобилизированным GPA33 в анализе НИР (фиг. 9 и фиг. 20). На основе молекулярной массы (кДа), стабильности при 37°C и T20-оценки гуманизирования клон H2L2 huA33 был выбран для дальнейшей разработки (см. фиг. 23). Фиг. 21 и фиг. 22 демонстрируют, что у исходного гуманизированного антитела hA33 (hA33-mC825 BsAb), описанного в источнике Cheal et al. (2016), выше, наблюдалось значительное снижение аффинности связывания по сравнению с huA33-H2L2.

Указанные результаты демонстрируют, что антитела согласно технологии по настоящему изобретению или их антиген-связывающие фрагменты специфично связываются с антигеном А33 с высокой аффинностью связывания. Соответственно, композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в настоящей заявке, применимы для обнаружения белка А33 в образце.

Пример 3: Структура и аффинность связывания антител HuA33-BsAb-рекрутеров Т-клеток согласно технологии по настоящему изобретению.

Антитело huA33 преобразовывали в биспецифичный формат путем слияния cFv гуманизированного ОКТ3 с С-концом легкой цепи через подвижный GS-линкер (Фиг. 1(A)). ДНК-конструкт применяли для установления стабильной клеточной линии CHO-S и huA33-BsAb очищали из супернатанта. Выход белка при использовании хроматографии на основе белка А составлял от 50 мг/л до 100 мг/л без интенсивной оптимизации. Сходные значения выхода наблюдались при применении системы временной экспрессии Expi293 (данные не показаны). Одноэтапная очистка с помощью белка А, как правило, приводила к получению белка с чистотой выше 90% по результатам измерения с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Четыре цикла замораживания-оттаивания не вызывали заметных изменений в профиле эксклюзионной ВЭЖХ (данные не показаны). После инкубирования молекул при 37°C в течение 4 недель наблюдалось только минимальное снижение в проценте мономеров, как показано на фиг. 1(B). Указанные данные предполагают, что huA33-BsAb имело хорошую растворимость, чистоту и термостабильность, все из которых являются критическими характеристиками для дальнейшей последующей разработки.

На фиг. 27 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи биспецифичных антител-рекрутеров Т-клеток huA33-BsAb, которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 соответственно. На фиг. 28 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи биспецифичных антител-рекрутеров Т-клеток huA33-BsAb, которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 соответственно. На фиг. 29 показано краткое описание потенциальных модификаций для биспецифичных антител-рекрутеров Т-клеток huA33-BsAb, описанных в настоящем изобретении.

Авидность huA33-BsAb в отношении GPA33 при температурах 25°C и 37°C измеряли с применением CM5-чипов с иммобилизированным GPA33. Как показано на фиг. 1(C), huA33-BsAb связывал GPA33 с высокой очевидной аффинностью, составляющей около 0,2 нМ, что немного ниже значения 0,13 нМ, наблюдаемого для исходного huA33. FACS-анализ панели клеточных линий, происходящих из различных типов рака, показал, что huA33-BsAb окрашивали клеточные линии рака толстой кишки и одну клеточную линию рака желудка, но не окрашивали клеточную линию нейробластомы GPA33(-) IMR32, клеточную линию остеосаркомы TC32 или клеточную линию меланомы SKMEL5 (фиг. 1(D) и фиг. 10), демонстрируя, что huA33-BsAb сохраняло специфичность исходного антитела А33 в связывании антигенов-мишеней на клетках рака толстой кишки и подгруппе клеток рака желудка. Окрашивание активированных Т-клеток также показало, что huA33-BsAb связывались с CD3 на поверхности Т-клеток. См. фиг. 1(D).

Указанные результаты демонстрируют, что антитела согласно технологии по настоящему изобретению или их антиген-связывающие фрагменты специфично связываются с антигеном А33 с высокой аффинностью связывания. Соответственно, композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в на-

стоящем изобретении, применимы для детектирования белка A33 в образце.

Пример 4: Биологическая активность антител HuA33-BsAb-рекрутеров Т-клеток согласно технологии по настоящему изобретению.

HuA33-BsAb активировал свежие Т-клетки и вызывал их вход в клеточный цикл. Для проверки способности huA33-BsAb активировать нестимулированные Т-клетки, CFSE-меченные МКПК смешивали с клетками Colo205 при отношении Е:Т, составляющем 5, и культивировали в присутствии huA33-BsAb (1 мкг/мл). huA33-C825, который содержал нерелевантный scFv (Cheal SM et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 43:925-37 (2016)) вместо scFv против CD3, а также нерелевантное антитело BsAb-рекрутер Т-клеток L1CAM-BsAb против антигена L1CAM (L1CAM×CD3), которое не связывается с L1CAM(-) Colo205 по результатам FACS, применяли в качестве отрицательных контролей.

Через 24 и 96 часов клетки окрашивали различными маркерами Т-клеточной активации для оценки статуса Т-клеточной активации и пролиферации. Уже через 24 часа huA33-BsAb вызывало активацию как CD4(+), так и CD8(+) Т-клеток, как показано по положительной регуляции маркеров CD25 и CD69 на клеточной поверхности (фиг. 2(A)). Напротив, huA33-C825 и L1CAM-BsAb вызывали только минимальную положительную регуляцию CD25. L1CAM-BsAb не повышало экспрессию CD69, в особенности в CD4(+) Т-клетках, возможно, благодаря экспрессии L1CAM на Т-клетках. Сходным образом, наблюдалась положительная регуляция экспрессии PD-1 через 24 часа, которая сохранялась до 96 часов (фиг. 11(A)). Клеточное деление, измеренное с помощью разведения красителя CFSE, наблюдали как для CD4(+), так и CD8(+) Т-клеток через 96 часов (фиг. 2(B)). Для CD8(+) Т-клеток было показано большее число циклов клеточного деления, что указывает на то, что CD8(+) Т-клетки делились быстрее, чем CD4(+) Т-клетки (фиг. 2(C)). Контрольные антитела huA33-C825 не стимулировали значительное количество клеточных делений ни в одной из субпопуляций Т-клеток, что подтверждает необходимость активации CD3 для деления Т-клеток. L1CAM-BsAb вызывало низкий уровень клеточного деления, что согласуется с низким уровнем активации, наблюдаемым выше. При использовании клеток-мишеней GPA33(-) SKMEL5 huA33-BsAb не активировало Т-клетки (фиг. 11(B)). Указанные результаты демонстрируют, что активация Т-клеток huA33-BsAb зависит от присутствия когнатных антигенов на опухолевых клетках. Также наблюдалось, что деление клеток было связано с экспансией CD45RO(+) эффекторных клеток/клеток памяти (фиг. 2(D)), указывая на важность этой субпопуляции в опосредовании активности Т-BsAb, что было подтверждено ниже. Указанные анализы повторяли с использованием другой линии клеток рака толстой кишки LS174T, для которой были получены аналогичные заключения (фиг. 11(C)).

Чтобы определить, могут ли Т-клетки активироваться *in vivo*, был проведен анализ пролиферации *in vivo* путем смешивания меченных CFSE МКПК с клетками Colo205, и смесь имплантировали подкожно мышам DKO. На следующий день животным внутривенно вводили huA33-BsAb, а еще через 4 дня опухоли выделяли и анализировали с помощью FACS-анализа. Как показано на фиг. 2(E), примерно у 25% CD4(+) и CD8(+) Т-клеток усиливалась экспрессия CD25 при прохождении клеточного деления (прогрессирующее уменьшение в два раза флуоресценции CFSE), что позволяет предположить, что huA33-BsAb также способно стимулировать активацию и пролиферацию Т-клеток *in vivo*.

HuA33-BsAb индуцировало секрецию воспалительных цитокинов и цитолитических молекул. Был изучен профиль секретлируемых цитокинов Т-клеток, активированных huA33-BsAb в присутствии опухолей-мишеней. Общую фракцию Т-клеток очищали из МКПК и культивировали в присутствии опухолевых клеток Colo205 при отношении эффектор:мишень 5:1. Для оценки неспецифичной активации клетки SKMEL5 использовали в качестве отрицательного контроля. Супернатанты клеточных культур собирали ежедневно в течение 4 дней и уровни цитокинов и цитотоксических молекул измеряли с использованием мультиплексного метода на основе проточной цитометрии. Как показано на фиг. 3, как цитокины Th1 (IL-2, IFN γ , TNF α), так и цитокины Th2 (IL-4, IL-10) секретировались активированными Т-клетками, хотя IL-4 секретировался на гораздо более низком уровне, чем другие цитокины. Подобным образом, значительное количество IL-6 секретировалось активированными Т-клетками. Цитокин IL-17 α клеток Th17 также секретировался на высоком уровне. Все цитотоксические компоненты sFasL, sFas, гранзим А, гранзим В, перфорин и гранулизин высвобождались в супернатант.

HuA33-BsAb перенаправляло Т-клетки на специфичное уничтожение клеток рака толстой кишки и рака желудка. Была проверена способность huA33-BsAb перенаправлять Т-клетки на уничтожение раковых клеток. На основании изучения экспрессии GPA33 на множестве линий раковых клеток человека (фиг. 10) для исследования цитотоксичности были отобраны 3 клеточные линии рака толстой кишки (LS174T, SW1222 и Colo205) и одна клеточная линия рака желудка (SNU16). Эти клеточные линии классифицировали на подтипы MSI (LS174T) или MSS (SW1222, Colo205, SNU16) на основании профиля их микросателлитной нестабильности (Williams DS et al., PLOS ONE 5:e16012 (2011); Yoon K et al., Genome Research 23:1109-1117 (2013); Suter CM et al., Br J Cancer 88:413-419 (2003)). Кроме того, клетки LS174T имели мутацию KRAS G12D, в то время как другие клетки имели мутации или делеции p53 (Ahmed D et al., Oncogenesis 2:e71 (2013); Liu Y & Bodmer WF, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:976-981 (2006); Ku J-L & Park J-G: Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association 37:1-19 (2005); Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, et al., Molecular can-

cer therapeutics 5:2606-2612 (2006)).

Раковые клетки инкубировали с активированными Т-клетками при соотношении эффектор:мишень, составляющем 10:1, в присутствии huA33-BsAb в 10-кратных серийных разведениях. В качестве отрицательных контролей использовали GPA33(-) линию клеток меланомы SKMEL5 и линию клеток остеосаркомы TC32. Как показано на фиг. 4 (А), huA33-BsAb перенаправляло Т-клетки на специфичное уничтожение всех GPA33-экспрессирующих раковых клеток, независимо от их генетического фона, при этом Т-клетки не затрагивали SKMEL5 и TC32, что подтверждает антигенную специфичность huA33-BsAb-опосредованного TDCC. Казалось, что максимальный уровень цитотоксичности коррелировал с уровнем окрашивания в FACS-анализе (фиг. 1(D) и фиг. 4(A)). Более того, TDCC, индуцированная huA33-BsAb, был сильной со значениями EC50 в пиколярном диапазоне. См. фиг. 4(A).

Чтобы определить, какие субпопуляции Т-клеток мобилизовались антителом huA33-BsAb, сортировали субпопуляции клеток памяти, CD45RA(+)CD62L(+) и CD45RA(-)CD45RO(+)CD62L(-) из CD4(+) и CD8(+) Т-клеток. Сортированные клетки культивировали в присутствии опухолевых клеток Colo205 при соотношении Е:Т, составляющем 5:1, в течение 48 часов перед измерением цитотоксичности с использованием анализа лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Как показано на фиг. 4(B), субпопуляции Т-клеток памяти CD4(+) и CD8(+) были способны индуцировать цитотоксичность, при этом Т-клетки памяти CD8(+) обеспечивали более эффективное уничтожение при более высокой концентрации. Субпопуляции CD45RA(+)CD62L(+) как популяций CD4(+), так и CD8(+), большинство из которых представляло собой наивные Т-клетки, были способны индуцировать цитотоксичность через 48 часов, хотя активность была меньше по сравнению с Т-клетками памяти.

Когда Т-клетки из анализа TDCC были окрашены на CD45RO и CD25, было обнаружено, что экспрессия CD25 усиливалась в присутствии huA33-BsAb как во фракциях CD45RO+, так и в CD45RO- (фиг. 12(A) и фиг. 12(B)), что подтверждает, что huA33-BsAb может активировать как наивные, так и Т-клетки памяти. Большинство CD45RA(+)CD62L(+) Т-клеток оставались CD45RO(-) после инкубации, при этом в небольшой, но важной популяции увеличивалась экспрессия CD45RO, особенно среди клеток CD8(+). См. фиг. 12(B). Однако указанная популяция могла появляться либо в результате созревания наивных Т-клеток, либо в результате размножения редких CD45RO+ клеток, присутствующих в исходной культуре. Вместе указанные данные демонстрируют, что huA33-BsAb могут индуцировать сильную цитотоксичность в отношении клеток рака толстой кишки и рака желудка зависимым от GPA33 способом путем мобилизации как CD4, так и CD8 Т-клеток, особенно тех, которые имеют фенотип клеток памяти.

Эти результаты демонстрируют, что антитела согласно технологии по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с антигеном А33 с высокой аффинностью связывания. Соответственно композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в настоящей заявке, применимы для детектирования белка А33 в образце.

Пример 5: Аффинное созревание huASS-BsAb с использованием дрожжевого дисплея.

В попытке дополнительно улучшить активность huA33-BsAb использовали метод дрожжевого дисплея для обеспечения аффинного созревания scFv, полученного из huA33. Поскольку scFv имеет тенденцию легко агрегировать, был разработан метод быстрого преобразования scFv в huA33-BsAb-рекрутеры Т-клеток (которые являются более подходящим форматом и могут быть легко получены с высоким выходом и чистотой) (фиг. 13).

Способ был основан на одноэтапном методе лигирования 4 фрагментов, в котором использовался фермент SapI типа II для обеспечения "бесшовного" соединения разных фрагментов. Указанный способ можно было легко адаптировать к другим векторам или масштабировать до высокопроизводительного рабочего процесса. Технология многофрагментного клонирования In-Fusion® (Clontech Laboratories, Мантин-Вью, Калифорния) также была успешно протестирована, но оказалась менее надежной (данные не показаны), возможно, из-за специфических последовательностей вектора экспрессии.

По результатам анализа последовательностей 60 отдельных клонов были выбраны 7 клонов (фиг. 5(A)) для дополнительной характеристики с помощью НИР и TDCC-анализа. Для всех 7 клонов наблюдалась повышение аффинности связывания по сравнению с исходным антителом, варьирующее от 4,3- до 51-кратного повышения (фиг. 5(B)). Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи семи аффинно созревших клонов показаны на фигурах 30-36. Большинство улучшений приписывали более медленной скорости диссоциации. Для всех клонов наблюдалось небольшое улучшение в максимальном уничтожении в TDCC-анализах (фиг. 5(C)).

Указанные результаты демонстрируют, что антитела согласно технологии по настоящему изобретению или их антиген-связывающие фрагменты специфично связываются с антигеном А33 с высокой аффинностью связывания. Соответственно, композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в настоящем изобретении, применимы для детектирования белка А33 в образце.

Пример 6: In vivo терапевтические исследования с применением huASS-BsAb.

Эффективность huA33-BsAb исследовали in vivo на следующих моделях ксенотрансплантата у гуманизированных мышей DKO с применением двух различных моделей опухоли: (1) подкожное введение опухоли+подкожное введение эффекторов и (2) внутрибрюшинное введение опухоли+внутривенное вве-

дение эффекторов.

HuA33-BsAb обеспечивало лечение MSI-опухоли LS174T на модели подкожного введения ксенотрансплантата и подавляло опухолевый рост на модели внутрибрюшинного введения. Клетки LS174T смешивали с МКПК в отношении 1:1 и имплантировали подкожно мышам DKO. Как показано на фиг. 6(A), в обеих группах, не получавших лечение антителом - группе "только опухоль" и группе "опухоль+МКПК" - наблюдался быстрый опухолевый рост. У мышей из группы "опухоль+МКПК" развивалось опухолевое изъязвление, и их приходилось умерщвлять. Напротив, введение 6 доз huA33-BsAb в течение 3 недель приводило к эффективному лечению мышей - у животных не развивались опухоли в течение по меньшей мере 120 дней.

Для стимуляции злокачественных асцитозов - обычного явления при раке толстой кишки - экспрессирующие люциферазу клетки LS174T подсаживали внутрибрюшинно мышам DKO. Когда рост опухоли подтверждали по люминесценции, мышей рандомизировали в различные лечебные группы, группу, получающую обработку без антитела ("только опухоль"), группу "только опухоль+Т-клетки" ("опухоль + АТС") или группу, получающую внутривенные инъекции huA33-BsAb (7 доз в течение 3 недель) и еженедельные инъекции Т-клеток в течение 3 недель. Лечение начинали на 5 день после имплантации опухоли. Все Т-клетки инъецировали ретроорбитальным способом.

Как показано на фиг. 6(B) и фиг. 6(C), все контрольные группы (группа без антитела или группа "только опухоль + Т-клетки") демонстрировали экспоненциальный рост опухоли в брюшной полости. К 28 дню 3 из 4 мышей в группе без антител и 3 из 5 мышей из группы "опухоль + Т-клетки" умерли, соответственно, от опухолей. Напротив, huA33-BsAb значительно подавляло метастатический рост опухоли LS174T в абдоминальных областях у получавших лечение мышей. Все мыши оставались живыми по меньшей мере в течение 60 дней без дополнительной обработки. Эти результаты демонстрируют, что huA33-BsAb было эффективно в отношении опухолей CRC с генотипом MSI. Однако, как упоминалось ранее, опухоли MSI составляют лишь меньшую часть пациентов с CRC-раком. Большинство пациентов с CRC имеют генотип MSS. Следовательно, эффективность huA33-BsAb дополнительно проверяли на MSS-опухолях.

HuA33-BsAb вызвало лечение MSS-опухоли COLO205 на модели подкожного введения ксенотрансплантата и подавляло рост метастатической MSS-опухоли SW1222. Исследовали две клеточные линии рака толстой кишки Colo205 и SW1222 с генотипом MSS. Для клеток Colo205 опухоли имплантировали подкожно с использованием МКПК в качестве эффекторных клеток. В этой модели 4 доз huA33-BsAb было достаточно для полного уничтожения опухолей Colo205, и у мышей не формировались опухоли в течение по меньшей мере 4 месяцев после лечения в общем 6 дозами антител (фиг. 7(A) и фиг. 7(B)).

В случае клеточной линии SW1222 опухоли подсаживали внутрибрюшинно и животных обрабатывали 6 внутривенными дозами антитела в течение 3 недель и осуществляли внутривенное введение Т-клеток еженедельно в течение 2 недель. Как показано на фиг. 7(C) и фиг. 7(D), в двух контрольных группах наблюдался рост опухоли, распространяющийся по всей брюшной области, тогда как обработка huA33-BsAb подавляла рост опухоли и значительно продлевала выживаемость мышей ($p=0,0125$). Указанные результаты демонстрируют, что эффективность huA33-BsAb при лечении опухолей MSS была сопоставима с эффективностью при лечении опухолей MSI. Ожидается, что дополнительные циклы лечения будут полностью устранять опухолевый рост, как на моделях подкожного введения.

HuA33-BsAb ингибировало рост опухолей желудка на модели подкожного (ПК) введения ксенотрансплантата. GPA33 экспрессируется в субпопуляции раковых клеток желудка. FACS-анализ и анализы TDCC *in vitro* показали, что клетки SNU16 экспрессировали GPA33 и были чувствительны к уничтожению huA33-BsAb-перенаправленными Т-клетками. Ксенотрансплантат клеток SNU16 вводили подкожно после смешивания с МКПК человека. huA33-BsAb обеспечивало эффективное лечение мышей, содержащих подкожно введенные опухоли (фиг. 8(A)), и значительно продлевало выживание. В отличие от мышей NSG, мыши DKO были более устойчивы к приживлению человеческих МКПК. На модели подкожного введения SNU16 на 58 день (фиг. 8(B)) у большинства мышей наблюдался низкий уровень химеризма крови с большими вариациями.

Как показано выше, эффективность huA33-BsAb не зависела от генетического фона или мутационного статуса опухолей CRC, что является критичным биологическим свойством при желательной применимости для большинства CRC. В отличие от CAR-модифицированных Т-клеток, huA33-BsAb-перенаправленные Т-клетки не претерпевали клеточного истощения и непрерывно демонстрировали количественные свойства опухолевого хоуминга в течение >3 недель. Обеспечивалось лечение опухолей, несмотря на присутствие PD1 и PD-L1, и добавление блокады контрольных точек при субтерапевтических дозах huA33-BsAb еще более усиливало эти противоопухолевые свойства. Композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в настоящем изобретении, предлагают как FcR-зависимую, так и независимую от Т-клеток иммунотерапевтическую стратегию для диагностики и терапии рака, ассоциированного с A33.

Вместе полученные результаты демонстрируют, что антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно технологии по настоящему изобретению могут выявлять опухоли и ингибировать про-

грессирование роста опухоли и/или метастазирование. Соответственно, композиции на основе иммуноглобулинов, описанные в настоящей заявке, применимы для обнаружения и лечения А33-положительного рака у нуждающегося в этом субъекта.

Пример 7: Применение антител huA33-C825 согласно технологии по настоящему изобретению в претаргетной радиоиммунотерапии.

Основными недостатками в разработке агентов на основе антител для претаргетной радиоиммунотерапии (ПРИТ) являются чрезмерное облучение нормальных тканей, иммуногенность, субоптимальная доза в опухоли и низкий терапевтический индекс. Настоящий Пример продемонстрирует, что биспецифичные антитела huA33-DOТА согласно технологии по настоящему изобретению применимы в ПРИТ для лечения раковых заболеваний, экспрессирующих антиген А33 человека, таких как колоректальный рак.

Биспецифичные антитела А33-DOТА согласно технологии по настоящему изобретению содержат первый антигенсвязывающий сайт на основе гуманизованных антител А33, описанных в настоящей заявке, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывается с низкомолекулярным гаптеном (например, бензил-1,4, 7, 10-тетраазаацетилдодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой [DOТА-Bn]). Одноцепочечный Fv-фрагмент антитела против DOТА-Bn (ScFv), полученной на основе аффинно созревшего 2D 12,5-антитела, связывают с карбоксильным концом гуманизованной легкой цепи А33. На фиг. 37 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК тяжелой цепи биспецифичных антител huA33-huC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59 соответственно. На фиг. 38 показана аминокислотная последовательность и последовательность кДНК легкой цепи биспецифичных антител huA33-huC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61 соответственно. На фиг. 39 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи и легкой цепи биспецифичных антител huA33-mC825 (H2L2), которые соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 соответственно.

Опухолевые клеточные линии и реагенты для клеточных культур. Клеточную линию колоректального рака человека SW1222 поддерживали путем серийного пассирования. Клетки культивировали в минимальной питательной среде с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2,0 мМ глутамина, 100 единиц/мл пенициллина и 100 единиц/мл стрептомицина в условиях при температуре 37°C с 5%-ным содержанием CO₂. Культуры устанавливали и криоконсервировали в небольших аликвотах для ограничения срока пассирования до менее чем трех месяцев и периодически проверяли на микоплазму в соответствии со спецификациями производителя с использованием коммерческого набора (Lonza, Портсмут, Нью-Гэмпшир). Для трипсинизации во время пассирования и сбора клеток использовали раствор 0,25% трипсин/0,53 мМ ЭДТА в сбалансированном солевом растворе Хэнкса без кальция и магния. huA33-huC825 и huA33-mC825 продуцировали в клетках CHO в векторе экспрессии млекопитающих и очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А.

Исследования с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Биосенсор Biacore T100, сенсорный чип CM5 и связанные реагенты приобретали в компании GE Healthcare (Чикаго, Иллинойс). Рекомбинантный белок А33 человека приобретали в компании Novoprotein Scientific, Inc. (Саммит, Нью-Джерси). Конъюгат BSA-(Y)-DOТА-Bn получали, как описано в источнике: Cheal et al., Mol. Cancer Ther. 13 (7) (2014). Антигены А33 и DOТА иммобилизовали с использованием набора Amino Coupling (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс). Очищенные биспецифичные антитела и контрольные антитела анализировали и данные приводили к модели бивалентного анализатора с использованием программы для оценки Biacore T100, как описано в источнике Cheal et al., (2014).

Реагенты и протокол для ПРИТ и исследования ксенотрансплантата. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Мемориального онкологического центра им. Слоана Кеттеринга (Institutional Animal Care and Use Committee of Memorial Sloan Kettering Cancer Center), и проводились с соблюдением институциональных рекомендаций по правильному и гуманному использованию животных в исследованиях. Самкам бестимусных мышей nu/nu (6-8 недель; Harlan Sprague Dawley) позволяли акклиматизироваться в виварии в течение по меньшей мере одной недели. Группам животных инъецировали подкожно А33-положительные клетки SW1222 в левый бок с концентрацией опухолевых клеток 5×10^6 , которые были смешаны с матригелем (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) в соотношении 1:1, и за установленными опухолями (100-900 мм²) наблюдали в течение 7-10 дней с использованием формулы объема эллипсоида ($V=4/3\pi$; (длина/2×ширина/2×высота/2)). Все реагенты вводили внутривенно (ВВ) через заднюю хвостовую вену. Протокол ПРИТ включал инъекции: huA33-huC825 или huA33-mC825 [t=-28 ч] с последующим введением через 24 ч обеспечивающего клиренс агента (конъюгат 500 кДа декстран-(Y)-DOТА-Bn, полученный в соответствии с Orcutt et al., Nucl. Med. Biol. 38: 223-233 (2011) и разведенный в солевом растворе для инъекций). Коэффициент замещения молей (Y)-DOТА-Bn на моли декстрана составлял 61 ((Y)-DOТА-Bn /декстран) [t=-4 ч]. ¹⁷⁷Lu-DOТА-Bn (приготовленный, как описано ранее, путем инкубации аминокислоты-DOТА (p-NH₂-Bn-DOТА) из макроциклических соединений и ¹⁷⁷LuCl₃ (специфическая активность -30 Ки/мг; Perkin Elmer) и разведенный в солевом растворе для инъекций) вводили через 4 ч [t=0 ч]. Кроме того, huA33-

C825 был мечен радиоактивным I^{131} -индикатором для оценки поглощения опухолью во время ПРИТ.

Метод IODOGEN (Cheal, S. et al., Mol. Cancer Ther. 13(7): 1-10 (2014)) используют для получения ^{131}I -huA33-mC825 или ^{131}I -huA33-huC825 (конечная специфичная активность 95,5 МБк/мг с добавлением холодного huA33-huC825 или huA33-mC825 для достижения желаемой дозы в мг, радиохимическая чистота >98% по результатам эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления) и иммунореактивность клеточного связывания *in vitro* оценивали с использованием клеток SW1222 по существу, как описано в источнике Lindmo, T. et al., J. Immunol. Meth. 126(2): 183-189 (1990)). Для ПРИТ с использованием неспецифичного IgG-C825 вместо huA33-mC825 или huA33-huC825 использовалась эквивалентная доза (в мг) биспецифичного антитела, направленного на GD2 (hu3F8-C825).

Для анализа биораспределения *ex vivo* мышей умерщвляют путем асфиксии с помощью CO₂ (газ), опухоли и выбранные органы собирали, промывали водой и позволяли им высохнуть на воздухе, взвешивали и подвергали радиоанализу с помощью гамма-сцинтилляционного счета (Perkin Elmer Wallac Wizard 3" PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Интенсивность излучения корректировали с учетом фона и затухания, преобразовывали в значения активности с использованием системного калибровочного коэффициента, приводили к введенной активности и выражали в процентах инъецированной дозы на грамм (%ID/g). Различия в концентрации активности ^{177}Lu в опухоли и различных тканях анализировали с помощью непарного t-критерия Стьюдента, когда применимо.

Оценка поглощенных доз. Группам A33-положительных мышей, содержащих опухоли SW1222 (n=4-5), вводили 0,25 мг huA33-C825 (либо huA33-huC825, либо huA33-mC825), обеспечивающий клиренс агент (62,5 мкг; 25% (по массе)) и 1,85-2,0 МБк (-10 пкмоль) ^{177}Lu -DOTA-Bn и животных умерщвляли через 2, 24 и 120 ч после введения. Для каждой ткани неоткорректированные с учетом затухания данные зависимости концентрации активности от времени подгоняли с помощью Excel к 1-компонентной, 2-компонентной или более сложной экспоненциальной функции в зависимости от ситуации, и интегрировали аналитически для получения кумулятивной концентрации активности на единицу введенной активности (МБк-ч/г на МБк). Константу равновесия дозы ^{177}Lu для непроникающих излучений (8,49 г-сГр/МБк-ч) использовали для оценки поглощенных данной тканью доз для разных опухолей и выбранных органов, исходя из полного локального поглощения только бета-лучей ^{177}Lu без учета гамма-лучей и вклада от поглощения другими тканями. Для определения влияния дозы ^{177}Lu -DOTA-Bn на относительное поглощение ^{177}Lu -DOTA-Bn в опухоли и выбранных тканях с наивысшими поглощенными дозами (т.е. кровь, печень, селезенка и почки), группам самок бестимусных мышей (n=5/группа), содержащих опухоли SW1222, вводили 0,25 мг (1,19 нмоль) huA33-C825 (либо huA33-huC825, либо huA33-mC825) в момент времени t=-28 ч и 62,5 мкг обеспечивающего клиренс агента в момент времени t=-4 ч с последующим введением 11,1 МБк (11,14-11,40 МБк), 55,5 МБк (54,61-55,06 МБк) или 111 МБк (109,52-112,5 МБк). Животных всех групп умерщвляли через 24 часа после введения ^{177}Lu -DOTA-Bn (то есть во время максимального поглощения опухолью) для анализа биораспределения активности ^{177}Lu .

PET-визуализация ПРИТ + ^{86}Y -DOTA-Bn. Одной группе мышей, содержащих A33-положительные опухоли SW1222 в плечевой области (n=5), вводили 0,25 мг huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825), обеспечивающий клиренс агент (62,5 мкг 25% (по массе)) и 8,6-8,8 МБк (-50 пкмоль) ^{86}Y -DOTA-Bn и проводили неинвазивную визуализацию с использованием системы microPET Focus 120 (STI Molecular Imaging, Inc. Knoxville, TN) приблизительно через 2 и 20 ч после введения. Использовали следующие параметры получения изображений: энергетическое окно - 350-750 кэВ, временное окно совпадений -6 нсек и время экспозиции - 20 мин. Полученные данные в формате списка сортировали по двумерным гистограммам с помощью редискретизации Фурье и изображения поперечных срезов преобразовывали с помощью обратной проекции с фильтрацией в матрицу 128×128×95 (преобразованное пространственное разрешение составляло 2,6 мм на половину максимальной ширины (FWHM)). Данные изображения корректировали с учетом неоднородности отклика сканера, потери излучения во время затухания, физического затухания (ко времени инъекции) и коэффициента распада позитронов ^{86}Y . Коррекция с учетом ослабления, рассеяния или усреднения частичного объема не применялась. Эмпирически определенный коэффициент калибровки системы (т.е. мкКи/мл/сПс/воксел) для мышей использовали для преобразования интенсивности излучения вокселей в значения концентрации активности. Полученные данные изображения затем нормировали к введенной активности для определения с помощью анализа интересующей области процента введенной дозы на грамм (%ID/g) ткани, скорректированного с учетом радиоактивного распада ко времени инъекции. Программу AsiPRO VM 5.0 (Concorde Microsystems, Ноксвилл, Теннесси) использовали для выполнения изображений и анализа интересующей области (ROI) (как максимум, ROI, %ID/g). Животных умерщвляют через 24 ч после введения для анализа биораспределения *ex vivo*.

Автордиография и иммуногистохимия. Замороженные и помещенные в реактив ОСТ опухоли и почки от выбранных мышей, которым проводили ПРИТ с использованием huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) с последующим введением 11,1 (11,14-11,40 МБк), 55,5 (54,61-55,06 МБк) или 111 МБк (109,52-112,5 МБк) ^{177}Lu -DOTA-Bn (время умерщвления: через 24 часа после введения) разрезали на срезы по 10 мкм с использованием криостата (Avantik, Спрингфилд, Нью-Джерси) и немедленно переносили на рентгенографическую пластину (Fuji Photo Film, Kanagawa, Япония) в течение 72 ч и затем скани-

рвали с использованием сканера Typhoon FLA 7000 (GE, Питтсбург, Пенсильвания). Те же срезы подвергали окрашиванию гематоксилином и эозином и сканировали под микроскопом Olympus BX60, оборудованным контролируемым подвижным столиком (Olympus, Центральная Долина, Пенсильвания). Как изображения автордиограммы, так и изображения микроскопа обрабатывали и анализировали с использованием программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Терапия и сцинтилляционные исследования. Группам мышей, содержащим установленные после подкожного введения A33-положительные SW1222 ксенотрансплантаты, проводили введение huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) или ПРИТ на основе неспецифического (nc) IgG-C825 (т.е. лечение с одним циклом, инъекция ^{177}Lu -DOTA-Bn на 7 день после инокуляции опухоли) или два цикла ПРИТ (т.е. терапевтическое исследование с одним циклом, инъекции ^{177}Lu -DOTA-Bn на 10 и 17 день после инокуляции опухоли). Для терапевтического исследования с двумя циклами регистрировали объем опухоли на 10 день после инокуляции (TV 10) (т.е. в день первой инъекции ^{177}Lu -DOTA-Bn) и выражали (если приемлемо) как среднее \pm SD. Следующие определения применяются для описания ответа на лечение: полный ответ (CR) определяется как сокращение объема опухоли до $<100 \text{ мм}^3$. Стойкий ответ (DR) определяется как выживаемость через 140 дней после лечения. Избыточная опухолевая нагрузка определяется как объем опухоли $>2000 \text{ мм}^3$. Для сцинтиграфического исследования выбранные группы мышей, содержащих A33-положительные опухоли SW1222, подвергавшихся лечению, помещали под анестезию путем газовой ингаляции до сканирования на системе nanoSPECT (Bioscan, Вашингтон, округ Колумбия) через 20 часов после инъекции в течение 30 минут ($\sim 10^5$ импульсов на изображение) с применением низкоэнергетического коллиматоров с высоким разрешением и окна, установленного на 208 кэВ. Изображения преобразовывали в матрицу 256×256 с применением программы Bioscan HiSPECT и загружали в программу ASIPro VM для анализа.

Результаты. Дозу huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) выбирали на основе пилотных исследований биораспределения на мышах, имеющих опухоли SW1222, через 24 ч после инъекции ^{177}Lu -DOTA-Bn с применением 0,1-0,6 мг huA33-C825 (0,48-2,86 нмоль) и фиксированных отношений обеспечивающего клиренс агента и ^{177}Lu -DOTA-Bn (5,6 МБк). Затем проводили дополнительные эксперименты по исследованию биораспределения для оптимизации дозы обеспечивающего клиренс агента во время ПРИТ. Группам имеющих опухоль мышей ($n=3-4$ на группу) вводили huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) с последующим введением через 24 ч любого из: солевого раствора (т.е. наполнителя), 2,4% (по массе, относительно предварительно выбранной дозы huA33-C825), 5% (по массе), 10% (по массе) или 25% (по массе) дозы обеспечивающего клиренс агента (0-62,5 мкг/мышь). Еще через 4 ч мышам инъекцировали 5,6 МБк ^{177}Lu -DOTA-Bn и животных умерщвляли через 24 ч для проведения анализа биораспределения. Ожидается, что доза обеспечивающего клиренс агента будет вносить существенный вклад в активность ^{177}Lu в кровотоке (т.е. в крови) и сможет снижать способность последующего захвата ^{177}Lu -DOTA-Bn в опухоли.

Затем проводили исследования титрования дозы ^{177}Lu -DOTA-Bn с использованием оптимизированных доз ПРИТ для huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) и обеспечивающего клиренс агента. Для исследований титрования дозы Lu-DOTA-Bn данные биораспределения активности ^{177}Lu для опухоли и критичных выбранных тканей (крови, печени, селезенки и почек) сравнивали между группами, получившими разные дозы ^{177}Lu -DOTA-Bn, как по %ID/g, так и по абсолютному поглощению (кБк/г). Наконец, проводили эксперимент по исследованию одномоментного биораспределения через 24 ч после инъекции меченного ^{131}I -индикатором huA33-C825 (0,39-0,40 МБк с добавлением холодных huA33-C825 до концентрации 1,19 нмоль) на мышах, имеющих опухоли SW1222, для оценки абсолютного поглощения антитела huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) в опухоли (пкмоль/г) во время ПРИТ.

Определяли биораспределение радиоактивно меченного DOTA-Bn и проводили оценку поглощенных доз у мышей, которым имплантировали опухолевые клетки SW1222. ПРИТ проводили на группах мышей, имеющих A33-положительные опухоли SW1222, с введением оптимальных доз huA33-C825 и обеспечивающего клиренс агента и последующим введением 2,0 МБк (-10 пкмоль) ^{177}Lu -DOTA-Bn и проводили исследование биораспределения через 2-120 ч после введения ^{177}Lu -DOTA-Bn для определения времени сохранения активности ^{177}Lu в опухоли и различных нормальных тканях. Вкратце, активность ^{177}Lu в опухоли и различных нормальных тканях определяли с применением анализа биораспределения и последующей ПРИТ при использовании оптимальных доз A33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) и обеспечивающего клиренс агента на основе декстрана и 2,0 МБк (-10 пкмоль) ^{177}Lu -DOTA-Bn. Группы мышей, имеющих опухоль SW1222 ($n=4-5$), получали huA33-C825 с последующим введением через 24 ч обеспечивающего клиренс агента на основе декстрана и введением 2,0 МБк (-10 пкмоль) ^{177}Lu -DOTA-Bn через дополнительные 4 ч. Животных одной группы умерщвляли через 2, 24 и 120 ч после введения ^{177}Lu -DOTA-Bn для анализа биораспределения. Указанные данные использовали, как описано в настоящем изобретении, для оценки поглощенных доз при радиоиммунотерапии с использованием ^{177}Lu -DOTA-Bn. Ожидается, что поглощение опухолью ^{177}Lu будет происходить очень быстро после введения и будет снижаться в течение следующих 96 ч через 120 ч после введения. Для каждой области-мишени поглощенную дозу рассчитывали как продукт ^{177}Lu равновесной константы дозы для

непроникающих излучений (т.е. бета-лучей) и накопленной активности ^{177}Lu в области-мишени, исходя из полного локального поглощения бета-лучей ^{177}Lu без учета гамма-лучей и вклада поглощения дозы другими тканями. Ожидается, что высокий терапевтический индекс опухоль/кровь будет наблюдаться во время лечения с одним циклом и практически не будет наблюдаться токсичности в течение продолжительных периодов времени у субъектов, у которых наблюдаются стойкие ответы. При оценке с применением PET-визуализации ожидается получить результаты поглощения опухолью, сходные с результатами после ПРИТ.

Данный Пример демонстрирует эффективность ПРИТ с использованием биспецифичных антител A33-DOТА согласно технологии по настоящему изобретению в отношении A33-положительных опухолей. Ожидается, что прогрессирующее повышение терапевтического индекса и снижение абсолютного опухолевого захвата будет наблюдаться при увеличении доз. Соответственно, биспецифичные антитела huA33-DOТА согласно технологии по настоящему изобретению применимы для лечения типов рака, экспрессирующих человеческий антиген A33, таких как колоректальный рак.

Пример 8: In vivo терапевтические эффекты антител huA33-C825 согласно технологии по настоящему изобретению.

Данный Пример иллюстрирует in vivo эффективность биспецифичного антитела huA33-C825 в ПРИТ для опосредования снижения опухолевой нагрузки у мышей, содержащих A33-положительные раковые клетки. В частности, данный Пример описывает эффект терапии, включающей один цикл и два цикла, на опухолевую нагрузку у содержащих опухоль SW1222 мышей.

Во время терапевтического исследования, включающего один цикл, 5 групп содержащих опухоль мышей (n=6-8 на группу) обрабатывали любым из следующих вариантов: наполнитель (т.е. отсутствие лечения, n=8, TV_7 : $76 \pm 15 \text{ мм}^3$), только 33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn (вводили наполнитель вместо инъекций биспецифичного антитела и обеспечивающего клиренс агента, n=6, TV_7 : $116 \pm 23 \text{ мм}^3$), один цикл IgG-C825 ПРИТ+33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn (неспецифичное лечение, вводили IgG-C825 вместо huA33-C825, n=8, TV_7 : $100 \pm 10 \text{ мм}^3$) или один цикл huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) ПРИТ+11,1 МБк или 33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn (для обеих групп n=8, TV_7 : $103 \pm 17 \text{ мм}^3$ и TV_7 : $93 \pm 15 \text{ мм}^3$, соответственно). Ожидается, что относительное опухолевое поглощение будет снижаться с повышением дозы ^{177}Lu -DOТА-Bn во время лечения. Ожидается, что у групп содержащих опухоль мышей, либо не получающих лечение, либо получающих лечение, состоящее только из 33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn или одного цикла IgG-C825 ПРИТ+33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn, не будет наблюдаться опухолевого ответа. Ожидается, что скинтиграфическое исследование для двух последних групп, получавших ^{177}Lu -DOТА-Bn, покажет минимальную активность в области опухоли. Напротив, в группах, получавших лечение с одним циклом huA33-C825 ПРИТ (huA33-huC825 или huA33-mC825)+11,1 МБк или 33.3 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn ожидается увидеть замедление опухолевого роста после лечения.

В ходе второго терапевтического исследования оценивали ПРИТ на основе huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825), включающую два цикла. Всех мышей из любых групп, не получавших лечение (n=5/ TV_{10} : $314 \pm 77 \text{ мм}^3$), умерщвляли в течение 30 дней из-за избыточной опухолевой нагрузки. Ожидается, что лечение двумя циклами ПРИТ+11,1 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn (общая доза ^{177}Lu -DOТА-Bn 22,2 МБк) (n=5/ TV_{10} : $462 \pm 179 \text{ мм}^3$) приведет к полному опухолевому ответу и/или задержке опухолевого роста у получающих лечение субъектов.

Исследования токсичности. Вкратце, в целом шести мышам, которым проводили два цикла обработки ПРИТ+11,1 МБк ^{177}Lu -DOТА-Bn (n=3) или два цикла обработки ПРИТ+1,5 мКи ^{177}Lu -DOТА-Bn (n=3), проводили оценку анатомической патологии почек, костного мозга, печени и селезенки вплоть до 9 недель после обработки. Ожидается, что почки, костный мозг, печень и селезенка будут нормальными у получавших лечение животных и что лечение на основе ПРИТ не будет сопровождаться вызванным радиацией токсическим эффектом.

Излечивающая лечебно-диагностическая ПРИТ. Бестимусным мышам, имеющим установленные опухоли SW1222 после подкожного введения ксенотрансплантатов (n=20; объем опухоли= $102 \pm 40 \text{ мм}^3$; среднее \pm стандартное отклонение (SD)) проводили лечение (n=5-10/группу) любым из следующих вариантов: отсутствие лечения (n=5), только ^{177}Lu -DOТА-Bn (n=5) или режим ПРИТ с тремя циклами, состоящий из ПРИТ huA33-C825 (huA33-huC825 или huA33-mC825) + 55 МБк of ^{177}Lu -DOТА-Bn (n=10; в общем: 165 МБк). Серийную визуализацию на системе nanoSPECT/CT проводили у пяти выбранных случайным образом мышей, которые подвергались D-ПРИТ в течение вплоть до 160 часов после инъекции первого цикла ^{177}Lu -DOТА-Bn для дозиметрического расчета. Ожидается, что D-ПРИТ будет вызывать полный опухолевый ответ у всех получавших лечение животных с отсутствием очевидного токсического эффекта в отношении почек, печени, селезенки и костного мозга. Ожидается, что визуализация лютеция-177 с помощью системы nanoSPECT/CT у животных, получавших лечение ПРИТ с режимом, включающим три цикла, покажет сильные различия с видимым поглощением в опухоли и минимальным фоновым уровнем в нормальных тканях. Указанные результаты демонстрируют, что биспецифичные антитела huA33-DOТА согласно технологии по настоящему изобретению применимы для снижения опухолевой нагрузки in vivo и что лечебно-диагностическая терапия на основе ПРИТ может иметь лечебное действие

и/или быть применимой для обнаружения опухоли у субъекта.

Лечебно-диагностическое одновременное лечение и корректируемая по изображениям дозиметрия в реальном времени. NanoSPECT/CT применяли для количественной визуализации с высоким разрешением у мышей, подвергавшихся лечению ^{177}Lu -D-ПРИТ, для дозиметрии в реальном времени. Бестимусную мышь, имеющую опухоль SW1222 (объем: 100 мм^3 в соответствии с измерением штангенциркулем) лечили ПРИТ на основе huA33-C825 с одним циклом (huA33-huC825 или huA33-mC825) + 55 МБк ^{177}Lu -DOTA-Bn и визуализировали с помощью системы nanoSPECT/CT три раза после инъекции ^{177}Lu -DOTA-Bn: через 1, 24 и 160 часов после инъекции. Изображения корректировали с учетом затухания к моменту инъекции и данные калибровали с применением известных стандартов активности. Концентрацию активности в опухоли определяли с применением анализа области интереса на откалиброванных изображениях.

Соответственно, биспецифичные антитела huA33-DOTA согласно технологии по настоящему изобретению применимы для лечения A33-положительных типов рака и применимы для обнаружения опухоли у субъекта.

Пример 9: Ex vivo исследования биораспределения с использованием биспецифичных антител huASS-DOTA согласно технологии по настоящему изобретению.

GPA33(+) клетки линии колоректального рака человека SW1222 получали из Института Людвига иммунотерапии рака (Ludwig Institute for Cancer Immunotherapy, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк). Клетки SW1222 культивировали в минимальной ростовой среде с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2,0 мМ глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Все клетки поддерживали в окружении при 37°C с 5% содержанием CO_2 (газ). После получения клеточной линии культуры устанавливали и криоконсервировали в малых аликвотах для ограничения времени пассирования клеток до менее чем трех месяцев и периодически исследовали на отсутствие микоплазмы с применением коммерческого набора (Lonza, Базель, Швейцария). Раствор 0,25% трипсин/0,53 мМ ЭДТА в сбалансированном солевом растворе Хэнкса без кальция и магния использовали для трипсинизации при пересеве и сборе клеток, для установления опухоли SW1222 группам мышей инокулировали клетки в концентрации $5,0 \times 10^6$ в 200 мкл клеточной суспензии в смеси среды и восстановленной базальной мембраны в отношении 1:1 (BD Matrigel, Collaborative Biomedical Products Inc., Бедфорд, Массачусетс) в нижнюю часть бока посредством подкожной (ПК) инъекции и установление опухолей ($100\text{-}300 \text{ мм}^3$) происходило в пределах 7-10 дней.

Для всех внутривенных инъекций мышам осторожно прогревали с помощью ИК-лампы и помещали на фиксатор. Мышам стерилизовали хвосты с помощью спиртовых прокладок и инъекции осуществляли в заднюю хвостовую вену.

Для анализа биораспределения после введения радиоактивной метки мышам умерщвляли путем CO_2 (газ)-опосредованной асфиксии и опухоль и выбранные органы собирали, промывали водой и позволяли высушиваться на воздухе, взвешивали и проводили радиоанализ с помощью гамма-сцинтилляционного счета (Wallac Wizard 3", Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Интенсивность излучения корректировали с учетом фона и затухания, переводили в значения активности с применением системного калибровочного коэффициента, специфичного для изотопа, нормировали к введенной активности и выражали как среднее $\pm \text{SD}$ в %ID/г, если иное не указано.

Для определения биораспределения huA33-DOTA BsAb мышам, содержащим опухоль SW1222 (численность групп: n=2 для групп, включавших этап получения обеспечивающего клиренс агента (CA), и n=1 для контроля, получавшего наполнитель, представляющий собой солевой раствор; масса опухолей ex vivo варьировала от 225 до 571 мг на момент оценки биораспределения) вводили внутривенно через заднюю хвостовую вену три отдельных реагента: 0,25 мг (1,19 нмоль) huA33-C825 (BC155-3, клон 2G7) в момент времени t=-28 ч с последующим введением обеспечивающего клиренс агента, представляющего собой комплекс 500 кДа декстран-DOTA(Y), в момент времени t=-4 ч и комплекса [^{177}Lu]Lu-DOTA-биотин (50 мкКи) в момент времени t=0 ч. Исследования биораспределения проводили через 24 часа после инъекции комплекса [^{177}Lu]Lu-DOTA-биотиновая метка. Обеспечивающий клиренс агент, представляющий собой 500 кДа декстран-DOTA(Y), и комплекс [^{177}Lu]Lu-DOTA-биотин готовили с применением способов, описанных в источнике: Orcutt, K. D. et al., Mol Cancer Ther 11:1365-1372 (2012); идентичный протокол радиохимического анализа, описанного для анализа комплекса [^{177}Lu]Lu-DOTA-бензол, использовали для анализа [^{177}Lu]Lu-DOTA-биотин. %ID/г=процентная инъекционная доза на грамм ткани.

Как показано на фиг. 40, у животных, подвергнутых ПРИТ с использованием биспецифичных антител huA33-DOTA согласно технологии по настоящему изобретению, наблюдался высокий уровень проникновения антител в опухоль при использовании или без использования этапа введения обеспечивающего клиренс агента (примерно 20-25% ID/г, локализованного в GPA33(+) опухоли), что демонстрирует, таким образом, что биспецифичные антитела huA33-DOTA могут эффективно нацеливаться на опухоли in vivo.

Соответственно, биспецифичные антитела huA33-DOTA согласно технологии по настоящему изобретению применимы для лечения A33-положительных типов рака и применимы для обнаружения опу-

холей у субъекта.

Эквиваленты.

Технология согласно настоящему изобретению не ограничивается конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем изобретении, которые, как предполагается, приведены исключительно в качестве иллюстрации отдельных аспектов технологии согласно настоящему изобретению. В рамках объема и сущности изобретения возможны многие модификации и вариации указанной технологии согласно настоящему изобретению, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Функционально эквивалентные способы и устройства в пределах объема технологии согласно настоящему изобретению, помимо перечисленных в настоящей заявке, будут понятны специалистам в данной области техники из описаний согласно предшествующему уровню техники. Предполагается, что такие модификации и вариации входят в объем технологии согласно настоящему изобретению. Следует понимать, что указанная технология не ограничивается конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, безусловно, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем изобретении, приведена исключительно в целях описания конкретных вариантов реализации и не ограничивает настоящее изобретение.

Кроме того, когда признаки или аспекты изобретения описаны в рамках групп Маркуша, специалисту в данной области будет очевидно, что изобретение, таким образом, также описано в рамках любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Как ясно специалисту в данной области техники, для любой и для всех целей, в частности, для обеспечения письменного описания, все диапазоны, описанные в настоящем изобретении, также включают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон может быть с легкостью определен как такой же диапазон, достаточным образом описывающий и обеспечивающий тот же диапазон, разбитый по меньшей мере на равные половины, трети, четверти, пятые, десятые части и т.д. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем изобретении, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Специалисту в данной области техники также будет очевидно, что все формулировки, такие как "вплоть до", "по меньшей мере", "больше чем", "менее чем" и т.д., включают указанное число и относятся к диапазонам, которые могут быть далее разбиты на поддиапазоны, как обсуждается выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый индивидуальный член. Таким образом, например, группа, содержащая 1-3 клетки, относится к группам, содержащим 1, 2 или 3 клетки. Сходным образом, группа, содержащая 1-5 клеток, относится к группам, содержащим 1, 2, 3, 4 или 5 клеток и т.д.

Все патенты, патентные заявки, предварительные заявки и публикации, на которые ссылаются или которые цитируются в настоящем документе, полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки, включая все фигуры и таблицы, при условии что они не противоречат категоричным принципам настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против A33 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H) и переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), где:

(a) V_H содержит последовательность V_H -CDR1 FTFSTYDMS (SEQ ID NO: 37), последовательность V_H -CDR2 TISSGGSYTYLDSVKG (SEQ ID NO: 38) и последовательность V_H -CDR3 TTVVPFAY (SEQ ID NO: 39); и

(b) V_L содержит последовательность V_L -CDR1, последовательность V_L -CDR2 и последовательность V_L -CDR3, выбранные из группы, состоящей из:

KASQNVRTVVA (SEQ ID NO: 40), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42);

KASQNVRTWA (SEQ ID NO: 40), LASDRHT (SEQ ID NO: 43) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42);

KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QHWSYPLT (SEQ ID NO: 45); и

KASQNVRTLVA (SEQ ID NO: 44), LASNRHT (SEQ ID NO: 41) и QYWSYPLT (SEQ ID NO: 42).

2. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по п.1, содержащие Fc-домен антитела, имеющего изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD и IgE.

3. Антиген-связывающий фрагмент антитела по п.1, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fab', scF_v и F_v.

4. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC), выбранные из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26;

SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30;

SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32; и

SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, соответственно.

5. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-4, где указанное ан-

титело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

6. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антиген-связывающий фрагмент связываются с эпитопом белка A33, содержащим по меньшей мере от пяти до восьми последовательных аминокислотных остатков последовательности SEQ ID NO: 57.

7. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-6, где указанное антитело содержит константную область IgG1, содержащую одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и K322A или константную область IgG4, содержащую мутацию S228P.

8. Антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из п.1 или 2, содержащие последовательность V_L , которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности V_L , которая присутствует в любой из SEQ ID NO: 26, 30, 32 или 36; и/или последовательность V_H , которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности V_H , присутствующей в любой из SEQ ID NO: 25, 29, 31 или 35.

9. Конъюгат антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-8, где указанные антитело или антиген-связывающий фрагмент конъюгированы с агентом, выбранным из группы, состоящей из изотопов, красителей, хромогенов, контрастирующих агентов, лекарственных средств, токсинов, цитокинов, ферментов, ингибиторов ферментов, гормонов, антагонистов гормонов, факторов роста, радионуклидов, металлов, липосом, наночастиц, РНК, ДНК или любой их комбинации.

10. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-8, где указанное антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела способны связываться с белком A33.

11. Вектор экспрессии, содержащий рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты по п.10.

12. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-8, содержащая рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты по п.10 или вектор по п.11.

13. Композиция для лечения ассоциированного с A33 рака, содержащая в эффективном количестве антитело или антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-8 или конъюгата антитела или антиген-связывающего фрагмента по п.9 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Биспецифичное антитело, включающее антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела против A33 по п.1 и антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, которое: связывается с Т-клетками, В-клетками, миелоидными клетками, плазматическими клетками, тучными клетками, CD3, CD4, CD8, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74, CD22, CD14, CD15, CD16, CD123, гамма/дельта-TCR, NKp46, KIR или низкомолекулярным DOTA-гаптеном.

15. Способ лечения ассоциированного с A33 рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-8, или конъюгата антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.9, где указанные антитело или фрагмент антитела специфично связываются и нейтрализуют активность белка A33.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что ассоциированный с A33 рак представляет собой коло-ректальный рак, псевдомиксому брюшины, рак аппендикса, рак поджелудочной железы или рак желудка.

17. Способ по п.15 или 16, отличающийся тем, что указанное антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела или конъюгат вводят указанному субъекту раздельно, последовательно или одновременно с дополнительным терапевтическим агентом.

18. Способ обнаружения опухоли у субъекта *in vivo*, включающий

(а) введение указанному субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-8 или конъюгата антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.9, где указанные антитело или фрагмент сконструированы с возможностью локализации в опухоли, экспрессирующей A33, и мечены радиоизотопом; и

(б) обнаружение наличия опухоли у указанного субъекта путем детектирования уровней радиоактивности, испускаемой указанным антителом или фрагментом антитела, превышающих контрольное значение.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что указанные уровни радиоактивности, испускаемой указанным антителом или фрагментом антитела, выявляют с применением позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

20. Набор для обнаружения A33 ассоциированного рака, содержащий антитело или антиген-связывающий фрагмент для связывания A33 по любому из пп.1-8 или конъюгат антитела или антиген-связывающего фрагмента по п.9 и инструкции по применению.

21. Набор для лечения A33 ассоциированного рака, содержащий антитело или антиген-связывающий фрагмент для связывания A33 по любому из пп.1-8 или конъюгат антитела или антиген-связывающего фрагмента по п.9 и инструкции по применению.

22. Способ обнаружения солидной опухоли, экспрессирующей A33, у нуждающегося в этом

субъекта, включающий

(а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело против А33 по п.14, где указанное биспецифичное антитело против А33 связывается с радиоактивно меченым DOTA-гаптенем и антигеном А33 и где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в А33-экспрессирующей солидной опухоли; и

(b) обнаружение наличия солидной опухоли у указанного субъекта путем детектирования уровней радиоактивности, испускаемых указанным комплексом, превышающих контрольное значение.

23. Способ выбора субъекта для претаргетной радиоиммунотерапии опухоли, экспрессирующей А33, включающий

(а) введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело против А33 по п.14, где указанное биспецифичное антитело против А33 связывается с радиоактивно меченым DOTA-гаптенем и антигеном А33 и где указанный комплекс сконструирован с возможностью его локализации в экспрессирующей А33 солидной опухоли;

(b) детектирование уровней радиоактивности, испускаемых указанным комплексом; и

(с) выбор указанного субъекта для проведения претаргетной радиоиммунотерапии, в случае, если указанные уровни радиоактивности, испускаемые указанным комплексом, превышают контрольное значение.

24. Способ лечения ассоциированного с А33 рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества комплекса, содержащего радиоактивно меченный DOTA-гаптен и биспецифичное антитело против А33 по п.14, где указанное биспецифичное антитело против А33 связывается с радиоактивно меченым DOTA-гаптенем и антигеном А33 и где указанный комплекс сконструирован с возможностью локализации в экспрессирующей А33 опухоли.

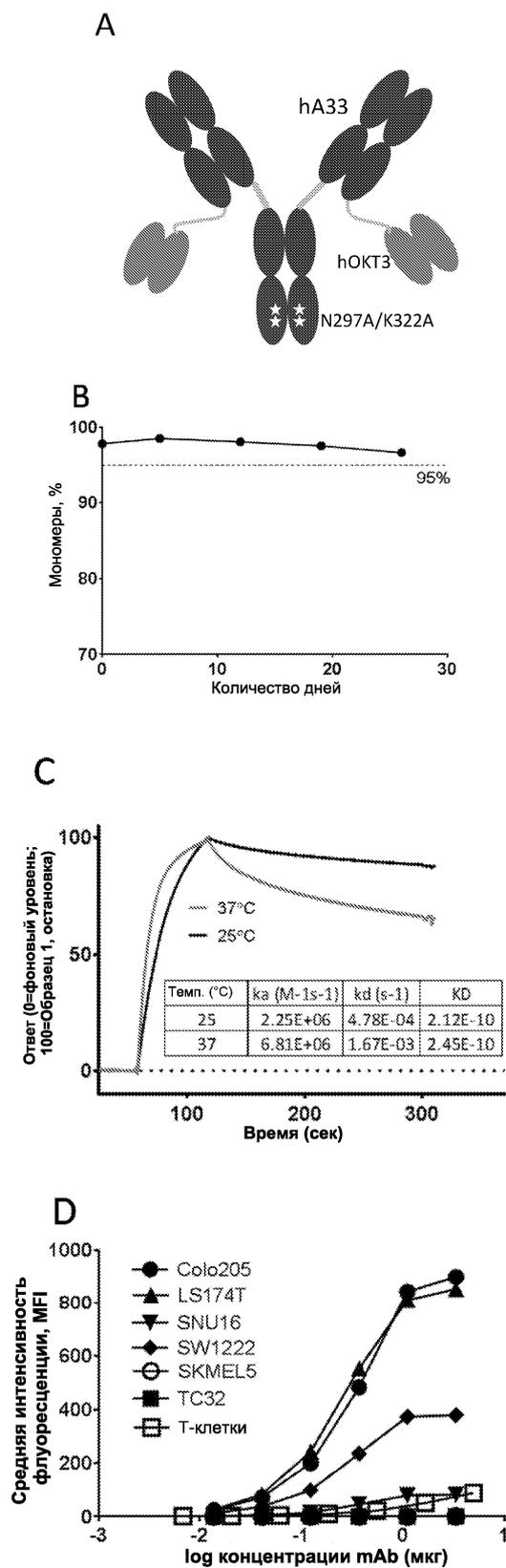
25. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный ассоциированный с А33 рак представляет собой колоректальный рак, псевдомиксому брюшины, рак аппендикса, рак поджелудочной железы или рак желудка.

26. Способ лечения рака, ассоциированного с А33, у нуждающегося в этом субъекта, включающий

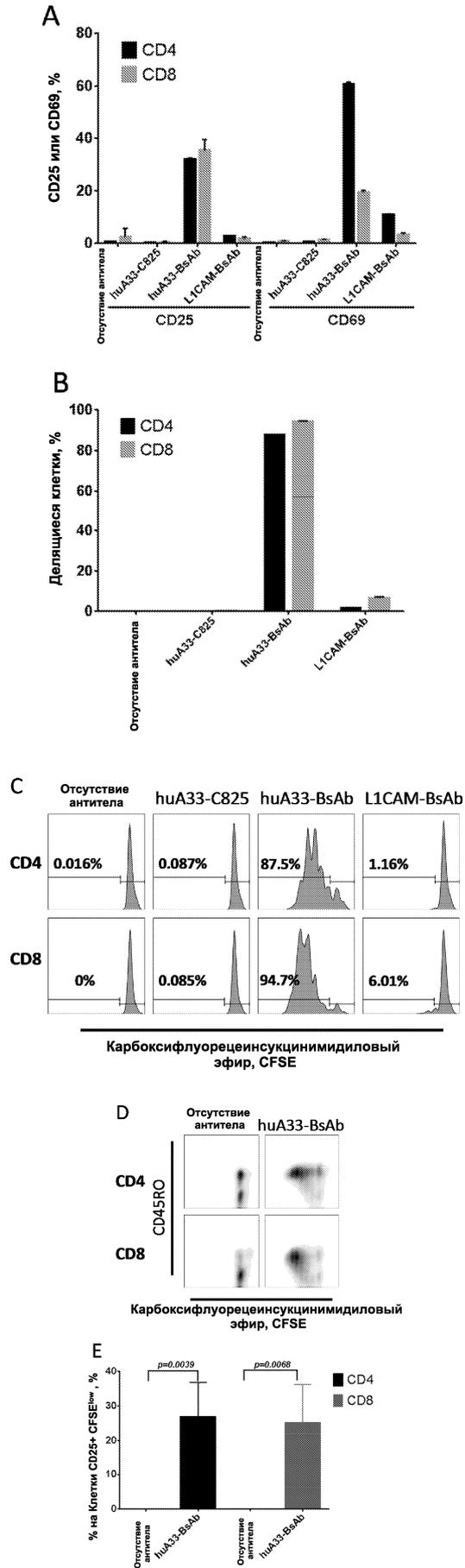
(а) введение эффективного количества биспецифичного антитела против А33 по п.14, где указанное биспецифичное антитело против А33 связывается с радиоактивно меченым DOTA-гаптенем и антигеном А33 и где указанное биспецифичное антитело против А33 сконструировано с возможностью локализации в экспрессирующей А33 опухоли; и

(b) введение эффективного количества радиоактивно меченного DOTA-гаптена указанному субъекту, где указанный радиоактивно меченный DOTA-гаптен сконструирован с возможностью связывания с указанным биспецифичным антителом против А33.

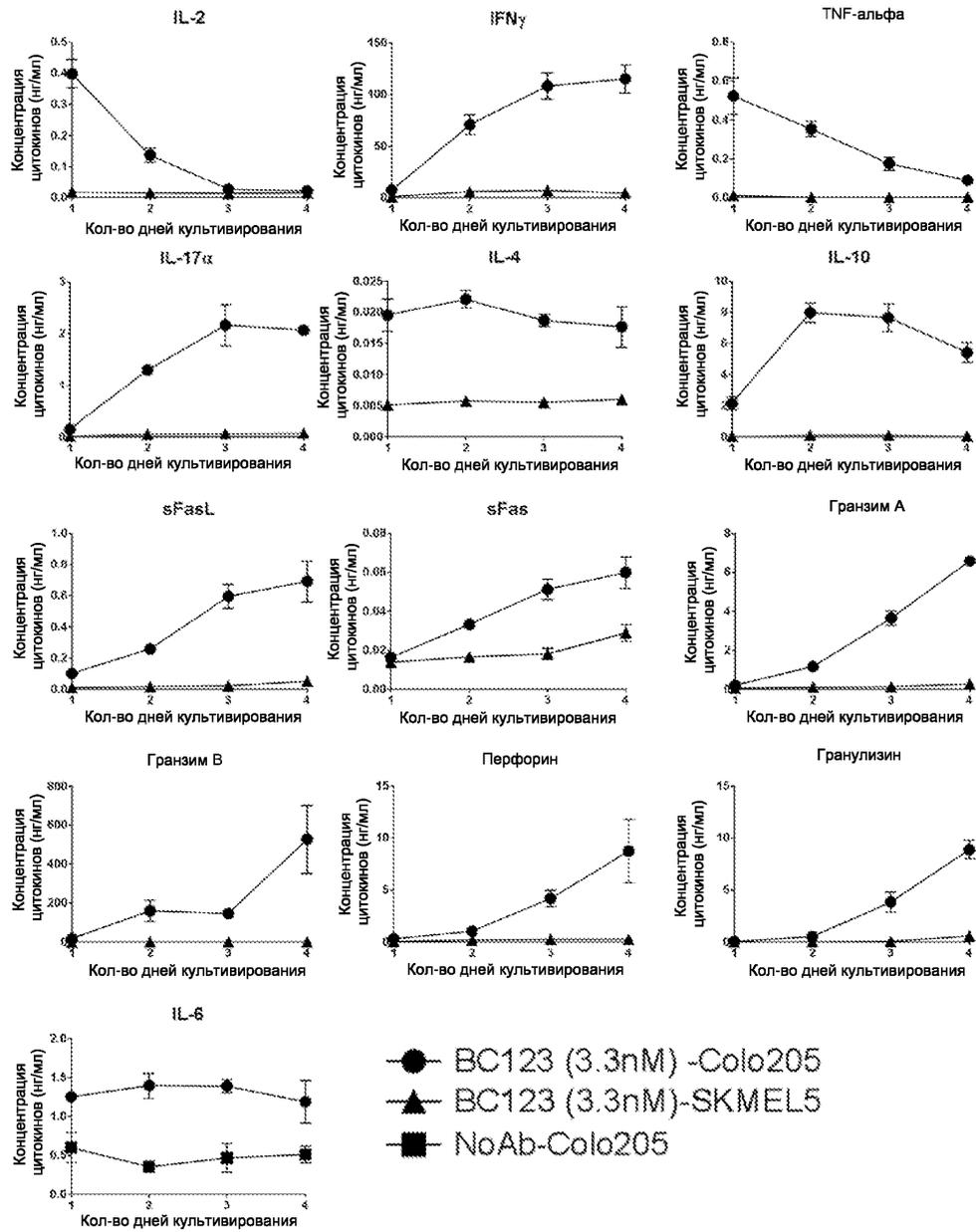
27. Способ по п.26, дополнительно включающий введение эффективного количества обеспечивающего клиренс агента указанному субъекту до введения радиоактивно меченного DOTA-гаптена.



Фиг. 1

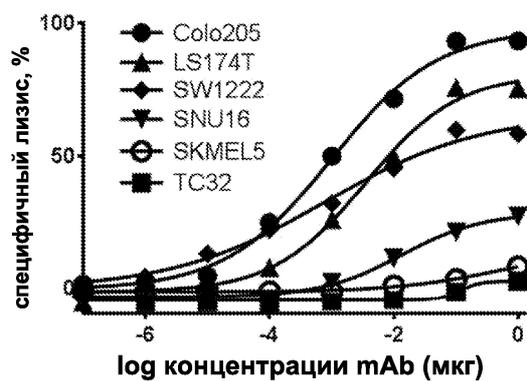


Фиг. 2



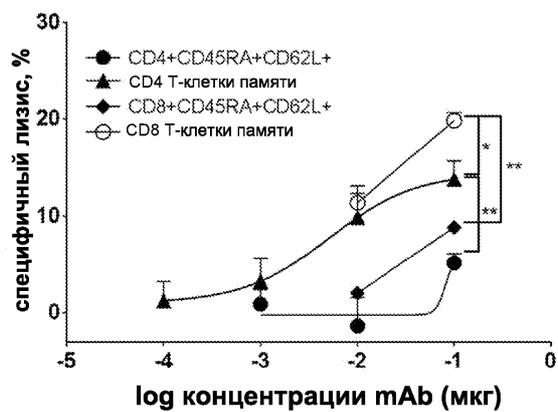
Фиг. 3

A



	Colo205	LS174T	SNU16	SW1222
EC50	4,89 пкМ	17 пкМ	66 пкМ	3,96 пкМ

B



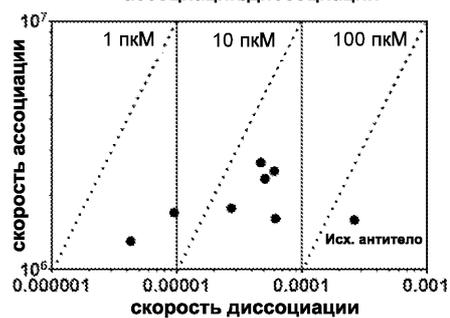
Фиг. 4

A

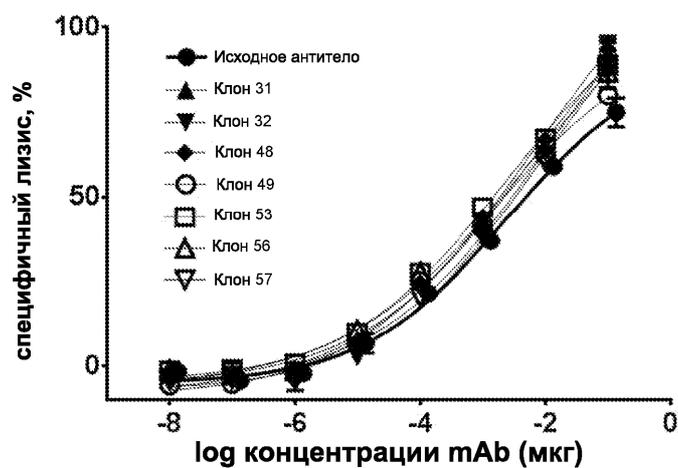
Клоны	Тяжелая цепь							Легкая цепь						
			CDR1		CDR2			CDR1		CDR2		CDR3		
	5	13	28	32	52	53	107	18	31	32	53	83	90	91
	V	K	A	Y	S	S	W	R	T	V	N	F	Q	H
31		E	T											
32	E		T											Y
48											D			Y
49			T							L				
53			T											Y
56							R			L				Y
57			T					S				V		Y

B

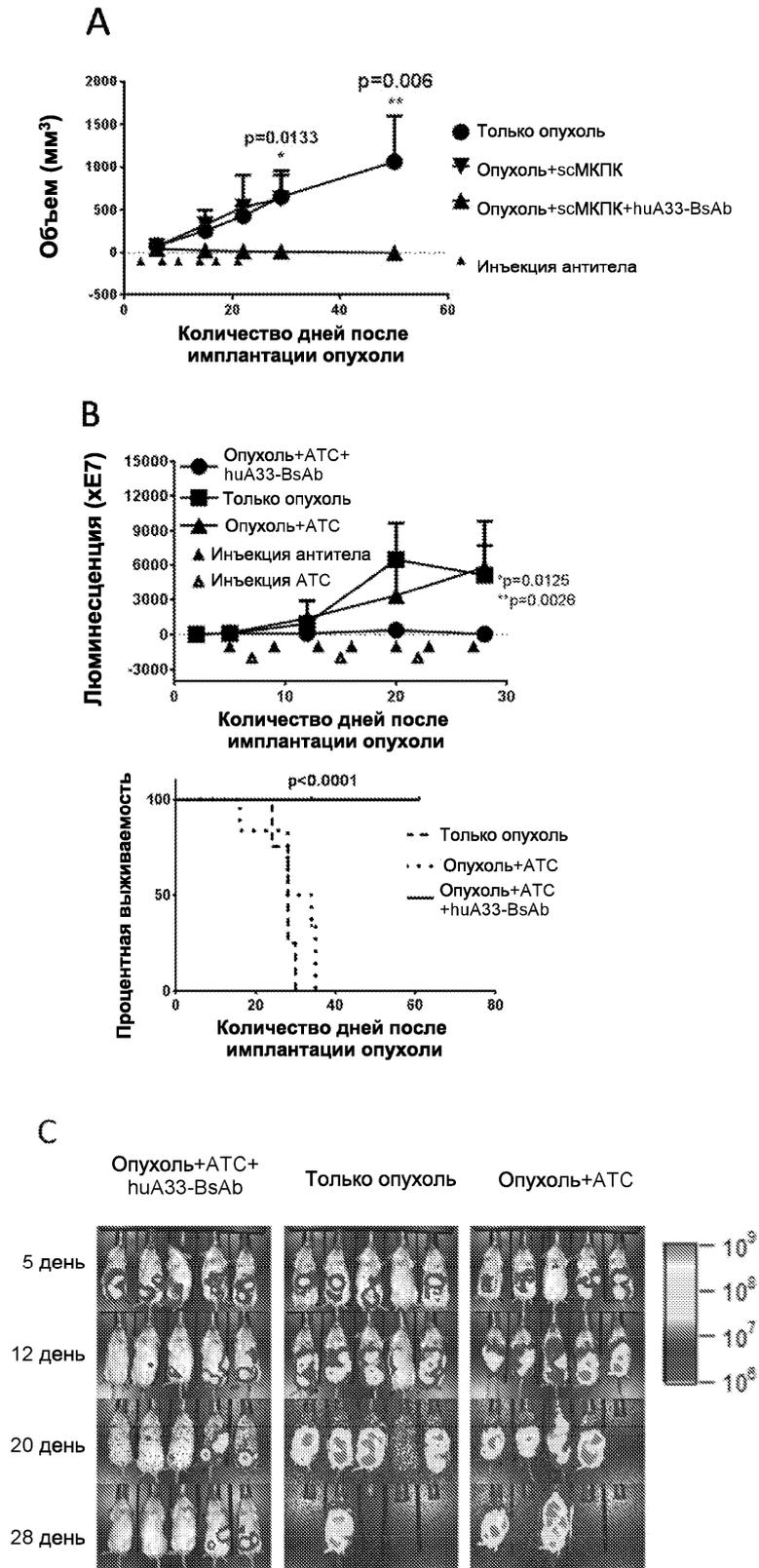
	K_D	Кратность различия по отнош. к исходному антителу
A33 31	3.87E-11	4.3
A33 32	5.64E-12	29.7
A33 48	3.29E-12	51.0
A33 49	2.20E-11	7.6
A33 53	1.75E-11	9.6
A33 56	2.43E-11	6.9
A33 57	1.56E-11	10.7
A33-BsAb	1.68E-10	1.0

Карта скоростей
ассоциации/диссоциации

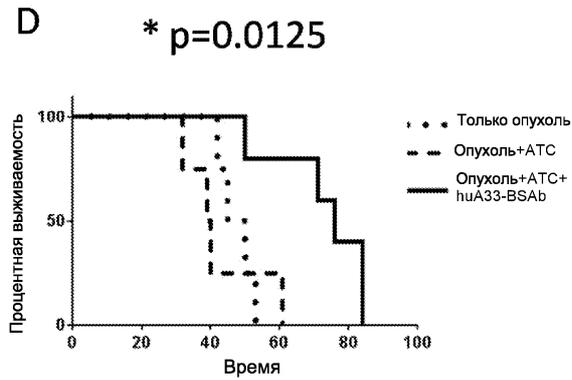
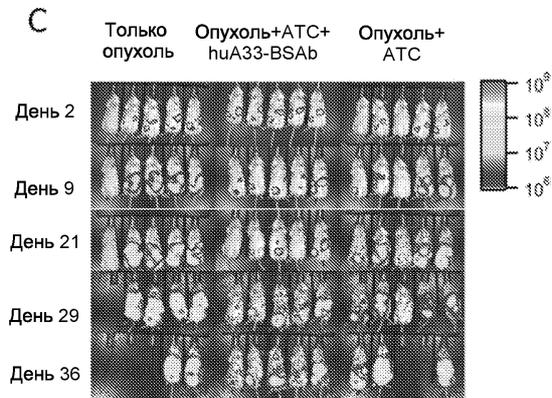
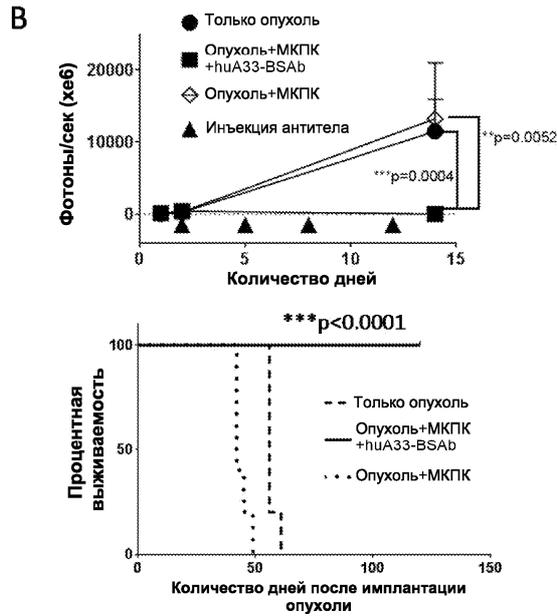
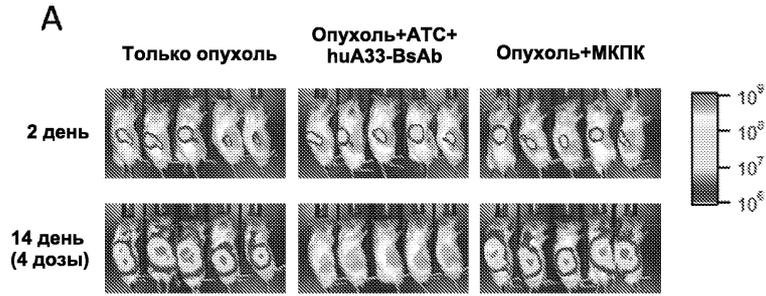
C



Фиг. 5

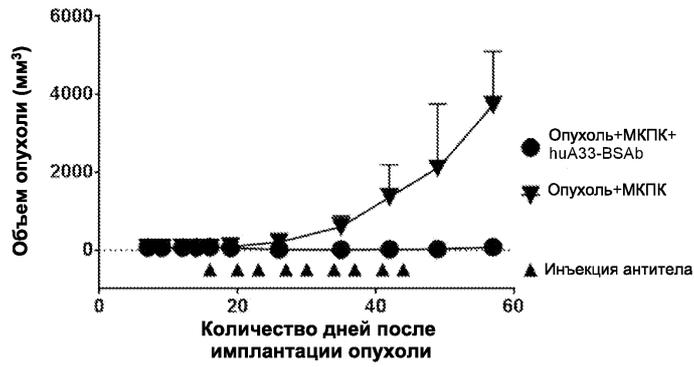


Фиг. 6

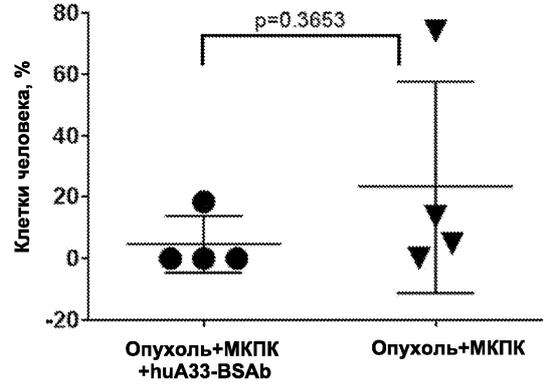


Фиг. 7

A

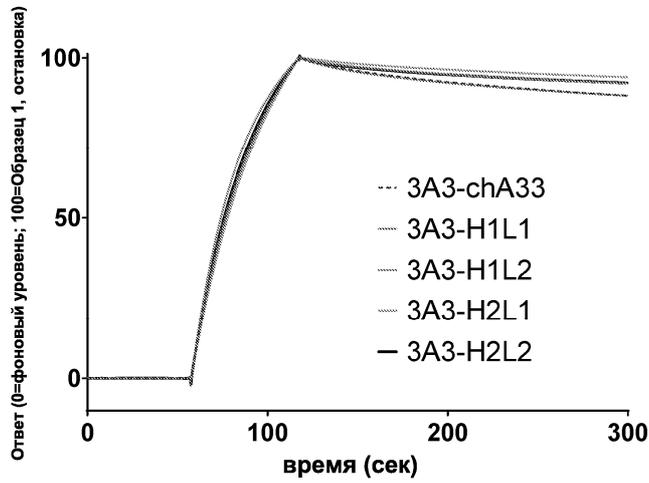


B



Фиг. 8

Поверхностный плазмонный резонанс, ППР

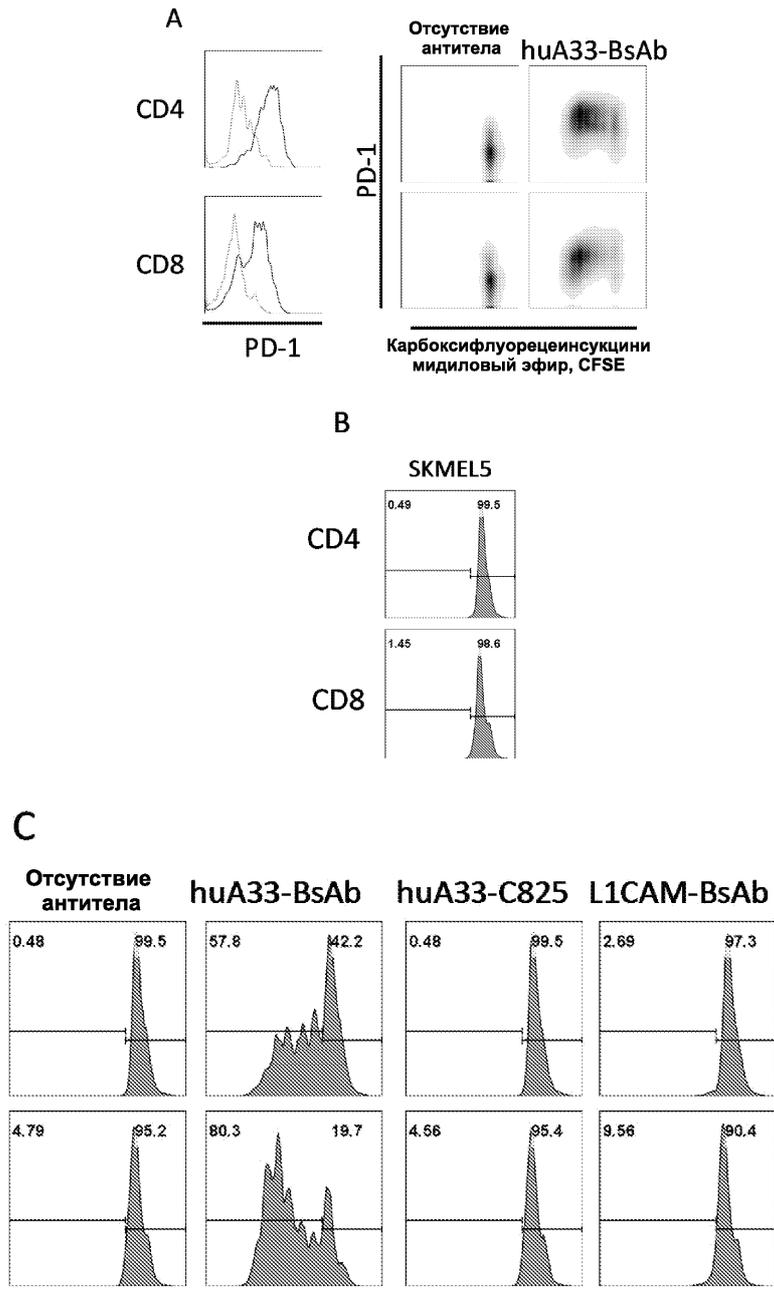


Фиг. 9

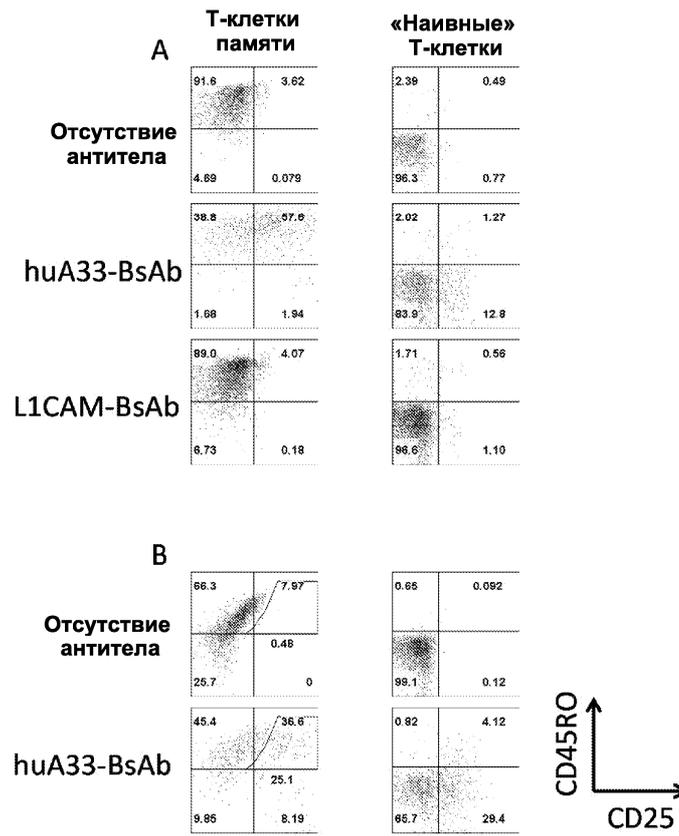
Метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией, FASC

Типы опухолей	Клеточные линии	Сред. интенс. флуоресценции, MFI
СА-рак молочной железы	HTB-26	11
Колоректальный рак	Colo205	3900
Колоректальный рак	SW1222	1513
Колоректальный рак	LS174T	4776
Саркома Юинга	SK-E-LP	6
Саркома Юинга	TC-32	6
Саркома Юинга	SKEAW	7
Саркома Юинга	SK-E-RT	8
Саркома Юинга	A4573	8
Саркома Юинга	SK-ES-1	9
Рак желудка	NCI-N87	7
Рак желудка	SNU16	303
Лимфома	NALM6 LUC_GFP	5
Меланома	CRL-1424 G-361	13
Меланома	M14 LUC_GFP C11	6
Меланома	SKMEL5	9
Мезотелиома	OCM1 LUC	14
Мезотелиома	CRL-5915 NCI-H2052	7
Нейробластома	IMR32 LUC	4
Нейробластома	NGP	5
Нейробластома	LS	5
Нейробластома	NMB7	6
Нейробластома	BE(2)S	6
Нейробластома	66N	6
Нейробластома	BE(2)M17	6
Нейробластома	SKNSH	7
Нейробластома	SKNHM	7
Нейробластома	BE(2)N	7
Нейробластома	SKNAB	7
Нейробластома	NB5	7
Нейробластома	BE(2)C	9
Нейробластома	6S	9
Нейробластома	SKNAS	10
Нейробластома	SKNDZ	10
Нейробластома	SKNJB	10
Нейробластома	SKNZB	10
Нейробластома	SKNJC2	11
Нейробластома	SH-EP1	12
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-2882 NCI-H3255	6
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-5810 NCI-H522	6
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-5800 NCI-H23	8
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-5875 NCI-H1563	9
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-2868 HCC827	14
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-5914 NCI-H2030	15
Немелкоклеточный рак легкого	CRL-5807 NCI-H358	18
Остеосаркома	U2OS LUC_GFP	7
Остеосаркома	SAOS2 LUC_GFP	8
Остеосаркома	HOS LUC_GFP	8
Остеосаркома	143B LUC_GFP	9
Остеосаркома	CRL-1427 LUC_GFP	13
СА-рак яичников	SKOV3 LUC	12
Рак поджелудочной железы	CRL-1918 CFPAC-1	6
Рак поджелудочной железы	CRL-1997 HPAF-II	6
Рак поджелудочной железы	CRL-1469 Panc1	7
Рак поджелудочной железы	CRL-2547 Panc 10.05	7
Рак поджелудочной железы	CRL-2172 SW 1990	7
Рак поджелудочной железы	HTB-80 Capan-2	10
Рак предстательной железы	LNCaP	7
Рак предстательной железы	DU145	23
Мелкоклеточный рак легкого	HTB-180 NCI-H345	7
Мелкоклеточный рак легкого	NCI-N417	9

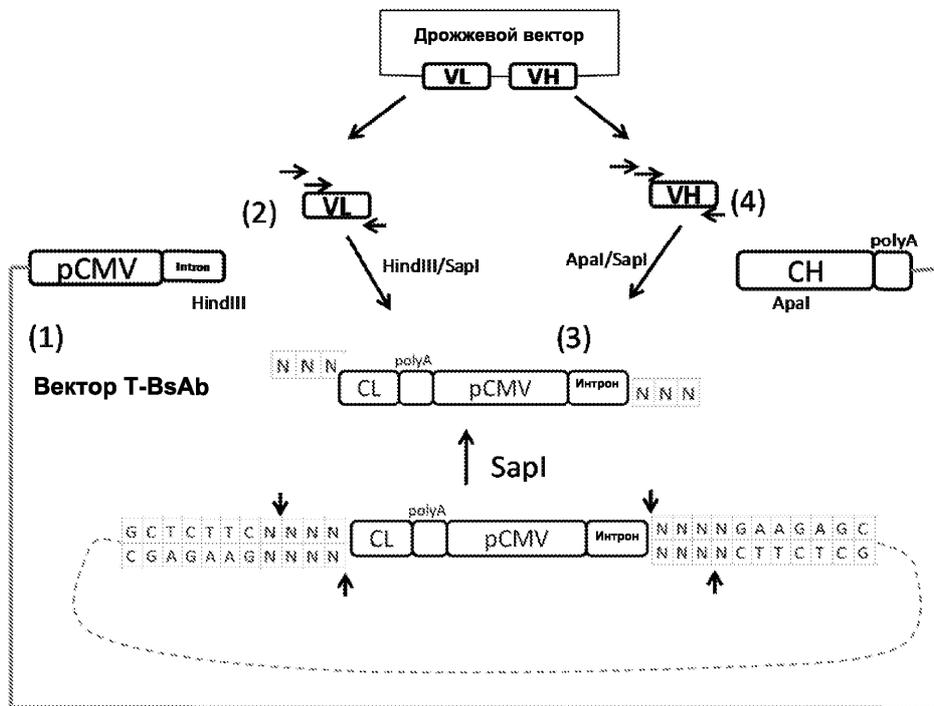
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

mA33-VH

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASG**FAFSTYDMS**WVRQTPEKRLEWVAT**ISS**
GGSYTYLDSVKGRRFTISRDSARNTLYLQMSLRSEDALYYCAP**TTVVPFAY**
 WQQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 1)

IGHV3-21*01-IGHJ4*01 (максимально гомологичная человек. последовательность)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISS
 SSSYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWQQGTL
 VTVSS (SEQ ID NO: 2)

mA33-VL

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC**KASONVRTVVA**WYQKPGQSPKTLIY**LAS**
NRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCL**QHWSYPLT**FGSGTKLE
 VKR (SEQ ID NO: 3)

IGKV1-17*02-IGKJ2*01 (максимально гомологичная человек. последовательность)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQKPGKAPKRLIYAASSL
 QSGVPSRFSGSG..SGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYPYTFGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 4)

Фиг. 14

huA33-H1 (3A3-H1)(SEQ ID NO: 5)

EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG**FAFSTYDMS**WVRQAPKRELEWVAT**ISSGGGSY**
TYLDSVKGRRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAP**TTVVPFAY**WQQGTLVTV
 SS

huA33-H2 (3A3-H2) (SEQ ID NO: 6)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG**FAFSTYDMS**WVRQAPGKRELEWVAT**ISSGGGSY**
TYLDSVKGRRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAP**TTVVPFAY**WQQGTLVTV
 SS

Фиг. 15

huA33-H1 (3A3-H1)(SEQ ID NO: 7)

GAAGTGAAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTCGTGAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTC
 CGCCTCTGGCTTCGCCTTCTCCACCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCCCTGAGAAGCGGCTGG
 AATGGGTGGCCACAATCTCCTCCGGCGGCTCCTACACCTACTACCTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCATCTCCCGGACTCCGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACC
 GCCCTGTACTATTGTGCTCCACACCCTGGTGCCTTTCGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGTGACC
 GTGTCCTCT

huA33-H2 (3A3-H2) (SEQ ID NO: 8)

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTCGTGAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTC
 CGCCTCTGGCTTCGCCTTCTCCACCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGAGACTGG
 AATGGGTGGCCACAATCTCCTCCGGCGGCTCCTACACCTACTACCTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCATCTCCCGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACC
 GCCGTGTACTATTGTGCTCCACACCCTGGTGCCTTTCGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGTGACC
 GTGTCCTCT

Фиг. 16

huA33-L1 (3A3-L1)(SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSQSFMSTSVGDRVTITC**KASONVRTVVA**WYQKPGKSPKTLIY**LASNRHT**
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISNVQSEDFADYFCL**QHWSYPLT**FGSGTKLEIKR

huA33-L2 (3A3-L2) (SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSQSSLSTSVGDRVTITC**KASONVRTVVA**WYQKPGKSPKTLIY**LASNRHT**
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISNVQPEDFADYFCL**QHWSYPLT**FGSGTKLEIKR

Фиг. 17

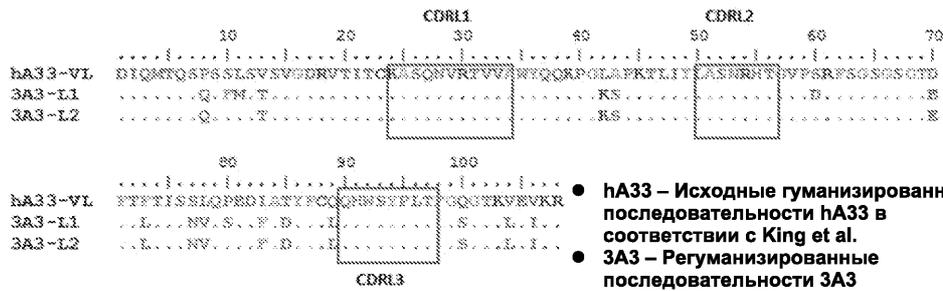
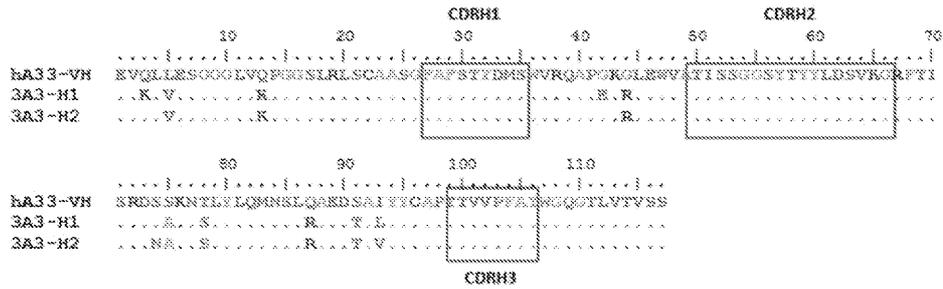
huA33-L1 (3A3-L1) (SEQ ID NO: 11)

GACATCCAGATGACCCAGTCCCAGTCCCTTCATGTCCACCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACA
 TGCAAGGCCTCCCAGAACGTGCGGACCGTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGTCCC
 CCAAGACCCTGATCTACCTGGCCTCCAACAGACACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCT
 GGCTCTGGCACCGAGTTACCCTGACCATCTCCAACGTGCAGTCCGAGGACTTCGCCGACTACTTC
 TGTCTGCAACACTGGTCTACCCCTGACCTTCGGCTCCGGCACCAAGCTGGAATCAAGAGA

huA33-L2 (3A3-L2) (SEQ ID NO: 12)

GACATCCAGATGACCCAGTCCCAGTCCCTGTCCACCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACA
 TGCAAGGCCTCCCAGAACGTGCGGACCGTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGTCCC
 CCAAGACCCTGATCTACCTGGCCTCCAACAGACACACCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTG
 GCTCTGGCACCGAGTTACCCTGACCATCTCCAACGTGCAGCCGAGGACTTCGCCGACTACTTCT
 GTCTGCAACACTGGTCTACCCCTGACCTTCGGCTCCGGCACCAAGCTGGAATCAAGAGA

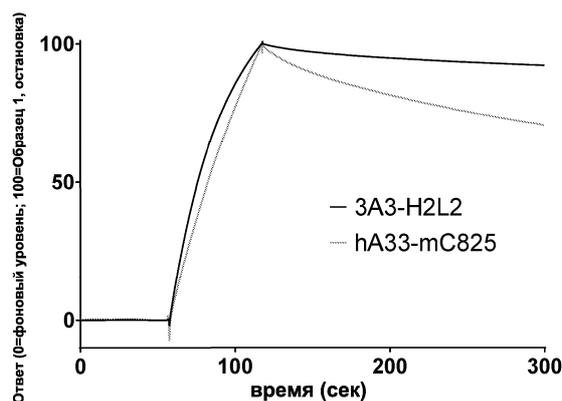
Фиг. 18



Фиг. 19

	k_a (1/М·сек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
3A3-chA33	2.03E+06	6.28E-04	3.10E-10
3A3-H1L1	1.71E+06	3.70E-04	2.17E-10
3A3-H1L2	2.64E+06	6.10E-04	2.32E-10
3A3-H2L1	1.48E+06	2.90E-04	1.96E-10
3A3-H2L2	2.15E+06	3.63E-04	1.69E-10

Фиг. 20



Фиг. 21

	k_a (1/М·сек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
huA33 (3A3-H2L2)	2.15E+06	3.63E-04	1.69E-10
hA33-mC825	1.85E+06	2.94E-03	1.59E-09

Фиг. 22

Антитело	Мишень	Код	H1	H2	L1	L2
huA33	A33	3A3	79.95737	83.24797	73.68187	77.13647

	VH	VL
hA33	83.07697	80.59097

Фиг. 23

chA33-IgG1**Легкая цепь** (SEQ ID NO: 13)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTVVAWYQQKPGQSPKTLIYLASNRHTGVP
 DRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCLQHWSYPLTFGSGTKLEVKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 14)

EVKLVESGGGLVKKPGGSLKLSAASGFAPSTYDMSWVRQTPEKRLWVATISSGGSYTTY
 LDSVKGRFTISRDSARNTLYLQMSSLRSEDALYYCAPTTVVPFAYWGQGLVTVSAASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Фиг. 24

Тяжелая цепь huA33-IgG1 (H2L2)**Аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 15)**

EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFAPSTYDMSWVRQAPGKRLIEWVATISGGGSYTYLDSVKGRFTISRDNKNSLYL
 QMNSLRAEDTAVYYCAPTTVVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPARIKETSISKAAGQPRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность кДНК: (SEQ ID NO: 16)

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTCGTGAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGTGCCGCCCTCTGGCT
 TCGCCTTCTCCACCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCCCTTGGCAAAGACTGGAAATGGGTGGCCACAATCTCTCTC
 CGGCGGCTCCTACACCTACTACTGGACTCTGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCCGGACAAACGCCAAGAACTCCCTGT
 ACCTGCAGATGAACACCTGCGGGCCGAGGACACCCTGTACTATTGTCTCCCAACCCCTGGTGCCTTCCGCTAT
 TGGGGACAGGGCACTCCGTGACCTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGCCCATCGGCTCTCCCTGGCACCCCTCTCCAA
 GAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGTACGGTGTCTGTGAA
 CTCAGGGCCCTGACCAGCGCGCTGCACACTTCCCGGCGCTCTACAGTCTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTG
 GTGACCGGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAGCAAGGTGG
 ACAAGAGAGTTCAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCTGACACTGAACTCTGGGGGACCT
 GTCAGTCTTCTCTCCCAAAACCAAGGACCCCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCCTGTGTGG
 ACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAC
 CGGGGAGGAGCACTACAACAGCACTACCTGTGTGTGCAAGCTCTCACCCTCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAA
 GGAGTCAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGCCCTCCAAGCCCATCGAAGAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAAGCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAAGTGGGAGGCAATGGGCAAGCCGGAAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCC
 CGTGTGGACTCCGACGCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCTGGGACAAAGCAAGGTGGCAAGCAAGGCAAGCTC
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACCGAGAAGGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGATAA

Фиг. 25

Легкая цепь huA33-IgG1 (H2L2)**Аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 17)**

DIQMTQSQSSLSTSVGDRVITTKASQNVRTVVAWYQKPKGKSPKTLIYLA5NRHTGVPSRF5G5SGTEFTLTISNVQ
 PEDFADYFCLQHW5YPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательность кДНК: (SEQ ID NO: 18)

GACATCCAGATGACCCAGTCCCACTCTCCCTGTCCACCTCCGTCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCCTC
 CCAGAACGTCCGGACCGTGTGGCCTGGTATACGCAAGAACTCGCAAAGTCCCAAGACCCCTGATCTACTCTGGCCT
 CCAACAGACACACCAGCGTGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGGTTACCCCTGACCATCTCCAAC
 CTGCAGCCCGAGGACTTCCCGACTACTTCTGTCTGCAACACTGGTCTTACCCCTGACCTTCCGGCTCCGGCAACAA
 GCTGGAAATCAAGAGAACCCTGGCGCCTCCCTCCGCTGTTCTATCTTCCACCTTCCGACGACAGCTGAAGTCCGGCA
 CCGCTTCTGTGTGTGTGCTGAAACAATCTTACCCTCCGGAGGCAAGGTGCAAGTGGAGGTGCAACGCCCTG
 CAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAAGGACTCCAAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCTCTACCCCTGAC
 CCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAAGCAAGGTGTACGCTGCAGAGTGAACCCACCAAGGCCCTGTCTAGCCCCCTG
 ACCAAGCTTTCAACCGGGGCGAGTGC

Фиг. 26

Тяжелая цепь huA33-BsAb (H2L2)**Аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 19)**

EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFAPSTYDMSWVRQAPGKRLIEWVATISGGGSYTYLDSVKGRFTISRDNKNSLYL
 QMNSLRAEDTAVYYCAPTTVVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
 LPARIKETSISKAAGQPRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность кДНК: (SEQ ID NO: 20)

GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTCGTGAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGTGCCGCCCTCTGGCT
 TCGCCTTCTCCACCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCCCTTGGCAAAGACTGGAAATGGGTGGCCACAATCTCTCTC
 CGGCGGCTCCTACACCTACTACTGGACTCTGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCCGGACAAACGCCAAGAACTCCCTGT
 ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCCTGTACTATTGTCTCCCAACCCCTGGTGCCTTCCGCTAT
 TGGGGACAGGGCACTCCGTGACCTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGCCCTCTGTGTTTCTCTGGCCCCCTCCAGCAA
 GTCCACCTCTGGTGGACAGCGCCCTGCGGCTGCCTGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCTGACCTGTCTCTGAAAC
 TCTGGCGCTCTGACCTCTGGCGTGCACACTTCCCTGCTGTCTGCTGCAAGTCTAGCGGCTGTACTCCCTGTCTCCGCTGT
 GACAGTGCCTTCCAGCTCTCTGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTGAACCAAGGCCCTCCAATACCAAGGTGGA
 AAGCGGGTGAACCCAAAGTCTGCGACAAAGACCCACCTGTCCCTTGTCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTT
 CCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGAACCCCGAAGTGACCTGCCTGTGTGGGA
 TGTGTCCACAGGAGCCCTGAAGTGAAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAATGGCAACGCCAAGACCAAGCCCT
 AGAGAGGAAACAATACGCTCCACCTACC5GTTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTCTGACCAAGACTGACCTGAAACGCAAA
 GAGTACAAGTCCGCGTGTCCAACAAGGCCCTGCTCCCGCCATCGAAGAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAAGCCCC
 GGGAAACCCAGGTGTACACACTGCCCTAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGTCTGCTGACCTGTCTCGTGA
 AAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCGTGGAAATGGGAGTCCAAGGCCAGCCCTGABAAACAACTACAAGACCAAGCCCTCT
 GTGCTGGACTCCGACGCTCATTCTCTGACAGCAAGCTGACCTGGACAAAGTCCCGGTGGCAAGCTGGCAAGCTGT
 TCTCTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACCCAGAAAGTCCCTGTCTCCTGACGCCCGGCAAA

Фиг. 27

Тяжелая цепь клона 32 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 25)

EVQLVESGGGLV~~PK~~PGGSLRLSCAASGFTFSTYDMSWVRQAPGKRLEWVATISSGGSYTY~~Y~~LD~~SV~~KGRFT
 ISRDNAKNSLYLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAPTTVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS~~SL~~GTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~WL~~NGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
 PSRDELTKN~~Q~~VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~~PP~~VLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQ~~Q~~GNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSL~~SL~~SPGK

Легкая цепь клона 32 huA33-BsAb (H2L2)-huOKT3scFv (SEQ ID NO: 26)

DIQMTQSQSSLS~~TS~~SVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKSPKTLIYLASN~~RHT~~GVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDFADYFCLQYWSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN~~NF~~YPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DS~~TYSL~~ST~~LTL~~SK~~ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVQ~~PG~~RSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLE
 WIGYINPSRGYTYN~~Q~~KFKDRFTISRDN~~SK~~NTAFLQMD~~SL~~RPEDTGVYFCARYYDDHYS~~LD~~YWGQGT~~PV~~
 TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV~~G~~DRVTITCSASSSVSYM
 N~~W~~YQQT~~PG~~KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTIS~~SL~~QPED~~I~~ATYYCQ~~Q~~WSSN~~P~~FTFGCGT
 KLQ~~ITR~~

Фиг. 31

Тяжелая цепь клона 48 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 27)

EVQLVESGGGLV~~PK~~PGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKRLEWVATISSGGSYTY~~Y~~LD~~SV~~KGRFTI
 SRDNAKNSLYLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAPTTVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS~~SL~~GTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~WL~~NGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
 PSRDELTKN~~Q~~VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~~PP~~VLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQ~~Q~~GNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSL~~SL~~SPGK

Легкая цепь клона 48 huA33-BsAb (H2L2)-huOKT3scFv (SEQ ID NO: 28)

DIQMTQSQSSLS~~TS~~SVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKSPKTLIYLA~~SD~~RHTGVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDFADYFCLQYWSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN~~NF~~YPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DS~~TYSL~~ST~~LTL~~SK~~ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVQ~~PG~~RSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLE
 WIGYINPSRGYTYN~~Q~~KFKDRFTISRDN~~SK~~NTAFLQMD~~SL~~RPEDTGVYFCARYYDDHYS~~LD~~YWGQGT~~PV~~
 TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV~~G~~DRVTITCSASSSVSYM
 N~~W~~YQQT~~PG~~KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTIS~~SL~~QPED~~I~~ATYYCQ~~Q~~WSSN~~P~~FTFGCGT
 KLQ~~ITR~~

Фиг. 32

Тяжелая цепь клона 49 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 29)

EVQLVESGGGLV~~PK~~PGGSLRLSCAASGFTFSTYDMSWVRQAPGKRLEWVATISSGGSYTY~~Y~~LD~~SV~~KGRFT
 ISRDNAKNSLYLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAPTTVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS~~SL~~GTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~WL~~NGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
 PSRDELTKN~~Q~~VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~~PP~~VLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQ~~Q~~GNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSL~~SL~~SPGK

Легкая цепь клона 49 huA33-BsAb (H2L2)-huOKT3scFv (SEQ ID NO: 30)

DIQMTQSQSSLS~~TS~~SVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKSPKTLIYLASN~~RHT~~GVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDFADYFCLQHW~~SY~~PLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN~~NF~~YPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DS~~TYSL~~ST~~LTL~~SK~~ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVQ~~PG~~RSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLE
 WIGYINPSRGYTYN~~Q~~KFKDRFTISRDN~~SK~~NTAFLQMD~~SL~~RPEDTGVYFCARYYDDHYS~~LD~~YWGQGT~~PV~~
 TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV~~G~~DRVTITCSASSSVSYM
 N~~W~~YQQT~~PG~~KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTIS~~SL~~QPED~~I~~ATYYCQ~~Q~~WSSN~~P~~FTFGCGT
 KLQ~~ITR~~

Фиг. 33

Тяжелая цепь клона 53 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 31)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTFS~~T~~YDM~~S~~WVRQAPGKRL~~E~~WVATISSGG~~S~~Y~~T~~Y~~L~~DSV~~K~~GRFT
 ISRDNAKNSLYLQ~~M~~NSLRAEDTAVYYCAPTTV~~V~~PFAYWGQGLVTVSSASTK~~G~~PSV~~F~~PLAPSSK~~S~~TSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVT~~S~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~V~~TVPSSSLGTQTYICNVN~~H~~KPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCP~~P~~CPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~T~~LMISRTPEVTCV~~V~~VDVSHEDPEVK~~F~~NWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~W~~LN~~G~~KEYKCAVSNKALPAPIEK~~T~~ISKAKGQPREPQVY~~T~~LP
 PSRDELTKNQVSLTCLV~~K~~GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~TPPVLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

Легкая цепь клона 53 huA33-BsAb (H2L2) - huOKT3scFv (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSQSSSLSTSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKSPKTLIYLASN~~R~~H~~T~~GVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDFADYFCLQYWSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTL~~S~~KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH~~V~~VRQAPGKCLE
 WIGYINPSRQYTYN~~N~~QKFKDRFTISRDN~~S~~KN~~T~~AFLQMD~~S~~LRPEDTGVYFCARYDDHYS~~L~~DYWGQGT
 PVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTTITCSASSSVSYM
 N~~W~~YQQTPGKAPKRWIYDTSK~~L~~ASGVPSRFSGSGSGTDY~~T~~FTISSLQPED~~I~~ATYYCQ~~W~~SSNPFTFGCGT
 KLQITR

Фиг. 34

Тяжелая цепь клона 56 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 33)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGF~~F~~STYDM~~S~~WVRQAPGKRL~~E~~WVATISSGG~~S~~Y~~T~~Y~~L~~DSV~~K~~GRFTI
 SRDNAKNSLYLQ~~M~~NSLRAEDTAVYYCAPTTV~~V~~PFAYRGGQGLVTVSSASTK~~G~~PSV~~F~~PLAPSSK~~S~~TSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVT~~S~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~V~~TVPSSSLGTQTYICNVN~~H~~KPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCP~~P~~CPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~T~~LMISRTPEVTCV~~V~~VDVSHEDPEVK~~F~~NWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~W~~LN~~G~~KEYKCAVSNKALPAPIEK~~T~~ISKAKGQPREPQVY~~T~~LP
 PSRDELTKNQVSLTCLV~~K~~GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~TPPVLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

Легкая цепь клона 56 huA33-BsAb (H2L2) - huOKT3scFv (SEQ ID NO: 34)

DIQMTQSQSSSLSTSVGDRVTITCKASQNVRTLVVAWYQQKPGKSPKTLIYLASN~~R~~H~~T~~GVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDFADYFCLQYWSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTL~~S~~KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH~~V~~VRQAPGKCLE
 WIGYINPSRQYTYN~~N~~QKFKDRFTISRDN~~S~~KN~~T~~AFLQMD~~S~~LRPEDTGVYFCARYDDHYS~~L~~DYWGQGT
 PVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTTITCSASSSVSYM
 N~~W~~YQQTPGKAPKRWIYDTSK~~L~~ASGVPSRFSGSGSGTDY~~T~~FTISSLQPED~~I~~ATYYCQ~~W~~SSNPFTFGCGT
 KLQITR

Фиг. 35

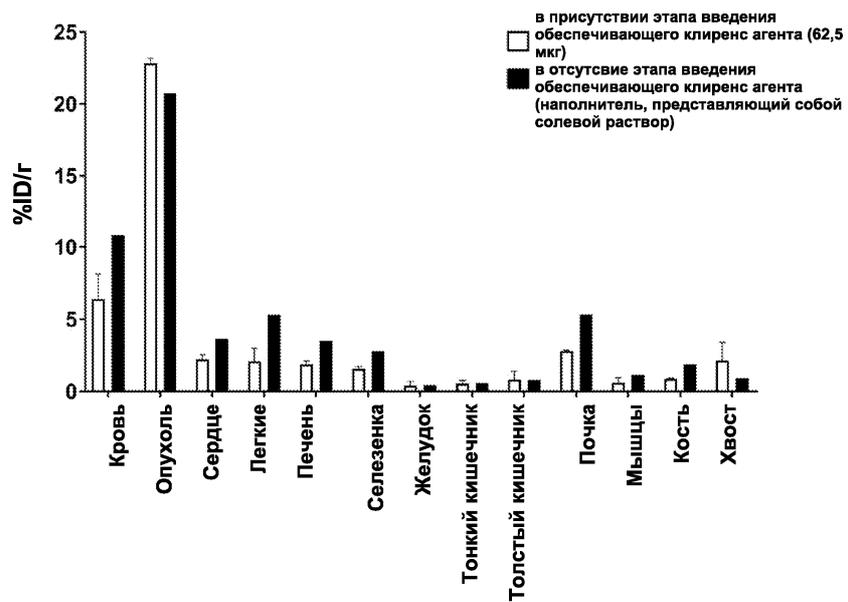
Тяжелая цепь клона 57 huA33-BsAb (H2L2) (SEQ ID NO: 35)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTFS~~T~~YDM~~S~~WVRQAPGKRL~~E~~WVATISSGG~~S~~Y~~T~~Y~~L~~DSV~~K~~GRFT
 ISRDNAKNSLYLQ~~M~~NSLRAEDTAVYYCAPTTV~~V~~PFAYWGQGLVTVSSASTK~~G~~PSV~~F~~PLAPSSK~~S~~TSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVT~~S~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~V~~TVPSSSLGTQTYICNVN~~H~~KPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCP~~P~~CPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~T~~LMISRTPEVTCV~~V~~VDVSHEDPEVK~~F~~NWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD~~W~~LN~~G~~KEYKCAVSNKALPAPIEK~~T~~ISKAKGQPREPQVY~~T~~LP
 PSRDELTKNQVSLTCLV~~K~~GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~TPPVLDSDG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

Легкая цепь клона 57 huA33-BsAb (H2L2) - huOKT3scFv (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSQSSSLSTSVGDSVTTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKSPKTLIYLASN~~R~~H~~T~~GVPSRFSGSGSGT
 EFTLTISNVQPEDVADYFCLQYWSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CLLNNFYPR
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~D~~STYLSSTLTL~~S~~KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 RGECTSGGGGSGGGGSGGGGSGVQVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH~~V~~VRQAPGKCL
 EWIGYINPSRQYTYN~~N~~QKFKDRFTISRDN~~S~~KN~~T~~AFLQMD~~S~~LRPEDTGVYFCARYDDHYS~~L~~DYWGQGT
 PVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD~~R~~VTTITCSASSSVSYM
 M~~N~~WYQQTPGKAPKRWIYDTSK~~L~~ASGVPSRFSGSGSGTDY~~T~~FTISSLQPED~~I~~ATYYCQ~~W~~SSNPFTFGCG
 TKLQITR

Фиг. 36



Фиг. 40

