



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003127387/13, 18.02.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2002

(30) Конвенционный приоритет:
19.02.2001 EP 01103955.9
05.04.2001 EP 01108291.4

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2005

(45) Опубликовано: 10.08.2009 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 98/052976 A, 26.11.1998. BECKER et al., "Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins", Proc. Natl.Acad. Sci.USA, 1996, Vol. 93, No.7, реферат. GILLIES et al., "Antibody-IL-12 Fusion proteins are effective in SCID mouse models of prostate and colon carcinoma metastasis", (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 19.09.2003

(86) Заявка РСТ:
EP 02/01690 (18.02.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 02/066514 (29.08.2002)

Адрес для переписки:
101000, Москва, М.Златоустинский пер., д.10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
И.А.Веселицкой, рег.№ 0011

(72) Автор(ы):

ГИЛЛИС Стивен (US),
КАРР Фрэнсис Дж. (GB),
ДЖОНС Тим (GB),
КАРТЕР Грэм (GB),
ХАМИЛЬТОН Анита (GB),
УИЛЛЬЯМС Стивен (GB),
ХАНЛОН Мэриан (GB),
УОТКИНС Джон (GB),
БЕЙКЕР Мэгтью (GB),
УЭЙ Джеффри (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(54) ИСКУССТВЕННЫЕ БЕЛКИ С ПОНИЖЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области иммунологии. Предложены варианты искусственного слитого белка, состоящего из антитела (или его фрагмента) и цитокина, слитых через линкерный пептид. Антитело или его фрагмент выбирают из антитела 225, 425, KS $1/4$, 14.18, анти-CD_x-антитела, где x имеет

целые значения 1-25. Каждый из вариантов слитого белка имеет пониженное количество Т-эпитопов, по крайней мере, в составляющей слитого белка, представленной антителом, и как следствие обладает пониженной иммуногенностью по сравнению с исходной молекулой. Идентификацию Т-лимфоцитарных эпитопов осуществляют путем

автоматизированного вычисления величин для связывающих центров молекул МНС класса II с последующим экспериментальным испытанием полученных вариантов белка на наличие пониженной иммуногенности. Автоматизированный способ вычисления Т-эпитопов основан на использовании функции Бема, модифицированной тем, что дополнительно учитывается вклад Ван-дер-ваальсового отталкивания и липофильного взаимодействия попарно между всеми липофильными атомами выбранных сегментов слитого белка и связывающей бороздки молекулы МНС II. Раскрыт также

способ конструирования белка на основе модифицированной функции Бема с последующим экспериментальным испытанием полученных вариантов на наличие пониженной иммуногенности, а также применение слитого белка для приготовления фармацевтической композиции для лечения опухоли. Использование изобретения позволяет получать слитые белки с пониженной иммуногенностью и, в основном, сохраняющие одинаковую биологическую активность по сравнению с родительской молекулой, что может найти применение в лечении опухолей. 3 н. и 1 з.п. ф-лы, 6 ил., 22 табл.

(56) (продолжение):

The Journal of immunology, 1998, 160, стр.6195-6203. BATOVA et al., "The ch14.18. - GM-CSF fusion protein is effective at mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity in vitro", Clin. Cancer. Res., 1999, 5 (12), реферат. WO 00/047228 A, 17.08.2000. RU 2128709 C1, 10.04.1999.

RU 2 3 6 3 7 0 7 C 2

RU 2 3 6 3 7 0 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C07K 16/30* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)*C12P 21/00* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003127387/13, 18.02.2002**(24) Effective date for property rights:
18.02.2002(30) Priority:
19.02.2001 EP 01103955.9
05.04.2001 EP 01108291.4(43) Application published: **27.03.2005**(45) Date of publication: **10.08.2009 Bull. 22**(85) Commencement of national phase: **19.09.2003**(86) PCT application:
EP 02/01690 (18.02.2002)(87) PCT publication:
WO 02/066514 (29.08.2002)Mail address:
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., d.10,
kv.15, "EVROMARKPAT", pat.pov.
I.A.Veselitskoj, reg.№ 0011

(72) Inventor(s):

GILLIS Stiven (US),
KARR Frehnsis Dzh. (GB),
DZhONS Tim (GB),
KARTER Grehm (GB),
KhAMIL'TON Anita (GB),
UILL'JaMS Stiven (GB),
KhANLON Mehrian (GB),
UOTKINS Dzhon (GB),
BEJKER Mehtt'ju (GB),
UEhJ Dzheffri (US)

(73) Proprietor(s):

MERK PATENT GMBKh (DE)**(54) ARTIFICIAL PROTEINS WITH LOWERED ADJUVANTICITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns immunology area. Versions of the artificial fused protein consisting of an antibody (or its fragment) and cytokine, fused through a link peptide are offered. The antibody or its fragment is chosen from an antibody 225, 425, KS 1/4, 14.18, anti-CD_x-antibody where x has the whole value 1-25. Each of versions of the fused protein has lowered quantity T-epitopes, at least, in the component of the fused protein presented by an antibody, and as consequence, possesses the lowered adjuvanticity, in comparison with an initial molecule. Identification of T-lymphocyte epitopes is performed by the automated calculation of sizes for the binding centres of class II MHC molecules with the subsequent experimental test of the obtained versions of protein for presence

of the lowered adjuvanticity. The automated way of T-epitopes calculation is based on use of the Bjom's function modified in such manner that contribution of Van-der-vaals repulsion and lipophilic interaction in pairs between all lipophilic atoms of the chosen segments of the fused protein and a binding groove of a MHC P molecule is taken into account. Also a way of protein construction on the basis of the modified function Bjom's function with the subsequent experimental test of the received versions for presence of the lowered adjuvanticity is revealed, and also application of the fused protein for preparation of a pharmaceutical composition for tumour treatment is in addition considered.

EFFECT: invention use allows obtaining the fused proteins with the lowered adjuvanticity and, basically, keeping identical biological activity in comparison with a parent molecule; it can be used in treatment of tumours.

R U 2 3 6 3 7 0 7 C 2

R U 2 3 6 3 7 0 7 C 2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение касается модифицированных искусственных белков,
5 предпочтительно сшитых белков, обладающих пониженной иммуногенностью по сравнению с родительской неизменённой молекулой при применении *in vivo*.
Особенно, изобретение касается белков, которые обычно не являются сильно
10 иммуногенными как отдельный компонент, но усиливают иммуногенность при соединении с ветвью второго белка, образуя, как правило, искусственный сшитый белок. Изобретение имеет отношение, прежде всего, к модифицированным и, таким образом, новым сшитым белкам иммуноглобулина
15 (Ig), которые главным образом состоят из молекулы иммуноглобулина или её фрагмента, ковалентно сшитого через его С-конец с N-концом биологически активной неиммуноглобулиновой молекулы, предпочтительно полипептида,
20 белка или его биологически активного фрагмента. В отдельном варианте, изобретение касается сшитых белков, состоящих из части Fc антитела, которая

25

30

35

40

45

50

сшита, как уже упомянуто, с неиммунологической целевой молекулой, которая проявляет биологическую или фармакологическую эффективность.

Молекулы изобретения имеют аминокислотные последовательности, которые изменены в одном или более положениях аминокислотных остатков, но имеют в основном одинаковую биологическую активность по сравнению с неизменными молекулами. Изменения сделаны в областях молекул, которые идентифицированы как Т-лимфоцитарные эпитопы, которые вносят вклад в иммунную реакцию в живом организме. Таким образом, изобретение касается также нового способа получения указанных сшитых белков с помощью идентификации в пептиде указанных эпитопов, включающего вычисление автоматизированными способами величин Т-лимфоцитарных эпитопов для связывающих центров молекул МНС класса II.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терапевтические сшитые белки являются, как правило, искусственными молекулами, которые произведены, чтобы сочетать известные благоприятные свойства отдельных компонентов или создавать новые свойства. Например, сшитый белок может содержать иммуногенную ветвь, которая приводит к тому, что обычно неиммуногенный сшитый партнер становится иммуногенным. В других случаях, каждый из компонентов является иммуногенным, и сшитая молекула сохраняет это обычно нежелательное свойство. Наконец, возможно, что сшивая не- или малоиммуногенные компоненты, получаем иммуногенный продукт из-за образования связей, особенно в области соединения.

В этом контексте особенно интересны такие сшитые белки, как иммуноконъюгаты. Иммуноконъюгаты известны несколько лет, и многие из них проявили фармакологический эффект *in vitro* и *in vivo*. Иммуноконъюгаты - химерные молекулы, состоящие, как правило, из части, происходящей от иммуноглобулина или его фрагмента, и целевого полипептида или белка, который связан с молекулой иммуноглобулина. Первоначально были получены иммуноконъюгаты, состоящие из полного антитела и цитотоксического средства, подобного цитокину, который был присоединен своим N-концом к C-концу постоянного домена иммуноглобулина, или наоборот, C-концом к N-концу переменной области антитела (см., например, EP 0439 095, WO 92/08495, US 5,349,053, EP 0659 439, EP 0706 799). Эти химерные молекулы являются бифункциональными: они нацелены на специфический антиген, например, на

поверхность опухолевой клетки, посредством связывающих центров в пределах CDR переменного домена части антитела или его фрагмента, а также одновременно проявляют цитотоксический эффект цитокина, который соединен с иммуноглобулином, и таким образом могут, теоретически, атаковать только или преимущественно клетку-мишень. В этом контексте, были разработаны также три- и многофункциональные иммуноконъюгаты, включая конструкции, состоящие из фрагментов sFv-, Fab-, Fab' или F(ab')₂ различных антител, в которых в каждом случае выгодно использовалась функция нацеливания иммуноглобулиновой части.

Другое изменение иммуноглобулина - использование области Fc антител. Антитела содержат две функционально независимые части: переменный домен, известный как "Fab", "Fab", "F(ab')₂", зависящий от вида переработки антигенсвязывающей молекулы, и постоянный домен, известный как "Fc", который обеспечивает связь с эффекторными функциями, такими как комплемент или фагоцитарные клетки. Иммуноглобулиновая часть Fc имеет длинный период полужизни в плазме, тогда как фрагменты Fab являются короткоживущими (Caron, et al. *Nature* 337: 525-531 (1989)).

Терапевтические белковые продукты были созданы с использованием домена Fc, чтобы обеспечить более продолжительный период полужизни или чтобы ввести функции, такие как связывание рецептора Fc, связывание белка А, фиксация комплемента и плацентарный перенос, которые все сохраняются в белках Fc иммуноглобулинов. Например, область Fc антитела IgG1 была сшита с N-концом CD30-L, молекулы, которая связывает рецепторы CD30, вырабатываемые опухолевыми клетками болезни Ходжкина, клетками анапластической лимфомы, клетками Т-лимфоцитарного лейкоза и другими типами злокачественных клеток (US 5 480 981). IL-10, противовоспалительное средство и средство против отторжения, был сшит с мышинным Fcγ_{2a} для того, чтобы увеличить короткий циркуляционный период полужизни цитокина (Zheng et al, *The Journal of Immunology*, 154: 5590-5600 (1995)). Исследования также оценили использование рецептора фактора некроза опухолей, связанного с белком Fc человеческого иммуноглобулина IgG1, в лечении пациентов с септическим шоком (Fisher et al., *N. Engl. J. Med.*, 334: 1697-1702 (1996); Van Zee et al., *The Journal of Immunology*, 156: 2221-2230 (1996)). Fc также был сшит с рецептором CD4 для получения терапевтического белка для терапии СПИД (см.:

Caron et al., *Nature*, 337:525-531 (1989)). Главным образом Fc может быть сшит с целевым белком или пептидом через свой C-или N-конец, используя N-и C-конец белка, соответственно. Химера Fc с TNF и эритропоэтином (EPO) была описана в EP 0464 533 (Hoechst/ General Hospital), где N-конец Fc был соединен с C-концом белка (X-Fc). Идентичное соединение было выбрано для химер лептин-Fc, описанных в WO 97/00319 (SKB) и WO 97/24440 (Genentech). Есть много публикаций и патентных приложений, описывающих противоположное соединение химер Fc-белок (Fc-X), таких как Fc-(IL-2), Fc-EPO, Fc-PSMA, Fc-(IL-12), Fc-TNFa, Fc-(GM-CSF), Fc-TNFR, Fc-эндостатин, Fc-ангиостатин, Fc-gp120, Fc-лептин, Fc-IFNa, Fc-(G-CSF). Примеры - WO 96/08570, (Fuji / Merck KGaA), WO 98/28427 (Amgen), WO 99/02709 (Beth Israel Medical Care Center) и WO 99/58662 (Fuji / Merck KGaA). WO 00/24782 (Amgen) раскрывает огромное количество возможных соединений Fc-X, в которых связь между двумя партнерами может быть Fc-X или X-Fc. Обширные разработки молекул Fc-X были проведены Lexigen / Merck KgaA, как описано в US 5,541,087, WO 99/43713, WO 99/29732, WO 99/52562, WO 99/53958, WO 00/11033, WO 01/07081, PCT/EPOO/10843. Таким образом, молекулы X-Fc и Fc-X, которые "потеряли" свои антигенсвязывающие центры, так же как молекулы, в которых связывающие центры и, таким образом, их антиген-специфические функции нацеливания сохранены, представляют большой интерес как обещающие терапевтические белки, и существует дальнейшая потребность разрабатывать аналогичные композиции для различного клинического применения.

Искусственные терапевтические белки часто являются особенно иммуногенными. Например, Enbrel – сшитый белок, состоящий из внеклеточного домена рецептора фактора некроза опухолей (TNF-R), сшитого с областью Fc антитела. Сообщалось, что приблизительно 16 % пациентов, леченных Enbrel, вырабатывали антитела к этому сшитому белку (*Physician's Desk Reference* [2001] p. 3372). Точно так же было обнаружено, что сшитый белок, состоящий из эритропоэтина (EPO) и гранулоцит/макрофаг-колониестимулирующего фактора (GMCSF), высокоиммуногенен (Coscarella A, et al. [1998] *Cytokine* 10:964-9; Coscarella A, *Mol Biotechnol.* [1998] 10:115-22). Было обнаружено, что при инъекции приматам сшитые белки EPO-GMCSF вызывают сильный иммунный ответ к ветви EPO сшитого белка, приводя к анемии. Ceredase™ и Cerezyme™ - формы лизосомального фермента глюкоцереброзидазы, используемого в лечении

5 болезни Гоше; в результате генной инженерии глюкоцереброзидаза имеет
необычное гликозилирование с высоким содержанием маннозы. Пациентам с
болезнью Гоше недостаёт глюкоцереброзидазы в лизосомах, в результате чего
макрофаги пациентов склонны накапливать липиды и превращаться в пенные
10 клетки (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition [2001]
Scriver et al. eds. Chapter 146, "Gaucher Disease." p. 3635-3668). После введения
Ceredase™ или Cerezyme™ терапевтический белок связывается рецепторами
маннозы на макрофагах, эндоцитируется, и переносится через эндосомы к
15 лизосоме, в которой он в норме локализуется. Пациенты, леченные Ceredase,
часто вырабатывают антитела к глюкоцереброзидазе (Pastores G.M., et al., *Blood*
[1993] 82:408-16; *Physicians' Desk Reference* [2001] p. 1325-1326). Такие антитела
могут препятствовать лечению (Brady R.O., et al., *Pediatrics*. [1997] 100(6):E11).
20 В клинических испытаниях фазы 1 с использованием сшитого белка антитело-
цитокин несколько пациентов проявили иммунные ответы к терапевтическому
сшитому белку. В этом случае ветвь антитела была гуманизированной формой
антитела 14.18, а цитокин являлся интерлейкином 2 (IL-2). Сыворотки многих из
25 реактивных пациентов содержали значительные уровни анти-идиотипических
антител.

30 Терапевтическое использование множества пептидов, полипептидов и
белков ограничено из-за их иммуногенности для млекопитающих, особенно
людей. Например, когда мышинные антитела вводят неиммуносупрессированным
пациентам, большинство таких пациентов показывает иммунную реакцию на
35 введённый чужеродный материал, вырабатывая человеческие антимышинные
антитела (НАМА) (например, Schroff, R.W. et al. (1985) *Cancer Res.* 45: 879-885;
Shawler, D.L. et al (1985) *J. Immunol.* 135: 1530-1535). Это имеет два серьезных
последствия. Во-первых, антимышинные антитела пациента могут связать и
40 устранить терапевтическое антитело или иммуноконъюгат прежде, чем он
получит шанс связаться, например, с опухолью, и проявить свою
терапевтическую функцию. Во-вторых, пациент может выработать
45 аллергическую чувствительность к мышинному антителу и может возникнуть
риск анафилактического шока при любом будущем контакте с мышинным
иммуноглобулином.

50 Чтобы решить проблему НАМА и, таким образом, сделать возможным
использование у людей терапевтических моноклональных антител, были

использованы несколько способов, (см., например, WO89/09622, EP0239400, EP0438310, WO91/09967). Эти методы рекомбинантной ДНК существенно уменьшали генетическую информацию мыши в конечной конструкции антитела при увеличении человеческой генетической информации в конечной конструкции. Несмотря на это, результирующие "гуманизированные" антитела в нескольких случаях всё ещё вызывали иммунный ответ у больных (Issacs J.D. (1990) *Sem. Immunol.* 2: 449, 456; Rebello, P.R. et al. (1999) *Transplantation* 68: 1417-1420).

Общим аспектом этих способов было введение в терапевтическое антитело, обычно происходящее от грызуна, аминокислотных остатков, даже значительных участков последовательностей аминокислотных остатков, идентичных присутствующим в белках антител человека. Этот процесс возможен для антител благодаря относительно высокой степени структурного (и функционального) консерватизма между молекулами антител различных видов. Однако для потенциально терапевтических пептидов, полипептидов и белков, где не может существовать никакой структурной гомологии в пределах вида (например, человека) для терапевтического белка, такие методы не применимы. Кроме того, эти методы предполагают, что обычное введение человеческих последовательностей аминокислотных остатков будет придавать переделываемому антителу неиммуногенные свойства. Известно, однако, что некоторые короткие пептидные последовательности ("Т-лимфоцитарные эпитопы") могут быть высвобождены при распаде пептидов, полипептидов или белков внутри клеток и впоследствии могут быть представлены молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) для включения активации Т-лимфоцитов. Для пептидов, представленных молекулами МНС класса II, такая активация Т-лимфоцитов может тогда вызвать иммунный ответ прямым побуждением В-лимфоцитов к производству таких антител. В соответствии с этим, было бы желательно устранить потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы из пептида, полипептида или белка. Даже белки человеческого происхождения с теми же последовательностями аминокислот, которые встречаются у людей, могут всё ещё вызывать иммунный ответ у людей. Известные примеры включают терапевтическое использование макрофаг/гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Wadhwa, M. et al (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:

1353-1361) и альфа интерферона 2 (Russo, D. et al (1996) *Bri. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. et al. (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413).

5 В течение последних нескольких лет были опубликованы несколько методов, которые предлагают решения для того, чтобы придать не - или хотя бы малоиммуногенные свойства антителам и целевым белкам, имеющим различные биологические функции. Примеры: WO 92/10755, и WO 96/40792 (Novo Nordisk), 10 EP 0519 596 (Merck and Co.), EP 0699 755 (Centro de Immunologia Molecular), WO 98/52976, WO 98/59244, и WO 00/34317 (Biovation Ltd.).

15 Общие методы, раскрытые в предыдущей работе и касающиеся устранения Т-лимфоцитарных эпитопов из белков (например, WO 98/52976, WO 00/34317), включают следующие шаги:

(a) Определение аминокислотной последовательности полипептида или его части

20 (b) Идентификация одного или более потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов в аминокислотной последовательности белка любым методом, включая определение связывания пептидов с молекулами МНС с использованием методов *in vitro* или *in silico*, или биологических проб.

30 (c) Проектирование новых вариантов последовательности, в которых одна или более аминокислот в пределах идентифицированных потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов модифицированы таким образом, чтобы существенно уменьшить или устранить активность Т-лимфоцитарного эпитопа, которая определяется связыванием пептидов с молекулами МНС с использованием методов *in vitro* или *in silico*, или биологических проб. Такие варианты 35 последовательностей создаются таким образом, чтобы избежать образования новых потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов при изменении последовательности, если только эти новые потенциальные Т-лимфоцитарные 40 эпитопы не модифицируются, в свою очередь, таким образом, чтобы существенно уменьшить или устранить активность Т-лимфоцитарного эпитопа.

45 (d) Построение таких вариантов последовательности методами рекомбинантной ДНК и тестирование указанных вариантов для того, чтобы выявить один или более вариантов с желательными свойствами.

50 Другие методы, использующие растворимые комплексы рекомбинантных молекул МНС в сочетании с синтетическими пептидами, способные связываться с клонами Т-лимфоцитов из проб периферической крови человека или

подопытных животных, использовались в работе [Kern, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4:975-978; Kwok, W.W. et al. (2001) *TRENDS in Immunology* 22: 583-588] и могут также использоваться в стратегии идентификации эпитопов.

5 Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы обычно определяют как любые последовательности аминокислотных остатков, способные связываться с молекулами МНС класса II. Такие потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы 10 могут быть измерены, чтобы установить связывание МНС. В обычном понимании термин "Т-лимфоцитарный эпитоп" означает эпитоп, который, будучи связан с молекулами МНС, может распознаваться рецептором Т- 15 лимфоцита, и который может, хотя бы в принципе, вызывать активацию этих Т-лимфоцитов. Однако обычно понимают, что некоторые пептиды, которые, как обнаружено, связываются с молекулами МНС класса II, могут быть сохранены в 20 белковой последовательности, потому что к таким пептидам существует иммунологическая толерантность в пределах организма, в который вводится конечный белок.

Представляется, что изобретение преодолевает практический факт, что 25 растворимые белки, введенные в аутологичный организм с терапевтическим намерением, могут вызвать иммунный ответ, приводящий к образованию антител организма, которые связываются с растворимым белком. Один из 30 примеров - альфа интерферон 2, к которому часть пациентов-людей вырабатывает антитела несмотря на то, что этот белок продуцируется эндогенно [Russo, D. et al. (1996) *Brit. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. et al. (1988) *New Engl. J. Med.* 318; 1409-1413].

35 Молекулы МНС класса II - группа очень полиморфных белков, которые играют центральную роль в селекции и активации хелперных Т-лимфоцитов. Группа антигенов лейкоцитов человека DR (HLA-DR) - преобладающий изотип 40 этой группы белков и главный фокус данного изобретения. Однако изотипы HLA-DQ и HLA-DP выполняют сходные функции, следовательно, данное изобретение применимо и к ним. Молекулы МНС HLA-DR - гомодимеры, в 45 которых каждая «половина» - гетеродимер, состоящий из цепей α и β . Каждый гетеродимер обладает лиганд-связывающим доменом, который связывает пептиды, варьирующие между 9 и 20 аминокислотами в длину, хотя 50 связывающая бороздка может разместить максимум 9 - 11 аминокислот. Лиганд-связывающий домен состоит из аминокислот 1 - 85 α -цепи, и аминокислот 1 - 94

из β -цепи. Недавно было показано, что молекулы DQ имеют гомологичную структуру; также ожидается, что белки семейства DP будут очень похожи. У людей известны приблизительно 70 различных аллотипов изотипа DR, есть 30 различных аллотипов DQ, и для DP известны 47 различных аллотипов. Каждый индивидум носит две - четыре аллели DR, две аллели DQ и две DP. Структура ряда молекул DR установлена; эти структуры указывают на открытую пептид-связывающую бороздку с множеством гидрофобных карманов, которые захватывают гидрофобные остатки (карманные остатки) пептида [Brown et al. *Nature* (1993) 364: 33; Stern et al. (1994) *Nature* 368: 215]. Полиморфизм, образующий различные аллотипы молекул класса II, вносит вклад в широкое разнообразие различных связывающих поверхностей для пептидов внутри пептид-связывающей бороздки, а на уровне популяции обеспечивает максимальную гибкость относительно способности распознавать инородные белки и строить иммунный ответ к патогенным организмам.

Существует значительная степень полиморфизма в пределах лиганд-связывающего домена с выделяющимися "семействами" в пределах различных географических популяций и этнических групп. Этот полиморфизм воздействует на связующие свойства пептид-связывающего домена, таким образом различные "семейства" молекул DR будут иметь особенности для пептидов с различным характером последовательности, хотя может быть частичное перекрытие. Эта особенность определяет узнавание эпитопов Th-клеток (Т-лимфоцитарная реакция класса II), которые являются, в конечном счете, ответственными за ведение иммунного ответа к В-лимфоцитарным эпитопам, присутствующим на том же самом белке, из которого происходят эпитопы Th-клеток. Таким образом, на иммунный ответ к белку в индивидуме очень влияет распознавание Т-лимфоцитарного эпитопа, которое является функцией пептид-связывающей специфичности аллотипа HLA-DR этого индивида. Поэтому, чтобы идентифицировать Т-лимфоцитарные эпитопы в белке или пептиде в контексте общей популяции, желательно рассмотреть связывающие свойства настолько разнообразного набора аллотипов HLA-DR, насколько возможно, охватывая, таким образом, как можно больший процент мировой популяции.

Главный фактор в индукции иммунного ответа - наличие в пределах белка пептидов, которые могут стимулировать активность Т-лимфоцита через представление на молекулах МНС класса II. Чтобы устранить или уменьшить

иммуногенность, желательным образом, идентифицировать и удалить Т-лимфоцитарные эпитопы из белка.

5 Согласно вышеназванным методам и родственным процессам были получены несколько биологических молекул, в основном обычные целевые белки и антитела, которые обнаруживают пониженную иммуногенность и
аллергенность. Примеры: WO 99/55369 (8KB), WO 99/40198 и WO 96/21016
10 (Leuven Research & Development VZW), WO 00/08196 (Duke University), WO 96/21036 (Chiron Viragen), WO 97/31025 (Chiron Corp.), WO 98/30706 (Alliance Pharmaceutical Corp.).

15 Во всех этих вышеперечисленных приложениях были описаны отдельные белки или антитела, проявляющие низкий иммунный ответ; нет даже намёка, что сшитые белки, прежде всего сшитые белки иммуноглобулина, были полностью или частично де-иммунизированы, особенно через уменьшение количества
20 Т-лимфоцитарных эпитопов в последовательности указанных молекул посредством частично вычислительных методов. В WO 97/24137 (Tanpox Biosystems Inc) описывается химера IFN α -Fc, которая содержит неиммуногенную
25 молекулу линкера между N-концом части Fc и C-концом IFN α .

Поэтому, все еще есть потребность в получении биологических молекул, таких как иммуноконъюгаты, которые не- или малоиммуногенны. Прежде всего,
30 особенно интересно получить Fc-конъюгаты, предпочтительно химеры Fc-X, где X - избранный белок или полипептид, представляющий терапевтический интерес.

35 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение касается четырех общих аспектов:

- (a) новое применение деталей механизма иммунного ответа в ситуациях, вовлекающих сшитые белки и другие искусственные белки, чтобы помочь
40 определить, когда проектируемый или новый белок, вероятно, будет иммуногенным, и поэтому когда оправдано применение методов деиммунизации,
- (b) новые биологически активные искусственные белки для применения, особенно у людей, и в особенности для терапевтического использования,
45
- (c) метод разработки улучшенных, малоиммуногенных искусственных белков, которые обычно имеют высокую иммуногенность, метод, включающий
50 идентификацию одного или более потенциальных эпитопов Т-клеток в

искусственном белке и внесение мутации, которая удаляет один или более эпитопов Т-клеток, и

5 (d)удобный и эффективный вычислительный метод для идентификации и вычисления Т-лимфоцитарных эпитопов для глобально разнообразного множества молекул МНС класса II, для того, чтобы, основываясь на этом знании, разрабатывать и создавать новые варианты последовательностей биологических
10 молекул с улучшенными свойствами. Как только Т-лимфоцитарные эпитопы обнаруживаются в искусственном белке, они удаляются мутацией как описано в (с).

15 Искусственные белки, которые имеют компонент, способный связываться с поверхностным рецептором на клетке иммунной системы, являются, в общем, особенно иммуногенными. Искусственные белки, которые иммуногенны вследствие наличия ветви, которая связывается с поверхностным рецептором
20 иммунной клетки - особенно хорошие кандидаты на применение уменьшающих иммуногенность методов данного изобретения.

25 Вне связи с теорией, рисунки 1-6 представляют диаграммы искусственных белков, содержащих ветви, которые связываются с поверхностными рецепторами иммунной клетки, таких как рецептор Fc, рецептор цитокина или рецептор олигосахарида.

30 Один из методов изобретения состоит из шагов: идентификации искусственных белков, которые содержат ветви, которые связываются с поверхностными рецепторами иммунной клетки, что может быть сделано
35 осмотром последовательности; идентификации потенциальных эпитопов Т-лимфоцитов в искусственном белке; разработки мутантных производных искусственного белка, в которых уменьшено количество Т-лимфоцитарных эпитопов; получения одного или более мутантных производных; проверки
40 мутантных производных на активность и произвольно на другие желательные свойства и выбора мутантного производного, которое имеет оптимальный баланс уменьшенных Т-лимфоцитарных эпитопов, сохраненной активности, и
45 произвольно других сохраненных желательных свойств. Другие желательные свойства могут включать фармакокинетические свойства и характеристики экспрессии и сборки белка, но не ограничиваются ими.

50

Искусственные белки, которые имеют тенденцию формировать агрегаты - вторая категория белков, которые могут быть улучшены методами данного изобретения.

Один из классов искусственных белков, которые могут особенно быть улучшены в соответствии с изобретением - сшитые белки Ig, такие как сшитые белки, содержащие полное антитело, так же как сшитые белки Fc-X и X-Fc. В частности, сшитые белки иммуноглобулина, содержащие функциональный центр связывания рецептора Fc, могут быть особенно улучшены методами этого изобретения.

Изобретение предоставляет улучшенные формы таких сшитых белков антител, которые включают сшитые белки, содержащие переменные области, которые распознают опухолеспецифичные антигены, другие тканеспецифичные антигены, или другие специфичные для заболевания антигены. В одном из предпочтительных вариантов каждое из этих антител сшито с цитокином, таким как IL-2.

Например, изобретение предоставляет сшитые белки, содержащие направленные на опухоль антитело KS1/4 против EpCAM и антитело 14.18 против GD2, в которых переменные области антитела содержат мутации, которые удаляют T-лимфоцитарные эпитопы.

В отдельном варианте ветвь, которая сшита с ветвью антитела, видоизменена так, что T-лимфоцитарные эпитопы удалены. Например, изобретение описывает сшитый белок антитело-IL-2, в котором ветвь IL-2 была изменена, чтобы удалить T-лимфоцитарные эпитопы.

Второй общий класс белков Ig, которые могут быть значительно улучшены - сшитые белки Fc-X и X-Fc. Вне связи с теорией, полагают, что эти белки являются особенно иммуногенными, потому что открывается центр, связывающий рецептор Fc, который обычно несколько блокирован стерически легкой цепью интактного антитела. В любом случае, было эмпирически установлено, что сшитый белок Fc может быть более иммуногенным, чем его партнер сам по себе (WO 01/07081).

Другой класс иммуногенных сшитых белков - белки, которые соединены с цитокином. Вне связи с теорией, может быть, что эти белки являются особенно иммуногенными, потому что, когда сшитый белок-партнер связывается с иммунной клеткой, например, с клеткой, несущей антитело, которое распознает

сшитый белок-партнер, цитокин каким-то образом стимулирует клетку (см. фиг. 4).

5 Класс искусственных белков, которые являются особенно иммуногенными - нормальные белки, которые содержат несоответствующий олигосахарид. Например, белок, содержащий олигосахарид, который связывается
10 специфическим рецептором на иммунной клетке, часто оказывается иммуногенным. Например, белок, предпочтительно такой белок, как бета-глюкоцереброзидаза, которая может использоваться в лечении расстройств лизосомального хранения, содержит высокоманнозный олигосахарид. Такой
15 иммуногенный белок проявляет значительно уменьшенную иммуногенность, будучи модифицирован согласно изобретению.

Изобретение предоставляет менее иммуногенные формы следующих
20 белковых ветвей, которые встраиваются в обычно иммуногенные сшитые белки, такие как: эритропоэтин, лептин, фактор роста кератиноцитов, G-CSF, GM-CSF, антагонист IL-1R, sTNFR, ингибитор TNF, sTNFR-Fc (Enbrel®), BNTF, CNTF, члены семейства интерферона, hGH, β -глюкоцереброзидаза. Все эти
25 вышеупомянутые биологически активные белковые ветви происходят от известных немодифицированных (родительских) белковых ветвей согласно изобретению.

30 Модифицированные белки, согласно изобретению, могут быть получены методом, описанным в разделе "Детальное описание изобретения". Метод включает новый метод идентификации эпитопов Т-лимфоцитов вычислительным
35 способом. Этот методический приём предпочтителен согласно изобретению и описан более подробно в ПРИМЕРЕ 1.

Изобретение раскрывает и заявляет как предпочтительные варианты
40 изобретения измененные или модифицированные сшитые белки, производные от родительских сшитых белков, указанные родительские сшитые белки, главным образом состоящие из молекулы иммуноглобулина или её фрагмента и неиммуноглобулинового целевого полипептида (X), который связан
45 предпочтительно своим N-концом с C-концом молекулы иммуноглобулина или её фрагмента, где измененный сшитый белок имеет последовательность аминокислот, отличающуюся от последовательности указанного родительского
50 сшитого белка, и проявляет сниженную иммуногенность по сравнению с

родительским белком при контакте с иммунной системой данного вида, предпочтительно человека.

5 Стратегии, которые используются на практике согласно изобретению для уменьшения иммуногенности иммуногенного сшитого белка, подробно иллюстрированы для сшивки антитело-цитокин. Эти общие стратегии включают:

10 • Исследование последовательностей аминокислот в сшитом белке и расположение их по приоритетам относительно вероятной иммуногенности, основанное на ожидаемом наличии и распространенности последовательностей в течение отрицательной селекции Т-лимфоцитов в тимусе. Например, идентифицированы полностью чужеродные эпитопы; они имеют самый высокий приоритет для удаления Т-лимфоцитарных эпитопов мутацией. Самый низкий приоритет для удаления Т-лимфоцитарных эпитопов имеют последовательности, которые присутствуют в распространенных сывороточных белках, такие как постоянные участки антител или последовательности, которые найдены в неперегруппированных переменных областях антитела. Промежуточный приоритет для удаления Т-лимфоцитарных эпитопов мутацией имеют собственные последовательности, которые найдены в белках, таких как цитокины. Вне связи с теорией, ожидается, что малораспространенные белки могут не присутствовать в тимусе в достаточно высоких количествах, чтобы вызвать отрицательную селекцию Т-лимфоцитов, и могут таким образом распознаваться как чужеродные Т-лимфоцитарные эпитопы.

35 • Когда выбрана область для удаления Т-лимфоцитарных эпитопов мутацией, она сравнивается с встречающимися в природе человеческими последовательностями, найденными в распространенных белках. Вводятся мутации, делающие любые чужеродные последовательности более сходными с собственными. Например, чтобы уменьшить иммуногенность переменной области мыши, последовательность сравнивают с неперегруппированной переменной областью человека и находят наиболее близкородственную последовательность. Вносятся «венированные» (veneering) изменения, при которых некоторые аминокислоты мыши преобразовываются в человеческие. Это производит эффект преобразования некоторых чужеродных Т-лимфоцитарных эпитопов в собственные Т-лимфоцитарные эпитопы, метод уменьшения иммуногенности, раскрытый в US 5712120, а также производит эффект удаления некоторых В-лимфоцитарных эпитопов. Однако все еще

необходимо удалить Т-лимфоцитарные эпитопы, которые происходят от последовательностей гипервариабельного участка.

• Чтобы удалить большинство или все из оставшихся Т-лимфоцитарных эпитопов, вводятся мутации, которые, в соответствии с вышеопределенными, обчисленными компьютером, критериями, препятствуют связыванию в бороздки молекул МНС класса II. В случае переменных областей антитела, предпочтительно вводить мутации, которые лежат вне самих CDR, чтобы избежать препятствий связывания антигена.

• В случае сшитых белков любого типа, в общем случае бывает, что сшивающая связка содержит чужеродные Т-лимфоцитарные эпитопы. Эти Т-лимфоцитарные эпитопы могут быть также удалены мутацией.

Как особый вариант изобретение включает химерные иммуноглобулины или их фрагменты, в которых сниженная иммуногенность, сниженное количество Т-лимфоцитарных эпитопов или сниженное количество пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II, расположены в целевой полипептидной части X, так же как в части иммуноглобулина или его фрагмента в измененном сшитом белке.

Изобретение включает также химерные иммуноглобулины, как определено согласно изобретению, в которых молекула иммуноглобулина и неиммуноглобулиновый целевой полипептид (X) сшиты через молекулу линкера (L). Как особый вариант изобретения, эта молекула линкера сама по себе не- или малоиммуногенна. Таким образом, изобретение может включать иммуноконъюгаты, в которых де-иммунизирована только молекула линкера. Молекулы линкера, имеющие уменьшенную или нулевую иммуногенность, известны в технологии или могут быть получены известными методами или методом согласно изобретению. Изобретение также включает такие сшитые белки иммуноглобулина, в которых иммуноглобулиновая часть, так же как часть целевого белка (X) сшитой молекулы и выборочно молекула линкера и область соединения (см. ниже), иммуногенно изменены. В других случаях, только одна или больше, но не все, части молекулы модифицируются согласно изобретению.

Изобретение имеет отношение, кроме того, к вышеупомянутым иммуноконъюгатам, которые можно получить, в принципе, от всех классов иммуноглобулина; однако IgG предпочтителен. Цель изобретения - предоставить такие гибридные иммуноглобулины, которые происходят от IgG1, IgG2, IgG3 и

IgG4. Иммуноглобулины IgG1 и IgG2 предпочтительны; иммуноглобулины IgG2 наиболее предпочтительны.

5 Так как было показано, что даже рекомбинантные белки человеческого происхождения и гуманизированные антитела могут вызывать нежелательный
иммунный ответ у людей, целью этого изобретения является предоставление
сшитых белков, в которых иммуноглобулиновая часть, так же как и часть
10 целевого полипептида (X), могут быть отобраны как нечеловеческого, так и человеческого происхождения. Так как гуманизированные или происходящие от человека молекулы имеют, как правило, меньшее количество Т-лимфоцитарных
15 эпитопов, такие молекулы предпочтительны для де-иммунизации, потому что должно быть изменено меньшее количество аминокислотных остатков.

Иммуноконъюгаты (сшитые белки иммуноглобулинов (Ig)) согласно
20 изобретению включают также фрагменты антител типа sFv, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fc. Специфическая и предпочтительная цель изобретения - предоставление указанных выше - и ниже – определенных сшитых белков, в которых иммуноглобулиновая часть - домен Fc антитела, предпочтительно антитела IgG1
25 или IgG2. Молекулы Fc-X, согласно изобретению, которые имеют пониженное сродство к рецепторам Fc – предпочтительная цель изобретения. Молекулы Fc, имеющие пониженное сродство к рецепторам Fc, известны в технологии и могут
30 быть получены модификацией последовательности аминокислот домена Fc (например, WO 99/43713).

Более подробно, изобретение относится к:

35 • иммуногенно модифицированному сшитому белку, происходящему от родительского сшитого белка, главным образом состоящего из первого белка / полипептида и второго белка / полипептида, где первый белок - молекула иммуноглобулина или её фрагмент, а второй белок / полипептид -
40 неиммуноглобулиновый целевой полипептид (X), соединённых между собой непосредственно или посредством линкера; указанный модифицированный сшитый белок имеет последовательность аминокислот, отличную от
45 последовательности указанного родительского сшитого белка и проявляет сниженную иммуногенность из-за сниженного количества Т-лимфоцитарных эпитопов в его последовательности аминокислот по сравнению с родительским сшитым белком при контакте с иммунной системой данного вида;
50

• соответствующему сшитому белку, в котором указанные Т-лимфоцитарные эпитопы - пептидные последовательности, способные связываться со связывающими группами молекулы МСН класса II;

• соответствующему сшитому белку, в котором целевой полипептид (X) связан своим N-концом с C-концом иммуноглобулиновой ветви;

• соответствующему модифицированному сшитому белку, где данный вид - человек;

• соответствующему сшитому белку, в котором сшитые компоненты соединены через молекулу линкера L;

• модифицированному сшитому белку в соответствии с пунктом 4, в котором указанная молекула линкера L является неиммуногенной или менее иммуногенной;

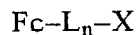
• соответствующему сшитому белку, в котором область соединения, представленная C-концевой областью иммуноглобулиновой части и N-концевой областью целевого неиммуноглобулинового полипептида (X) не имеет или имеет уменьшенное количество Т-лимфоцитарных эпитопов;

• соответствующему сшитому белку, в котором иммуноглобулиновая часть или её фрагмент, или часть целевого полипептида (X) являются менее иммуногенными;

• соответствующему сшитому белку, в котором указанная молекула иммуноглобулина или её фрагмент - IgG1 или IgG2;

• соответствующему сшитому белку, в котором указанный фрагмент иммуноглобулина - часть Fc, где, предпочтительно, указанная часть Fc имеет пониженное сродство к рецепторам Fc;

• иммуногенно модифицированному сшитому белку, соответствующему имеющему формулу



где

Fc - часть Fc молекулы иммуноглобулина (антитела),

X - целевой неиммуноглобулиновый полипептид,

L - линкерный пептид,

n = 0 или 1, и

где X и / или L содержат модифицированные аминокислотные остатки, которые вызывают пониженную иммуногенность по сравнению с родительской молекулой.

Предпочтительные варианты этих иммуногенно изменённых сшитых молекул Fc:

Fc - X^m, где изменен только X,

Fc - L^m - X^m, где изменены X и L для снижения иммуногенности,

Fc - X^m, где изменены X и область соединения между Fc и X,

Fc - L^m - X^m, где изменены X, L и области соединения между Fc, X и L;

- соответствующему сшитому белку Fc - (L) - X в котором, по крайней мере, X иммуногено модифицированный;

- иммуногенно модифицированному сшитому белку, имеющему формулу



где

A - целое антитело или его фрагменты sFv, Fab, Fab', F(ab')₂,

X - целевой неиммуноглобулиновый полипептид,

L - линкерный пептид,

n = 0 или 1, и

где A и / или X и / или L содержат остатки аминокислот, модификация которых вызывает понижение иммуногенности по сравнению с родительской молекулой;

Предпочтительные варианты этих иммуногенно модифицированных сшитых молекул:

A - X^m, где модифицирован только X, выборочно область соединения A-X,

A^m - X^m, где модифицированы A и X, выборочно область их соединения,

A - L^m - X^m, где модифицированы только X и L для снижения иммуногенности,

A^m - X, где только A имеет уменьшенную иммуногенность, выборочно области соединения A-X,

A^m - L^m - X^m, где иммуногенно модифицированы A, L и X, выборочно области соединения A-L-X;

- соответствующей сшитой молекуле A - (L) - X, где, по крайней мере, X или A иммуногенно модифицированы;

- соответствующему сшитому белку, где A выбран из группы:

антитела анти-EGF рецептора (HER1)

антитела анти-HER2

антитела анти-CD x , где x - целое число от 1 до 25

антитела рецептора анти-цитокина

антитела анти-17-1A,

антитела анти-KSA

антитела анти-GP IIb/IIIa

антитела анти-интегрин рецептора

антитела анти-VEGF рецептора;

• соответствующему сшитому белку, где антитело выбрано из группы:

моноклональное антитело 225 и производные,

моноклональное антитело 425 и производные

моноклональное антитело KS 1/4 и производные

моноклональное антитело 14.18 и производные

моноклональное антитело 4D5 / HER2 (Herceptin ®) и производные

моноклональное антитело 17-1A и производные

моноклональные антитела анти-CD3

моноклональное антитело 7E3 и производные

моноклональные антитела LM609, P1F6 и 14D9.F8 и производные

моноклональное антитело DC-101 и производные

моноклональное антитело анти-II-2R (Zenarax ®) и производные;

• соответствующему сшитому белку, где целевой полипептид X отобран из

группы, которая включает:

цитокины, ингибиторы интегрин, растворимые рецепторы цитокина, гликопротеины, гормоны, гликопротеиновые гормоны, лептин, гормоны роста, факторы роста, антигемофильные факторы, антигены, антагонисты рецептора цитокина;

• соответствующему сшитому белку, где целевой полипептид X отобран из группы, которая включает:

IL-2, G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, члены семейства интерферона, TNF α , растворимый рецептор TNF, IL-12, IL-8, фактор VIII, FGF, TGF, EGF, VEGF, PMSA, IGF, инсулин, RGD-пептиды, эндостатин, ангиостатин, BDNF, CNTF, белок C, фактор VIII и IX и их биологически активные фрагменты;

• более специфичному соответствующему сшитому белку, отобранному из группы:

МАб KS 1/4 - IL2, МАб 14.18 - IL2

МАб 425 - IL2, МАб c425 - IL2, МАб h425 - IL2, МАб 425 - TNFa

МАб 225 - IL2, МАб c225 - IL2

МАб 4D5 - IL2, МАб DC 101 - IL2, МАб LM609 - IL2,

Fc - IL2, Fc - TNFa, Fc - G-CSF, Fc - EPO, Fc - лептин, Fc - KGF,

Fc - BFNF, FC – β -Цереброзидаза, Fc - TPO, Fc - GM-CSF;

• иммуногенно модифицированному искусственному белку, отобранному из группы:

(i) Y - (L) - X, где Y – цитокин, а X, (L) - вышеозначенная молекула,

(ii) P - (L) - X, где P - белок с необычно гликозилированными ветвями, а X, (L) – вышеозначенная молекула,

(iii) A - (L) - X, где A, X (L) - вышеозначенная молекула,

происходящая от родительского искусственного белка, имеющая последовательность аминокислот, которая отличается от последовательности указанного родительского искусственного белка и проявляет пониженную иммуногенность, благодаря сниженному количеству Т-лимфоцитарных эпитопов по сравнению с родительским сшитым белком, при контакте с иммунной системой данного вида, где указанные Т-лимфоцитарные эпитопы – пептидные последовательности, способные связываться со связывающими группами молекул МСН класса II, доступная или полученная методом, определенным в этом изобретении;

• последовательности ДНК, кодирующие любой сшитый белок, как определено выше и ниже;

• последовательности ДНК, кодирующие соответствующий сшитый белок, содержащая

(i) сигнальную последовательность

(ii) все домены или домен Fc, sFV, Fab, Fab' или F(ab')₂ антитела IgG1, IgG2 или IgG3, и

(ii) последовательность ДНК, кодирующая полипептид (X), и, выборочно,

(iii) последовательность ДНК, кодирующая молекулу линкера;

• вектору экспрессии, содержащему соответствующую последовательность ДНК;

• фармацевтической композиции, содержащей сшитый белок, как определено выше и ниже,

выборочно, вместе с соответствующим носителем, наполнителем или разбавителем или другим терапевтически эффективным лекарственным средством, таким как химиотерапевтические или цитотоксические препараты;

• методу получения иммуногенно модифицированных сшитых белков, как определено, включающему шаги:

(i) определение последовательности аминокислот родительского сшитого белка или его части;

(ii) идентификацию одного или более потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов в пределах последовательности аминокислот сшитого белка любым методом, включая определение связывания пептидов с молекулами МНС с использованием методов *in vitro* или *in silico*, или биологического анализа,

(iii) разработку новых вариантов последовательности изменением, по крайней мере, одного аминокислотного остатка в пределах первоначально идентифицированных последовательностей Т-лимфоцитарных эпитопов, указанные варианты изменяют таким способом, чтобы значительно уменьшить или устранить активность или количество последовательностей Т-лимфоцитарных эпитопов и / или количество аллотипов МНС, способных связывать пептиды, производные от указанной биологической молекулы, что определяется связыванием пептидов с молекулами МНС с использованием методов *in vitro* или *in silico*, или биологическим анализом, или связыванием комплексов пептид-МНС с Т-лимфоцитами,

(iv) построение таких вариантов последовательностей методами рекомбинантной ДНК и испытание указанных вариантов для того, чтобы идентифицировать один или более вариантов с желательными свойствами,

и (v) выборочное повторение шагов (ii) - (iv), характеризующееся тем, что идентификация последовательностей Т-лимфоцитарных эпитопов согласно шагу (ii) достигается

(a) отбором области пептида, имеющего известную последовательность аминокислотных остатков;

(b) последовательным перебором перекрывающихся сегментов аминокислотных остатков predeterminedного однородного размера и состоящих, по крайней мере, из трёх аминокислотных остатков из выбранной

области; (с) вычислением степени связывания молекул МНС класса II для каждого из указанных выбранных сегментов, суммируя принятые значения для каждой боковой цепи гидрофобного аминокислотного остатка присутствующего в указанном перебираемом сегменте аминокислотных остатков; и (d) идентификации, по крайней мере, одного из указанных сегментов, пригодного для изменения, основанной на расчетной степени связывания молекул МНС класса II для этого сегмента, чтобы изменить прежде всего степень связывания молекул МНС класса II для пептида без существенного уменьшения терапевтической полезности пептида;

• соответствующему методу, в котором шаг (с) выполняется с использованием оценивающей функции Бёма, модифицированной таким образом, чтобы учесть вклад энергии 12-6 ван-дер-ваальсового отталкивания белок-лиганд и вклад конформационной энергии лиганда, посредством: (1) составления первой базы данных моделей молекул МНС класса II; (2) составления второй базы данных разрешенных пептидных скелетов для указанных молекул МНС класса II; (3) выбора модели из указанной первой базы данных; (4) выбора разрешенного пептидного скелета из указанной второй базы данных; (5) идентификации боковых цепей аминокислотных остатков, присутствующих в каждом перебираемом сегменте; (6) определения величины сродства для всех боковых цепей, присутствующих в каждом перебираемом сегменте; и, произвольно, (7) повторения шагов (1) - (5) для каждой указанной модели и каждого указанного скелета;

• соответствующему методу, в котором перебираемые сегменты аминокислотных остатков состоят из 13 аминокислотных остатков и / или последовательно перебираемые сегменты аминокислотных остатков перекрываются от одного до пяти аминокислотными остатками;

• соответствующему методу, в котором изменяются 1-9 аминокислотных остатков, предпочтительно один остаток аминокислоты, в любой из первоначально существующих последовательностей Т-лимфоцитарного эпитопа;

• соответствующему методу, в котором изменение аминокислотных остатков - замена, удаление или добавление первоначально существующего(их) остатка(ков) аминокислоты(т) на другой(ие) аминокислотный(ые) остаток(ки) в определённом(ых) положении(ях);

• соответствующему методу, в котором дополнительно производится дальнейшее изменение посредством замены, удаления или добавления для сохранения биологической активности указанной биологической молекулы.

Полипептиды, согласно изобретению, включают также антигены типа РМSА и других. Антигены, которые проявляют нежелательный и слишком сильный иммунный ответ, могут быть изменены согласно методам данного изобретения; в результате получаем антигены, которые имеют пониженную иммуногенность, которая является, однако, достаточно сильной, чтобы использовать антиген, например, в качестве вакцины.

Изобретение также включает варианты и другие модификации специфического полипептида, белка, сшитого белка, иммуноглобулина или иммуноконъюгата, которые имеют, в принципе, такую же биологическую активность и сходную (пониженную) иммуногенность. Все вышеупомянутые белки известны и описаны в литературе или уже имеются в продаже. Известно, что большинство из них имеет доказанную терапевтическую ценность. Лидерные или сигнальные последовательности и последовательности линкера могут быть произвольными.

Получение сшитого белка связыванием иммуноглобулинового компонента его С-концом или его фрагментом с N-концом неиммуноглобулинового целевого полипептида (X), возможно, через молекулу линкера согласно вышеописанному шагу (ii), ведётся посредством:

(i) Получения генной конструкции, содержащей последовательность ДНК, кодирующую полипептид X, последовательность ДНК, кодирующую молекулу иммуноглобулина или её фрагменты [sFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc], и, возможно, последовательность ДНК молекулы линкера, и

(ii) Экспрессии генной конструкции экспрессионной системой.

Иммуноконъюгаты, согласно данному изобретению, проявляют улучшенные свойства. Таким образом, могут быть измерены сниженный распад белка, увеличенная стабильность и увеличенный циркуляционный период полужизни в сыворотке, так же как отчетливо сниженная иммуногенность и/или аллергенность. Неожиданно, сниженная иммуногенность ведет во многих случаях к дальнейшему увеличению периода полужизни, особенно в случаях использования молекул Fc-X согласно изобретению. Пониженная иммуногенность делает сшитые белки, согласно изобретению, более

переносимыми для данного вида по сравнению с немодифицированными сшитыми белками, поэтому они могут в случае необходимости применяться в более высоких дозировках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фигура 1 поясняет один из механизмов, посредством которого сшитые белки демонстрируют повышенную иммуногенность. Фигура 1a показывает белок ("X"), сшитый с ветвью Fc, связывающийся с клеткой, несущей рецептор Fc. Фигура 1b показывает сшитый белок, перерабатываемый таким образом, что избирательно разлагается ветвь "X". Фигура 1c показывает пептидный остаток "X", предоставляемый Т-лимфоциту молекулой МНС.

Фигура 2 демонстрирует механизм повышенной иммуногенности для сшитого белка, содержащего ветвь Fc и вторую ветвь. Фигура 2a изображает связывание сшитого белка с В-лимфоцитом, который вырабатывает на своей поверхности антитело, специфичное к "X". Сшитый белок связывается как специфичным антителом, так и рецепторами Fc, которые еще не связаны антителом.

Фигура 3 объясняет второй механизм, посредством которого сшитые белки демонстрируют повышенную иммуногенность. Фигура 3a показывает белок ("X"), сшитый с ветвью цитокина, связывающийся с В-лимфоцитом, несущим на поверхности антитело. Фигура 3b показывает сшитый белок в процессе переработки. Фигура 3c изображает пептидный остаток "X", предоставляемый молекулой МНС Т-лимфоциту, в то же время дополнительный сшитый белок X-цитокин связывается с поверхностью В-лимфоцита.

Фигура 4 объясняет ещё один механизм, посредством которого проектируемый белок проявляет повышенную иммуногенность. В этом случае сшитый белок X-цитокин прямо активизирует В-лимфоцит. В-лимфоцит синтезирует специфичное антитело к X, которое увеличивает локальную концентрацию цитокина в окрестности В-лимфоцита.

Фигура 5 объясняет ещё один механизм, посредством которого проектируемый белок проявляет повышенную иммуногенность. Фигура 5a показывает связывание белка, несущего гликозилированную ветвь, со специфическим поверхностным клеточным рецептором для этой гликозилированной ветви на иммунной клетке. Фигура 5b изображает поглощение и разложение гликозилированного белка. Фигура 5c изображает

предоставление пептидного остатка гликозилированного белка Т-лимфоциту через молекулу МНС.

5 Фигура б демонстрирует механизм, посредством которого сшитый белок антитело-цитокин проявляет повышенную иммуногенность. Фигура ба
показывает связывание сшитого белка антитело-цитокин с В-лимфоцитом, который вырабатывает антитело, специфичное к CDR сшитого белка антитело-
10 цитокин. Сшитый белок связывается как специфичным антителом, так и рецепторами Fc, которые еще не связаны антителом. Фигура бв показывает перерабатываемый сшитый белок. Фигура бс показывает пептидный остаток CDR, предоставляемый молекулой МНС Т-лимфоциту, в то же время
15 дополнительный сшитый белок антитело-цитокин связывается с поверхностью В-лимфоцита.

20 ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин "Т-лимфоцитарный эпитоп" означает, в смысле данного изобретения, последовательность аминокислот, которая способна связывать с приемлемой эффективностью молекулы МНС класса II (или их эквивалент у
25 нечеловеческих видов), способна стимулировать Т-лимфоциты и/или также связывать (необязательно заметно активируя) Т-лимфоциты в комплекс с МНС класса II.

30 Термин "пептид", используемый здесь и в прилагаемых требованиях, является соединением, которое включает две или более аминокислоты. Аминокислоты соединены пептидной связью (определяемой здесь ниже). Существует 20 различных, встречающихся в природе аминокислот, вовлеченных
35 в биологический синтез пептидов, и любое их число можно связать в любом порядке с образованием пептидной цепи или кольца. Все встречающиеся в природе аминокислоты, участвующие в биологической продукции пептидов,
40 имеют L-конфигурацию. Синтетические пептиды можно получить посредством обычных синтетических методов, используя L-аминокислоты, D-аминокислоты или различные комбинации аминокислот двух разных конфигураций. Некоторые пептиды содержат всего несколько аминокислотных единиц. Короткие пептиды,
45 например, имеющие меньше чем десять аминокислотных остатков, иногда относят к "олигопептидам". Другие пептиды содержат большое количество аминокислотных остатков, например до 100 или больше, и относятся к
50 "полипептидам". В соответствии с соглашением, "полипептид" можно

рассматривать как любую пептидную цепь, содержащую три или более аминокислоты, тогда как "олигопептид" обычно рассматривают как особый тип "короткого" полипептида. Таким образом, как принято здесь, понятно, что любое отнесение к "полипептиду" также включает олигопептид. Далее, любое отнесение к "пептиду" включает полипептиды, олигопептиды и белки. Каждый отдельный порядок аминокислот формирует отдельные полипептиды или белки. Количество полипептидов, а, следовательно, количество различных белков, которые можно создать, практически не ограничено.

Термин "менее иммуногенный" или "пониженная иммуногенность", используемый прежде и после, - относительный термин и касается иммуногенности соответствующей первоначальной исходной молекулы при применении *in vivo* у того же вида по сравнению с молекулой, модифицированной согласно изобретению. Термин "модифицированный белок", используемый согласно этому изобретению, описывает белок, который имеет уменьшенное количество Т-лимфоцитарных эпитопов и проявляет поэтому пониженную иммуногенность относительно родительского белка при контакте с иммунной системой данного вида. Термин "немодифицированный белок", так же используемый согласно этому изобретению, описывает "родительский" белок, который по сравнению с "модифицированным белком" имеет большее количество эпитопов Т-клеток и, поэтому, увеличенную иммуногенность относительно модифицированного белка при контакте с иммунной системой данного вида.

Термин "биологически активный белок", используемый здесь и в требованиях, включает, согласно изобретению, полипептиды, белки, иммуноглобулины, такие как антитела, фрагменты антител, сшитые белки, ферменты, антигены и так далее, которые, если не определено другое, проявляют биологический и/или терапевтический эффект.

Термин "цитокин" используется здесь для описания белков, их аналогов и их фрагментов, которые продуцируются и выделяются клеткой и вызывают специфический отклик в клетке, которая имеет рецептор для этого цитокина. Предпочтительно, цитокины включают интерлейкины, такие как интерлейкин 2 (IL-2), гематопоэтические факторы, такие как гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухолей (TNS), такой как TNF α , и лимфокины, такие как лимфотоксин. Предпочтительно,

сшитый белок антитело-цитокин данного изобретения проявляет биологическую активность цитокина. В принципе, изобретение охватывает все цитокины, которые недавно классифицированы согласно коду их рецептора (Inglot, 1997, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 45: 353).

Фраза "одиночная цепь Fv" или "scFv" относится к антителу, в котором тяжелая и легкая цепи традиционно двуцепочного антитела были соединены с образованием одной цепи. Как правило, между двумя цепями вставляется пептид линкера, чтобы обеспечить правильную укладку и создание активного связывающего центра.

Термин "область Fc" или "домен Fc", подразумеваемый в данном изобретении, означает карбоксильную конечную часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, или её аналог или участок, способный к связыванию рецептора Fc. Как известно, каждая константная область тяжелой цепи иммуноглобулина включает четыре или пять доменов. Домены называются последовательно следующим образом: CH1-шарнир-CH2-CH3(-CH4). CH4 присутствует в IgM, который не имеет шарнирной области. Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина, полезная в практике изобретения, предпочтительно включает шарнирную область иммуноглобулина, и предпочтительно также включает домен CH3. Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина наиболее предпочтительно включает шарнирную область иммуноглобулина, домен CH2 и домен CH3. Предпочтительный домен Fc, согласно этому изобретению, состоит, таким образом, из домена шарнир-CH2-CH3. Используемый здесь термин "шарнирная область" иммуноглобулина понимается как шарнирная область целого иммуноглобулина или, по крайней мере, шарнирная область части иммуноглобулина, достаточная для образования одного или более дисульфидных мостиков со второй шарнирной областью иммуноглобулина. Используемый здесь термин "сигнальная последовательность" понимается как сегмент, который направляет секрецию сшитого белка и впоследствии расщепляется во время трансляции в клетке - хозяине. Сигнальная последовательность изобретения - полинуклеотид, который кодирует последовательность аминокислот, которая инициирует перенос белка сквозь мембрану эндоплазматической сети. Сигнальные последовательности, которые являются полезными в изобретении, включают сигнальные последовательности легкой цепи антитела, например, антитела 14.18 (Gillies и

др. (1989) *J. Immunol. Meth.* 125 : 191), и любые другие сигнальные последовательности, которые известны в литературе (см., например, Watson, 1984, *Nucleic Acid Research* 12:5145).

5 Термин "мутант или вариант", используемый относительно специфического белка, охватывает любую молекулу, такую как обрезанное или другое производное релевантного белка, которое сохраняет в основном такую же
10 активность у людей, как и релевантный белок. Такие другие производные могут быть получены посредством добавления, делеции, замещения или перестановки аминокислот или посредством их химической модификации.

15 Полагают, что соответствующие константные области тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть получены из антител, принадлежащих к каждому из классов иммуноглобулинов, отнесённых как IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, однако предпочтительны константные области тяжелой цепи иммуноглобулина из
20 класса IgG.

Кроме того, полагают, что константные области тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть получены из любого из подклассов антител IgG,
25 отнесённых в литературе как IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4. Домены константной области тяжелой цепи иммуноглобулина имеют перекрестную гомологию среди классов иммуноглобулинов. Например, домен CH2 IgG гомологичен домену CH2
30 IgA и IgD и домену CH3 IgM и IgE. Выбор подходящих константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина обсуждается подробно в US 5,541,087 и 5,726,044. Считается, что выбор конкретных последовательностей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из некоторых классов и подклассов
35 иммуноглобулинов для достижения конкретного результата находится в пределах уровня технологического мастерства. Может быть полезно, в некоторых обстоятельствах, модифицировать константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, например, мутацией, делецией или другими изменениями
40 посредством генной инженерии или других методов, так, чтобы некоторые функции, такие как реакция связывания комплемента или стимуляция антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), были
45 уменьшены или устранены.

Область Fc считается не- или слабо иммуногенной, если константная область тяжелой цепи иммуноглобулина не в состоянии вызвать поддающийся
50 обнаружению иммунный ответ.

Кроме того, полагают, что замена или делеция аминокислот в пределах константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть полезны в практике изобретения. Один из примеров может включать внесение

5 аминокислотных замен в верхней области СН₂ для создания варианта Fc со сниженным сродством к рецепторам Fc (Cole et al. (1997) *J. Immunol.* 159:3613). Сшитый белок на основе антитела с увеличенным циркуляционным периодом

10 полужизни *in vivo* может быть получен посредством создания сшитого белка, имеющего пониженное сродство к рецептору Fc, и ухода от использования последовательностей из изотипов антитела, которые связываются с рецепторами Fc (WO 99/43713). Например, известно, что из четырех известных изотипов IgG,

15 IgG1 (C_γ1) и IgG3 (C_γ3) связываются с FcR_γ1 с высоким сродством, тогда как IgG4 имеет 10-кратно сниженное сродство, а IgG2 (C_γ2) не связывается с FcR_γ1. Таким образом, сшитый белок на основе антитела со сниженным сродством к

20 рецептору Fc мог бы быть получен посредством создания сшитого белка с константной областью C_γ2 (область Fc) или областью C_γ4 Fc, избегая конструкций с областью C_γ1 Fc или C_γ3 Fc. Сшитый белок на основе антитела с

25 увеличенным циркуляционным периодом полужизни *in vivo* может быть получен посредством модификации последовательностей, необходимых для того, чтобы связываться с рецепторами Fc, в изотипах, которые имеют сродство к рецептору Fc, для того чтобы уменьшить или устранить связывание.

Важные последовательности для закрепления Fc_γR - Leu-Leu-Gly-Gly (остатки 234 - 237 в C_γ1), локализованные в домене СН₂, примыкающем к шарниру (Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491 (1991)). Другой

35 важный структурный компонент, необходимый для эффективного связывания FcR - наличие N-связанной углеводной цепи, ковалентно соединённой с Asn₂₉₇. Ферментативное удаление этой структуры или мутация остатка Asn эффективно

40 устраняет, или, по крайней мере, резко подавляет связывание со всеми классами Fc_γR.

Получающийся сшитые белки на основе антител имеют более

45 продолжительный циркуляционный период полужизни *in vivo*, чем несвязанный второй неиммуноглобулиновый белок. Димеризация лиганда может увеличить кажущееся сродство между лигандом и его рецептором. Например, если одна

50 ветвь X сшитого белка Fc-X может связываться с рецептором на клетке с некоторым сродством, вторая ветвь X того же сшитого белка Fc-альфа-

интерферон может связываться со вторым рецептором на той же клетке с
намного более высокой avidностью (кажущимся сродством). Это может
происходить из-за физической близости второй ветви X к рецептору после того,
5 как первая ветвь X уже связана. В случае антитела, связывающегося с
антигеном, кажущееся сродство может увеличиться по крайней мере в десять
тысяч раз. Каждая белковая субъединица, то есть, "X", имеет свою собственную
10 независимую функцию, так что в поливалентной молекуле функции белковых
подгрупп могут быть аддитивны или синергичны. Таким образом, слияние
обычно димерной Fc молекулы или другого фрагмента антитела с полипептидом
15 X может увеличить активность X.

Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот, и аминокислотные
последовательности, определяющие область Fc человеческого иммуноглобулина,
особенно Fc γ 1, Fc γ 2 и Fc γ 3, полезные в практике изобретения, сформулированы
20 ранее, как раскрыто в (WO 00/40615, WO 00/69913, WO 00/24782) или в базах
данных Genbank и/или EMBL, например, AF045536.1 (*Macaca fuscicularis*),
AF045537.1 (*Macaca mulatta*), AB016710 (*Felix catus*), K00752 (*Oryctolagus*
25 *cuniculus*), U03780 (*Sus scrofa*), 248947 (*Camelus dromedarius*), X62916 (*Bos*
taurus), L07789 (*Mustela vison*), X69797 (*Ovis aries*), U17 166 (*Cricetulus*
migratorius), X071S9 (*Rattus rattus*), AF57619.1 (*Trichosurus vulpecula*), или
30 AF035795 (*Monodelphis domestica*).

Таким образом, ранее известные векторы (Lo et al. (1998) *Protein*
Engeneering 11:495-500) были изменены замещением последовательности Fc
человеческого IgG1 последовательностями из кДНК, кодирующей Fc IgG2a
35 мыши (US 5 726 044).

Изобретение охватывает мутации в иммуноглобулиновом компоненте,
которые устраняют нежелательные свойства нативного иммуноглобулина, такие
40 как связывание рецептора Fc и/или вводят желательные свойства, такие как
стабильность. Например, Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson
A.D.G., Roberts G., Pedley B. и Adair R., *Molecular Immunology*, 130, pp105-108,
45 1993, описывают молекулу IgG4, где остаток 241 (нумерация Kabat) изменен с
серина на пролин. Эта замена увеличивает серологический период полужизни
молекулы IgG4. Canfield S.M. и Morrison S.L., *Journal of Experimental Medicine*
vol. 173 pp 1483-1491, описывают изменение остатка 248 (нумерация Kabat) с
50 лейцина на глутамат в IgG3 и с глутамата на лейцин в IgG2b мыши. Замена

лейцина на глутамат в первом случае уменьшает сродство молекулы иммуноглобулина касательно рецептора FcγR1, а замена глутамата на лейцин во втором случае увеличивает сродство. EP 0307 434 описывает различные мутации, включая изменение L на E в остатке 248 (нумерация Kabat) в IgG. Постоянный домен(ы) или их фрагмент(ы) - предпочтительно целая или значительная часть константной области тяжелой цепи человеческого IgG. Компонент IgG соответственно включает домены CH2 и CH3 и шарнирную область, включающую остатки цистеина, способствующие дисульфидному связыванию между тяжелыми цепями. Например, когда компонент IgG получен из IgG4, он включает остатки цистеина 8 и 11 из шарнирной области IgG4 (Pinck J.R. and Milstein C, *Nature*, 121, 6 pp 941-942, 1967).

Продвижение изобретения может быть выполнено обычными рекомбинантными методами, такими как описаны в Maniatis et. al. (*Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982) или *DNA Cloning Vols I, II and III* (D.M. Glover ed., IRL Press Ltd) или Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA).

В частности процесс может включать шаги:

- (i) получение реплицирующегося вектора экспрессии, способного в клетке – хозяине экспрессировать полимер ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую указанное соединение;
- (ii) трансформирование клетки - хозяина указанным вектором;
- (iii) культивирование указанных трансформированных клеток - хозяев в условиях, разрешающих экспрессию указанного полимера ДНК для продукции указанного соединения; и
- (iv) выделение указанного соединения.

Изобретение также предусматривает процесс получения полимера ДНК конденсацией соответствующих моно-, ди- или олигомерных нуклеотидных единиц. Процесс может быть проведен химически, ферментативно или комбинацией этих двух методов, *in vitro* или *in vivo*, как удобнее. Таким образом, полимер ДНК может быть получен ферментативным сшиванием соответствующих фрагментов ДНК обычными методами, такими как описанные D. M. Roberts et al в *Biochemistry* 1985, 24, 5090-5098. Фрагменты ДНК могут быть получены расщеплением ДНК, содержащей нужные последовательности нуклеотидов, соответствующими рестрикционными ферментами, химическим

5 синтезом, ферментативной полимеризацией на шаблонах ДНК или РНК, или комбинацией этих методов. Расщепление рестрикционными ферментами может производиться в соответствующем буфере при температуре 20°-70°С с 0.1-10 мкг ДНК. Ферментативная полимеризация ДНК может производиться *in vitro* с использованием ДНК-полимераз, таких как ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) в соответствующем буфере, содержащем нуклеозидтрифосфаты dATP, dCTP, dGTP и dTTP при требуемой температуре 10°-37°С, главным образом в объеме 50 мкл или меньше. Ферментативное сшивание фрагментов ДНК может производиться с использованием ДНК-лигаз, таких как ДНК-лигаза T4 в соответствующем буфере при температуре от 40°С до комнатной, главным образом в объеме 50 мкл или менее.

20 Химический синтез полимера или фрагментов ДНК может производиться посредством обычных методов химии фосфотриэфилов, фосфитов или фосфорамидитов с использованием твердофазных методов, таких как описанные в "*Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual*" (ed. H.G. Gassen and A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982), или в других научных публикациях, например, M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. Sproat, and R.C. Titmas, *Nucleic Acids Research*, 1982,10, 6243; B.S. Sproat and W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 1983,24,5771; M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980,21,719; M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981,103, 3185; S.P. Adams et al., *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661; N.D. Sinha, J. Biemat, J. McMannus, and H. Koester, *Nucleic Acids Research*, 1984, 12,4539; and H.W.D. Matthes et al., *EMBO Journal*, 1984,3,801. Предпочтительно используется автоматизированный синтезатор ДНК.

40 Молекулы ДНК могут быть получены посредством расщепления соответствующими рестрикционными ферментами векторов, несущих заданные кодирующие последовательности, или посредством использования метода полимеразной цепной реакции. Точная структура молекул ДНК и способ, которым их получают, зависят от структуры желаемого продукта. Разработка соответствующей стратегии построения молекулы ДНК, кодирующей соединение – рутинное дело для квалифицированного работника в технологии.

50 Экспрессия полимера ДНК, кодирующего соединение, в рекомбинантной клетке - хозяине может быть проведена посредством реплицирующегося вектора

экспрессии, способного к экспрессии полимера ДНК в клетке – хозяине. Вектор экспрессии нов и также является частью изобретения. Реплицирующийся вектор экспрессии может быть получен, в соответствии с изобретением, посредством

5 разрыва вектора, совместимого с клеткой - хозяином, для предоставления линейного сегмента ДНК, имеющего интактный репликон, и сочетания указанного линейного сегмента с одной или более молекулами ДНК, которые

10 вместе с указанным линейным сегментом кодируют соединение, при условии сшивания. Сшивание линейного сегмента и более чем одной молекулы ДНК может быть проведено одновременно или последовательно, по желанию. Таким

15 образом, полимер ДНК может формироваться предварительно или в ходе построения вектора, по желанию. Lo et al. (1988) *Protein Engineering* 11:495 описали полезный вектор экспрессии, в котором транскрипция гена Fc-X использует энхансер/промотор цитомегаловируса человека и

20 полиаденилированный сигнал SV40. Соответствующие векторы включают плазмиды, бактериофаги, космиды и рекомбинантные вирусы, происходящие от, например, бакуловирусов, вакцинии или вируса Семлики Форест (Semliki Forest

25 virus). Таким образом, ранее известные векторы (Lo et al. (1998) *Protein Engeneering* 11:495-500) были модифицированы замещением последовательности Fc IgG1 человека последовательностями из кДНК, кодирующей Fc IgG2a мыши

30 (US 5 726 044).

Выбор вектора будет определяться отчасти клеткой - хозяином, которая может быть прокариотической, такой как *E. coli*, или эукариотической, такой как

35 C127 мыши, мышинная миелома, яичник китайского хомяка, клетки COS или HeLa, грибы, например, нитевидные грибки или одноклеточные дрожжи, или клетки насекомых, таких как дрозофила. В настоящее время предпочтительные

40 клетки - хозяева для использования в изобретении включают бессмертные клетки гибридомы, клетки миеломы NS/0, клетки 293, клетки яичника китайского хомяка, клетки HELA, и клетки COS. Клетка - хозяин может также быть трансгенным животным.

45 Полимеризация и сшивание могут производиться как описано выше для получения полимера ДНК. Расщепление рестрикционными ферментами может производиться в соответствующем буфере при температуре 20°-70°С с 0.1-10 мкг ДНК. Рекомбинантную клетку - хозяин получают, в соответствии с

50 изобретением, трансформацией клетки-хозяина реплицирующимся вектором

экспрессии изобретения в трансформирующих условиях. Соответствующие трансформирующие условия доступны и описаны, например, в вышеупомянутом Maniatis и др., , или "*DNA Cloning*" Vol. II, D.M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

5 Выбор трансформирующих условий определяется клеткой - хозяином. Таким образом, бактериальный организм, такой как *E. coli* может обрабатываться раствором CaCl_2 (Cohen et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1973,69,2110) или раствором,

10 включающим смесь RbCl , MnCl_2 , уксуснокислого калия и глицерина, а затем 3-(N-морфолино)-пропансульфо кислотой, RbCl и глицерином. Клетки млекопитающих в культуре могут быть трансформированы соосаждением

15 кальцием векторной ДНК на клетки. Изобретение также распространяется на клетки – хозяева, трансформированные или трансфицированные реплицирующимся вектором экспрессии изобретения. Культивирование трансформированной клетки - хозяина в условиях, разрешающих экспрессию

20 полимера ДНК производится традиционно, как описано, например, в Maniatis. и "*DNA Cloning*", процитированных выше. Таким образом, предпочтительно клетка снабжается питанием и культивируется при температуре ниже 45°C . Продукт экспрессии выделяют обычными методами соответственно клетке - хозяину.

25 Таким образом, если клетка - хозяин является бактериальной, такой как *E. coli*, она может быть лизирована физически, химически или ферментативно, а белковый продукт изолирован из полученного лизата. Если продукт должен секретироваться из бактериальной клетки, он может быть выделен из околоплазменного пространства или питательной среды. Если хозяин - клетка

30 млекопитающего, продукт может быть выделен главным образом из питательной среды. Полимер ДНК может быть собран в векторы, предназначенные для выделения стабильных линий трансформированных клеток млекопитающих, экспрессирующих продукт: например векторы вируса бычьей папилломы или

40 усиленные векторы в клетках яичника китайского хомяка (*DNA cloning* Vol.II D.M. Glover ed. IRL Press 1985; Kaufman, R.J., *Molecular and Cellular Biology* 5, 1750-1759, 1985; Pavlakis G.N. and Hamer, D.H., *Proceedings of the National*

45 *Academy of Sciences (USA)* 80,397-401,1983; Goeddel, D.V. et al., и EP 0 093 619, 1983).

Иммунokonъюгаты изобретения могут содержать линкерные молекулы.

50 Линкер предпочтительно сделан из аминокислот, соединенных пептидными связями. Таким образом, в предпочтительных вариантах линкер сделан из 1 - 20

аминокислот, соединенных пептидными связями, где аминокислоты отобраны из 20 естественно встречающихся аминокислот. Некоторые из этих аминокислот могут быть гликозилированы, как ясно понимается в технологии. В более предпочтительном варианте конструкции, эти 1 - 20 аминокислот отобраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина, и лизина. Даже более предпочтительно, линкер сделан из большинства аминокислот, которые стерически не затруднены, таких как глицин и аланин. Таким образом, предпочтительные линкеры – полиглицины, такие как полиGly (особенно (Gly)₂ - (Gly)₇),

поли (Gly-Ala),

поли Ala .

Другие отдельные примеры подходящих линкеров:

(Gly)₃Lys(Gly)₄

(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂

(Gly)₃Cys(Gly)₄ и

ProAsnGlyGly.

Комбинации Gly и Ala также предпочтительны. Линкеры, приведенные здесь, являются образцами; линкеры в пределах этого изобретения могут быть намного длиннее и могут включать другие остатки. Непептидные линкеры также возможны. Пептидные линкеры могут быть изменены, образуя производные как описано выше.

Предпочтительные линкеры изобретения не или мало иммуногенны. Большинство из вышеназванных линкерных пептидов по крайней мере менее иммуногенны. Однако, возможно, что при создании связи между антителом или sFv, Fab, Fab' или F(ab')₂ или доменом Fc и целевым белком через молекулу линкерного пептида, как упоминалось выше, могут быть заново созданы новые иммуногенные эпитопы в пределах области связки, что ведёт к иммуноконъюгату, который имеет увеличенную иммуногенность по сравнению с иммуногенностью отдельных (деиммунизированных) компонентов. Эта ситуация может также распространяться на сшитые белки, не имеющие молекулы линкера. Поэтому, изобретение также касается деиммунизированных областей сшитого белка, согласно изобретению, так называемых областей шивки или соединения. При сшивании первой белковой молекулы со второй белковой молекулой (которая также может быть молекулой линкера) через C- и N-концы, создаётся

область последовательности, которая является искусственной и, таким образом, обычно еще не виденная иммунной системой. Считается, что эта область иммуногенна. Область аминокислотных остатков содержит, согласно изобретению, приблизительно 10 остатков каждого белкового конца (N-или C-конца). Полная область сшивки включает, поэтому, приблизительно 20 аминокислотных остатков, предпочтительно 2 - 16, более предпочтительно 2-10 (которые являются остатками аминокислот 1 - 8 и 1 - 5 каждого партнера сшивки, соответственно).

Изобретение также включает дальнейшие варианты Fc. В таких дальнейших вариантах Fc можно удалить один или более центров нативного Fc, которые обеспечивают структурные особенности или функциональную активность, не нужную для сшитых молекул этого изобретения. Можно удалить эти центры посредством, например, замещения или выщепления остатков, вставки остатков в центр, или обрезания участков, содержащих центр. Вставленные или замещенные остатки могут также быть измененными аминокислотами, такими как пептидомиметики или D-аминокислоты. Например, могут быть удалены один или более гликозилированных центров. Остатки, которые являются обычно гликозилированными (например, аспарагин), могут вызвать цитолитическую реакцию. Такие остатки могут быть удалены или замещены негликозилированными остатками (например, аланином). Центры ADCC, так же как и центры, участвующие во взаимодействии с комплементом, такие как связывающие C1q центры, также могут быть удалены, если есть особая надобность.

Изобретение включает также производные целевого полипептида (X) изобретения. Такие производные могут далее улучшать растворимость, абсорбцию, биологический период полужизни, и т.п. (X). Модифицированные (X) могут, с другой стороны, устранять или снижать любой нежелательный побочный эффект и т.п. Образцовые производные включают также соединения, в которых (X) или некоторая его часть является циклическим. Например, модифицированная пептидная часть может содержать два или больше остатка Cys (например, в линкере), которые могли бы циклизироваться с образованием дисульфидного мостика. Соединение поперечно сшивается или становится способным к перекрестному сшиванию между молекулами. Например, измененная часть пептида может содержать один остаток Cys и таким образом

быть способна образовать межмолекулярный дисульфидный мостик с подобной молекулой.

5 Наконец, данное изобретение касается фармацевтических составов, содержащих указанные биологически активные белки, получаемые методами, изложенными в данном изобретении, и методов терапевтического лечения людей с использованием модифицированных молекул и фармацевтических составов.

10 Терапевтические составы данного изобретения содержат физиологически переносимый носитель вместе с лекарственным средством, описываемым здесь, как активным ингредиентом, растворённым или распылённым в носителе. Как
15 принято здесь, термины «фармацевтически приемлемый», «физиологически переносимый» и их грамматические вариации, как они относятся к составам, носителям, разбавителям и реагентам, используются как взаимозаменяемые и
20 представляют материалы, которые могут назначаться млекопитающим, не вызывая нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, расстройство пищеварения и т.п. Получение фармацевтических композиций, которые содержат активные ингредиенты, растворённые или
25 распылённые в них, хорошо разработано в уровне техники и не должно иметь ограничений, связанных с составом. Как правило, такие композиции готовят как инъекционные или как растворы, или как суспензии, однако, твердых форм,
30 пригодных для растворения, или могут также быть получены суспензии в жидкости перед употреблением. Препарат может также быть эмульгирован. Активный ингредиент может быть смешан с наполнителями, которые являются
35 фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, и в количествах, пригодных для использования в терапевтических методах, описанных здесь. Соответствующие наполнители, например, - вода, солевой
40 раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., и их комбинации. Кроме того, если желательно, композиция может содержать меньшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, рН-буферные
 средства и т.п., которые повышают эффективность активного ингредиента.

45 Терапевтическая композиция данного изобретения может включать фармацевтически приемлемые соли компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли кислот (образуемые свободными аминокруппами
50 полипептида), которые образуются с минеральными кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или с такими органическими

кислотами, как уксусная, винная, миндальная и т.п.. Соли, образуемые со свободными карбоксильными группами, могут быть производными неорганических оснований, таких как, например, гидроокиси натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, новокаин и т.п. Особенно предпочтительна соль HCl при использовании для получения антагонистов циклических полипептидов αv . Физиологически переносимые носители известны в уровне техники. Образцовые жидкие носители - стерильные водные растворы, которые не содержат никаких веществ в дополнение к активным ингредиентам и воде, или содержат буфер, такой как фосфорнокислый натрий при физиологическом pH, физиологический солевой раствор или оба, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор. Далее, водные носители могут содержать больше чем одну буферную соль, так же как и соли, такие как хлористые натрий и калий, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества. Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы в дополнение или вместо воды. Образцы таких дополнительных жидких фаз - глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и водно-масляные эмульсии.

Как правило, терапевтически эффективное количество модифицированного иммуноглобулина в форме модифицированного антитела или фрагмента антитела, согласно изобретению, - такое количество, которое при применении в физиологически переносимой композиции является достаточным для достижения концентрации в плазме от приблизительно 0.01 микрограмма (мкг) на миллилитр (мл) до приблизительно 100 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 5 мкг/мл и обычно приблизительно 5 мкг/мл. Иначе говоря, дозировка может изменяться от приблизительно 0.1 мг/кг до приблизительно 300 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0.2 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг, наиболее предпочтительно от приблизительно 0.5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, в один или более приёмов дозы ежедневно в течение одного или нескольких дней. Если иммунотерапевтическое средство находится в форме фрагмента моноклонального антитела или конъюгата, количество можно легко регулировать, основываясь на соотношении массы фрагмента / конъюгата к массе целого антитела. Предпочтительная мольная концентрация в плазме - от

приблизительно 2 микромоль/л (мкМ) до приблизительно 5 миллимоль/л (мМ) и, предпочтительно, приблизительно от 100 мкМ до 1 мМ антагониста антитела.

5 Согласно этому изобретению, терапевтически эффективное количество средства, которое является неиммунотерапевтическим пептидом или белком, -
обычно такое количество молекул, которое при применении в физиологически
10 переносимой композиции является достаточным для достижения концентрации в плазме от приблизительно 0.1 микрограмма (мкг) на миллилитр (мл) до
приблизительно 200 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 1 мкг/мл до
приблизительно 150 мкг/мл. На основе белка, имеющего массу приблизительно
15 500 грамм/моль, предпочтительная мольная концентрация в плазме - от
приблизительно 2 микромоль/л (мкМ) до приблизительно 5 миллимоль/л (мМ) и,
предпочтительно, приблизительно от 100 мкМ до 1 мМ антагониста антитела.

20 Фармацевтические композиции изобретения могут включать выражение, охватывающее лечение субъекта средствами, которые уменьшают или
предупреждают побочные эффекты, связанные с комбинированной терапией
данного изобретения ("сопутствующая терапия"), включая, но не ограничиваясь
25 ими, такие средства, например, которые уменьшают токсическое действие противораковых препаратов. Указанные сопутствующие средства
предотвращают или уменьшают возможность тошноты и рвоты, связанной с
30 химиотерапией, лучевой терапией или операцией, или уменьшают возможность инфекции, связанной с назначением миелосупрессивных противораковых
препаратов. Сопутствующие средства известны в технологии.
35 Модифицированные белки, согласно изобретению, могут дополнительно применяться с адьювантами, подобными BCG и стимуляторам иммунной системы.

40 Кроме того, композиции могут включать иммунотерапевтические средства, химиотерапевтические средства и противоопухолевые средства, которые могут
содержать цитотоксически эффективные радиоактивные меченые изотопы, или
другие цитотоксические средства, такие как цитотоксические пептиды
45 (например, цитокины) или цитотоксические препараты и т.п.. Типичная дозировка активнодействующего компонента, который является
предпочтительно химическим антагонистом или (химическим)
химиотерапевтическим средством, согласно изобретению,
50 (неиммунотерапевтическим средством и не иммунотерапевтическим

пептидом/белком) – от 10 мг до 1000 мг, предпочтительно приблизительно от 20 до 200 мг, и более предпочтительно от 50 до 100 мг на килограмм веса тела в сутки.

Следующие примеры описывают изобретение более подробно. Однако этот список не исчерпывает изобретение.

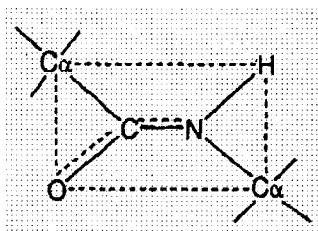
ПРИМЕР 1:

Следующий пример подробно описывает предпочтительный метод для идентификации иммуногенных областей последовательности (Т-лимфоцитарных эпитопов) в пределах последовательностей шитых белков, как раскрыто в этом изобретении. Однако следует отметить, что указанные молекулы могут быть получены другими известными методами.

Идентификация Т-лимфоцитарных эпитопов молекул, которые были изменены, чтобы получить иммуноконъюгаты, согласно данному изобретению, может быть достигнута различными методами, которые описаны в предыдущих работах (WO 92/10755 и WO 96/40792 (Novo Nordisk), EP 0519 596 (Merck & Co.), EP 0699 755 (Centro de Immunologia Molecular), WO 98/52976 и WO 98/59244 (Biovation Ltd.), или родственными методами.

Благоприятные иммуноконъюгаты, однако, могут быть получены, если идентификация указанных эпитопов реализуется следующим новым методом, который описывается здесь подробно. Существует множество факторов, которые играют важные роли в определении полной структуры белка, полипептида или иммуноглобулина. Во-первых, пептидная связь, то есть, связь, которая соединяет аминокислоты в цепи вместе, является ковалентной связью. Эта связь имеет плоскую структуру, являясь по существу замещенным амидом. "Амид" – любое из группы органических соединений, содержащих группировку -CONH-.

Плоская пептидная связь, связывающая $C\alpha$ смежных аминокислот, может быть представлена, как изображено ниже:



Поскольку атомы O=C и C-N лежат в относительно жёсткой плоскости, свободное вращение не происходит вокруг этих осей. Следовательно, плоскость, схематично изображенная прерывистой линией, обозначается иногда, как

"амидная" или " пептидная " плоскость, в которой лежат атомы кислорода (O), углерода (C), азота (N) и водорода (H) пептидного скелета. В противоположных углах этой амидной плоскости расположены атомы Ca. Так как нет
5 существенного вращения вокруг атомов O=C и C-N в пептидной или амидной плоскости, полипептидная цепь, таким образом, включает ряд плоских пептидных связей, соединяющих атомы Ca.

10 Второй фактор, который играет важную роль в определении полной структуры или конформации полипептида или белка - угол вращения каждой амидной плоскости вокруг простой связи Ca. Термины "угол вращения " и
15 "торсионный угол " в дальнейшем рассматриваются как эквивалентные. Принимая, что атомы O, C, N и H остаются в плоскости амида (что обычно является справедливым допущением, хотя могут быть некоторые небольшие отклонения этих атомов от плоскости для некоторых конформаций), эти углы
20 вращения определяют конформацию N и R полипептидного скелета, то есть, структуру, как она существует между смежными остатками. Эти два угла известны как ϕ и ψ . Набор углов ϕ_i, ψ_i , где нижний индекс i представляет
25 отдельный остаток полипептидной цепи, таким образом, фактически определяет вторичную структуру полипептида. Договоренности, используемые в определении углов ϕ и ψ , то есть отправные точки, в которых амидные
30 плоскости образуют нулевой угол, и определение, который угол ϕ , а который ψ для данного полипептида, определены в литературе. См., например, Ramachandran et al. *Adv. Prot. Chem.* 23:283-437 (1968), на страницах 285-94,
35 которые здесь включены в ссылки.

Настоящий метод может быть применен к любому белку, и базируется частично на открытии, что у людей якорное положение Кармана 1 связывающих
40 бороздок молекул МНС класса II имеет явно выраженную специфичность к отдельным боковым цепям аминокислот. Специфичность этого кармана определяется идентичностью аминокислоты в положении 86 бета-цепи молекулы МНС класса II. Этот центр располагается на дне Кармана 1 и определяет размер
45 боковой цепи, которая может быть размещена в этом кармане Marshall, K.W., *J. Immunol.*, 152:4946-4956 (1994). Если этот остаток - глицин, то в этом кармане могут быть размещены все гидрофобные алифатические и ароматические
50 аминокислоты (гидрофобные алифатические: валин, лейцин, изолейцин, метионин, а ароматические: фенилаланин, тирозин и триптофан), с

предпочтением для ароматических боковых цепей. Если этот карманный остаток - валин, то боковая цепь этой аминокислоты высовывается в карман и ограничивает размер боковых цепей пептида, которые могут быть размещены так, что могут быть размещены только гидрофобные алифатические боковые цепи. Поэтому, в последовательности остатков аминокислот, везде, где найдена аминокислота с гидрофобной алифатической или ароматической боковой цепью, есть потенциальное наличие ограниченного Т-лимфоцитарного эпитопа для МНС класса II. Если боковая цепь гидрофобная алифатическая, однако, она имеет приблизительно в два раза больше шансов быть связана с Т-лимфоцитарным эпитопом, чем ароматическая боковая цепь (допуская приблизительно равномерное распределение типов Кармана 1 среди общей популяции).

Вычислительный метод, воплощающий существующее изобретение, профилирует вероятность того, что область пептида содержит Т-лимфоцитарные эпитопы, следующим образом:

(1) Сканируется первичная последовательность сегмента пептида predetermined length, and all hydrophobic aliphatic and aromatic side chains are identified. (2) A weight is assigned to each hydrophobic aliphatic side chain, greater than for aromatic side chains; preferably about double the weight, for example, a weight of 2 for a hydrophobic aliphatic side chain and a weight of 1 for an aromatic side chain. (3) The weights are summed for each overlapping segment (window) of predetermined uniform length in the peptide, and the sum is assigned to each amino acid residue in the segment (window), preferably to the residue closest to the center of the segment (window). This procedure is repeated for each overlapping segment (window) of amino acid residues. Thus, a weight is assigned to each amino acid residue in the peptide, representing the probability of a T-lymphocyte epitope in that segment (window). (4) The weights, calculated and assigned as described above in step 3, can be plotted as a function of amino acid residue position in

5
полной оцениваемой последовательности аминокислотных остатков. (5) Все
участки последовательности, которые имеют predetermined значение,
например, значение 1, считаются вероятно содержащими Т-лимфоцитарные
эпитопы и могут быть изменены, если желательно.

10
Этот специфический аспект настоящего изобретения предоставляет общий
метод, посредством которого могут быть описаны области пептидов, вероятно
содержащие Т-лимфоцитарные эпитопы. Изменение пептида в этих областях
потенциально будет модифицировать характеристики связывания МНС класса II.

15
Согласно другому аспекту настоящего изобретения, Т-лимфоцитарные
эпитопы могут быть предсказаны с большей точностью при помощи более
сложного вычислительного метода, который принимает во внимание
взаимодействия пептидов с моделями аллелей МНС класса II. Вычислительный
20
прогноз присутствия Т-лимфоцитарных эпитопов в пределах пептида, согласно
этому особому аспекту изобретения, включает построение моделей по крайней
мере 42 аллелей МНС класса II, основанных на структурах всех известных
молекул МНС класса II, и метод использования этих моделей в вычислительной
25
идентификации Т-лимфоцитарных эпитопов, построение библиотек пептидных
скелетов для каждой модели, чтобы учесть известную вариабельность
относительных положений альфа-углеродов (C α) пептидного скелета,
30
построение библиотек конформаций боковых цепей аминокислот для каждого
стыка скелета с каждой моделью для каждого из 20 аминокислотных вариантов в
положениях, критических для взаимодействия между пептидом и молекулой
МНС класса II, и использование этих библиотек скелетов и конформаций
35
боковой цепи в соединении с оценочной функцией для выбора оптимального
скелета и конформации боковой цепи для специфического пептида,
состыкованного с отдельной молекулой МНС класса II, и выведения степени
40
связывания из этого взаимодействия.

45
Модели молекул МНС класса II могут быть получены через моделирование
гомологии из множества подобных структур, находящихся в Brookhaven Protein
Data Bank ("PDB"). Они могут быть сделаны при помощи полуавтоматического
программного обеспечения для моделирования гомологии (Modeller, Sali A. &
Blundell TL., 1993. *J. Mol Biol* 234:779-815), которое включает моделируемую
50
аннелирующую функцию, в сочетании с CHARMM для минимизации энергии

силового поля (получен от Molecular Simulations Inc., San Diego, Ca.). Могут использоваться также альтернативные методы моделирования.

Настоящий метод значительно отличается от других вычислительных методов, которые используют библиотеки экспериментально добытых данных для связывания каждого аминокислотного варианта в каждом положении в связывающей бороздки для небольшого ряда молекул МНС класса II (Marshall, K.W., et al, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1(3): 157-162) (1995), или даже других вычислительных методов, которые используют подобные экспериментальные данные для связывания, чтобы определить связывающие свойства отдельных типов связывающих карманов внутри бороздки, снова используя относительно малое подмножество молекул МНС класса II, и затем 'смешивая и подбирая' типы карманов из этой библиотеки карманов, чтобы далее искусственно создать 'виртуальные' молекулы МНС класса II (Sturniolo T., et al., *Nat. Biotech*, 12(6): 555-561 (1999)). Оба предшествующих метода страдают главным недостатком, что вследствие сложности проб и потребности синтезировать большие количества вариантов пептида, только небольшое количество молекул МНС класса II может быть экспериментально просканировано. Поэтому первый предшествующий метод может делать прогнозы только для небольшого количества молекул МНС класса II. Второй предшествующий метод также делает допущение, что карман, исследованный для сходных аминокислот в одной молекуле, будет иметь те же связывающие свойства в контексте различных аллелей класса II, и, далее, страдает недостатками, что только те молекулы МНС класса II могут быть 'виртуально' созданы, которые содержат карманы, содержащиеся в библиотеке карманов. Используя метод моделирования, описанный здесь, можно вывести структуру любого количества и типа молекул МНС класса II, поэтому аллели могут быть специально выбраны, чтобы представлять общую популяцию. Кроме того, количество просканированных молекул МНС класса II может быть увеличено посредством создания дальнейших моделей, что лучше, чем необходимость получать дополнительные данные через комплексное экспериментирование.

Использование библиотеки пептидных скелетов учитывает вариацию положений атомов C α различных пептидов, сканируемых при стыковании с отдельными молекулами МНС класса II. Это снова отличает данный метод от предыдущих альтернативных вычислительных методов, описанных выше,

которые полагаются на использование упрощенных пептидных скелетов для того, чтобы сканировать связывание аминокислот в отдельных карманах. Эти упрощенные скелеты вряд ли будут представлять конформации скелета, найденные в 'реальных' пептидах, что ведёт к погрешностям в прогнозе связывания пептида. Существующая библиотека скелетов создана посредством наложения скелетов всех пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II, находящихся в Protein Data Bank, и записи среднеквадратического отклонения между атомами $C\alpha$ каждой из одиннадцати аминокислот, расположенных в пределах связывающей бороздки. В то время как эта библиотека может быть получена из небольшого количества соответствующих доступных мышинных и человеческих структур (в настоящее время 13), чтобы учесть возможность даже большей вариабельности, среднеквадратическое отклонение для каждого положения $C\alpha$ увеличено на 50 %. Потом определяется среднее положение $C\alpha$ каждой аминокислоты и вокруг этой точки рисуется сфера, радиус которой равняется среднеквадратическому отклонению в этом положении плюс 50 %. Эта сфера представляет все позволенные положения $C\alpha$.

Исходя от $C\alpha$ с наименьшим среднеквадратическим отклонением (который из аминокислот в Кармане 1, как упомянуто выше, эквивалентен положению 2 из 11 остатков в связывающей бороздки), сфера трехмерно «расчерчивается», и каждый узел в пределах полученной решётки тогда используется как возможная локализация для $C\alpha$ этой аминокислоты. Следующая амидная плоскость, соответствующая пептидной связи со следующей аминокислотой, прививается на каждый из этих $C\alpha$, а углы ϕ и ψ ступенчато проворачиваются через определённые интервалы, чтобы позиционировать следующий $C\alpha$. Если следующий $C\alpha$ попадает внутрь 'сферы дозволенных положений' для этого $C\alpha$, то ориентация дипептида принимается, если он попадает вне сферы, тогда дипептид отбрасывается. Далее этот процесс повторяется для каждого из последующих $C\alpha$, так что пептид вырастает из 'затравки' $C\alpha$ Кармана 1, пока все девять последовательных $C\alpha$ не будут позиционированы из всех возможных перестановок предшествующих $C\alpha$. Процесс тогда повторяется еще один раз для одиночного $C\alpha$, предшествующего карману 1, чтобы создать библиотеку положений скелетных $C\alpha$, расположенных в пределах связывающей бороздки.

Количество произведенных пептидных скелетов зависит от нескольких факторов: размер 'сфер дозволенных положений'; масштаб очерчивания

'первичной сферы' в положении Кармана I; шаг ступенчатого вращения углов ϕ и ψ , используемые для позиционирования последующих $C\alpha$. Используя этот процесс, можно создать большую библиотеку пептидных скелетов. Чем больше библиотека скелетов, тем более вероятно, что будет найдена оптимальная посадка для отдельного пептида в пределах связывающей бороздки молекул МНС класса II. Поскольку не все скелеты будут подходить для стыковки со всеми моделями молекул МНС класса II вследствие столкновений с аминокислотами связывающих доменов, для каждой аллели создаётся подмножество библиотек, включающее скелеты, которые могут быть размещены этой аллелью. Использование библиотеки скелетов в сочетании с моделями молекул МНС класса II создаёт исчерпывающую базу данных, состоящую из дозволённых конформаций боковых цепей для каждой аминокислоты в каждом положении связывающей бороздки для каждой молекулы МНС класса II, состыкованной с каждым дозволённым скелетом. Этот набор данных произведен с использованием простой функции стерического перекрытия, где молекула МНС класса II стыкуется со скелетом, а аминокислотная боковая цепь прививается на скелет в желательном положении. Каждая из способных вращаться связей боковой цепи ступенчато проворачивается с определённым шагом, и отмечаются результирующие положения атомов, зависящие от этой связи. Взаимодействие атома с атомами боковых цепей связывающей бороздки отмечается, а положения принимаются или отбрасываются согласно следующим критериям: Общая сумма перекрытия всех атомов, позиционированных к этому моменту, не должна превышать предопределённого значения. Таким образом, строгость конформационного исследования зависит от интервала, используемого в ступенчатом вращении связи и предопределённого предела для полного перекрытия. Эта последняя величина может быть мала, если известно, что специфический карман жёсткий, однако строгость может быть ослаблена, если известно, что положения боковых цепей кармана являются относительно гибкими. Таким образом, могут быть сделаны поправки, чтобы имитировать вариации в гибкости внутри карманов связывающей бороздки. Потом это конформационное исследование повторяется для каждой аминокислоты в каждом положении каждого скелета при стыковании с каждой молекулой МНС класса II, чтобы создать исчерпывающую базу данных конформаций боковой цепи.

Используется соответствующее математическое выражение для оценки энергии связывания между моделями молекул МНС класса II в сочетании с конформациями пептидного лиганда, которые должны быть эмпирически
5 получены посредством сканирования большой базы данных конформаций скелетов/боковых цепей, описанных выше. Таким образом, белок сканируется на потенциальные Т-лимфоцитарных эпитопы посредством подвергания
10 следующим вычислениям каждого возможного пептида длиной, варьирующей между 9 и 20 аминокислотами (хотя длина сохраняется постоянной для каждого сканирования): Выбирается молекула МНС класса II вместе с пептидным
15 скелетом, разрешённым для этой молекулы, и прививаются боковые цепи, соответствующие желательной последовательности пептида. Собираются данные атомной идентичности и межатомного расстояния, касающиеся специфической
20 боковой цепи в специфическом положении на скелете, для каждой дозволенной конформации этой аминокислоты (полученные из вышеописанной базы данных). Это повторяется для каждой боковой цепи вдоль скелета и выводятся показатели пептида с использованием оценочной функции. Лучший показатель для этого
25 скелета сохраняется, и процесс повторяется для каждого дозволенного скелета для выбранной модели. Показатели от всех дозволенных скелетов сравниваются, и самый высокий показатель считают пептидным показателем для желательного пептида в этой модели МНС класса II. Потом этот процесс повторяется для
30 каждой модели с каждым возможным пептидом, производным от сканируемого белка, и показатели для пептидов демонстрируются напротив моделей.

В контексте настоящего изобретения, каждый лиганд, предоставленный для
35 вычисления сродства связывания - аминокислотый сегмент, выбранный из пептида или белка, как обсуждено выше. Таким образом, лиганд - отобранный промежуток аминокислот приблизительно 9 - 20 аминокислот в длину,
40 производный от пептида, полипептида или белка с известной последовательностью. Термины "аминокислоты" и "остатки" в дальнейшем рассматриваются как эквивалентные. Лиганд, в форме последовательных
45 аминокислот исследуемого пептида, привитых на скелет из библиотеки скелетов, устанавливается в связывающую щель молекулы МНС класса II из библиотеки моделей молекул МНС класса II через координаты атомов Са пептидного
50 скелета и выбирается разрешённая конформация для каждой боковой цепи из базы данных дозволенных конформаций. Идентичности соответствующих

атомов и межатомные расстояния также берутся из этой базы данных и используются для вычисления показателя связывания пептида. Лиганды с высоким сродством связывания со связывающим карманом МНС класса II, помечаются как кандидаты на сайт-направленный мутагенез. Делаются аминокислотные замены в помеченном лиганде (и, следовательно, в интересующем белке), который потом повторно испытывается с использованием оценочной функции, чтобы определить изменения, которые уменьшают сродство связывания ниже predetermined пороговой величины. Потом эти изменения могут быть встроены в интересующий белок, чтобы удалить Т-лимфоцитарные эпитопы. Связывание между пептидным лигандом и связывающей бороздкой молекулы МНС класса II включает нековалентные взаимодействия, включая, но, не ограничиваясь ими: водородные связи, электростатические взаимодействия, гидрофобные (липофильные) взаимодействия и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Они включены в оценочную функцию пептида, как подробно описано ниже. Следует понимать, что водородная связь - нековалентная связь, которая может быть образована между полярными или заряженными группами и состоит из водородного атома, поделенного двумя другими атомами. Водород донора водорода имеет положительный заряд, тогда как акцептор водорода имеет частичный отрицательный заряд. Для целей взаимодействия пептид/белок, донорами водородной связи могут быть или атомы азота с присоединенным водородом, или атомы водорода, присоединенные к кислороду или азоту. Атомами - акцепторами водородной связи могут быть атомы кислорода, не соединенные с водородом, атомы азота без присоединенного водорода с одной или двумя связями, или атом серы только с одной связью. Некоторые атомы, такие как кислород, присоединенный к водороду, или иминный азот (например, C=NH), могут быть как акцепторами водорода, так и донорами. Энергии водородной связи варьируют от 3 до 7 ккал/моль и намного более прочны, чем ван-дер-ваальсовы связи, но более слабы, чем ковалентные связи. Водородные связи также высоконаправлены и наиболее прочны, когда атом-донор, водородный атом и атом-акцептор коллинеарны. Электростатические связи образуются между противоположно заряженными ионными парами, а сила взаимодействия является обратно пропорциональной квадрату расстояния между атомами согласно закону Кулона. Оптимальное расстояние между ионными парами - около 2.8Å. Во взаимодействиях белок/пептид электростатические

связи могут образовываться между аргинином, гистидином или лизином и аспартатом или глутаматом. Прочность соединения будет зависеть от рКа ионизирующейся группы и диэлектрической проницаемости среды, хотя они

Липофильные взаимодействия - благоприятные гидрофобно-гидрофобные контакты, которые встречаются между белком и пептидным лигандом. Обычно они будут встречаться между гидрофобными боковыми цепями аминокислот пептида, введенного внутрь карманов связывающей бороздки, так, что они не контактируют с растворителем. Контакт гидрофобных остатков с растворителем является очень неблагоприятным, так как окружающие молекулы растворителя вынуждены образовывать водородные связи друг с другом, формируя подобные клетке клатратные структуры. Результирующее уменьшение энтропии является очень неблагоприятным. Липофильными атомами могут быть атом серы, который неполярен и не акцептирует водород, и атомы неполярные углерода.

Связи Ван-дер-Ваальса - неспецифические силы, действующие между атомами, находящимися на расстоянии 3-4 Å. Они являются более слабыми и менее специфичными, чем водородные и электростатические связи.

Распределение электронного заряда вокруг атома изменяется со временем и, в любой момент, распределение заряда не симметрично. Эта кратковременная асимметрия заряда электрона индуцирует подобную асимметрию в соседних атомах. Результирующие силы притяжения между атомами достигают максимума в контактном интервале Ван-дер-Ваальса, но очень быстро уменьшаются от приблизительно 1 Å к приблизительно 2 Å. Наоборот, если атомы разделены расстоянием, меньшим чем контактный интервал, доминирующими становятся все более сильные отталкивающие силы вследствие перекрывания внешних электронных облаков атомов. Хотя силы притяжения относительно слабы по сравнению с электростатическими и водородными связями (приблизительно 0.6 ккал/моль), силы отталкивания в особенности могут быть очень важны для определения, может ли пептидный лиганд успешно связаться с белком.

В одном из вариантов используется оценочная функция Бёма (подход SCORE1) для оценки константы связывания. (Böhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8(3):243-256 (1994), который здесь включён полностью). В другом варианте используется оценочная функция (подход SCORE2) для оценки сродства

связывания как индикатор лиганда, содержащего Т-лимфоцитарный эпитоп (Vöhm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 12(4):309-323 (1998), который здесь включён полностью). Однако оценочные функции Бёма, как описано в
 5 вышеуказанной библиографии, используются для оценки сродства лиганда к белку, если уже известно, что лиганд успешно связывается с белком, а комплекс белок/лиганд имеет уже установленную структуру, причём установленная
 10 структура присутствует в Protein Data Bank ("PDB"). Поэтому, оценочная функция была доработана с помощью известных положительных данных по связыванию. Чтобы учесть различие между положительными и отрицательными
 15 связывающимися частями, к уравнению должен быть добавлен член отталкивания. Кроме того, более удовлетворительная оценка энергии связи достигается посредством вычисления липофильных взаимодействий попарно, вместо использования члена основанной на площади энергии вышеописанных
 20 функций Бёма. Поэтому, в предпочтительном варианте, энергия связи оценивается с использованием модифицированной оценочной функции Бёма. В модифицированной оценочной функции Бёма энергия связи между белком и
 25 лигандом (ΔG_{bind}) оценивается с рассмотрением следующих параметров: Понижение энергии связи вследствие общей потери поступательной и вращательной энтропии лиганда (ΔG_0); вклады от идеальных водородных связей
 30 (ΔG_{hb}), где по крайней мере один партнер нейтрален; вклады от невозмущенных ионных взаимодействий (ΔG_{ionic}); липофильные взаимодействия между липофильными атомами лиганда и липофильными атомами - акцепторами
 35 (ΔG_{lipo}); потеря энергии связи вследствие замораживания внутренних степеней свободы в лиганде, то есть, свобода вращения вокруг каждой связи C—C уменьшена (ΔG_{rot}); энергия взаимодействия между белком и лигандом (E_{vdw}).

40 Рассмотрение этих условий дает уравнение 1:

$$(\Delta G_{\text{bind}}) = (\Delta G_0) + (\Delta G_{\text{hb}} \times N_{\text{hb}}) + (\Delta G_{\text{ionic}} \times N_{\text{ionic}}) + (\Delta G_{\text{lipo}} \times N_{\text{lipo}}) + (\Delta G_{\text{rot}} + N_{\text{rot}}) + (E_{\text{vdw}}).$$

45 Где N - количество учитываемых взаимодействий для отдельного члена, и, в одном из вариантов, ΔG_0 , ΔG_{hb} , ΔG_{ionic} , ΔG_{lipo} и ΔG_{rot} - константы, которым дают значения: 5.4, -4.7, -4.7, -0.17 и 1.4, соответственно.

50 Член N_{hb} рассчитывается согласно уравнению 2:

$$N_{\text{hb}} = \sum_{\text{h-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \times f(N_{\text{neighb}}) \times f_{\text{pcs}}$$

$f(\Delta R, \Delta\alpha)$ - поправочная функция, которая отвечает за большие отклонения водородных связей от идеальности и рассчитывается согласно уравнению 3:

$$f(\Delta R, \Delta\alpha) = f_1(\Delta R) \times f_2(\Delta\alpha)$$

Где: $f_1(\Delta R) = 1$, если $\Delta R \leq TOL$

или $= 1 - (\Delta R - TOL)/0.4$, если $\Delta R \leq 0.4 + TOL$

или $= 0$, если $\Delta R > 0.4 + TOL$

И: $f_2(\Delta\alpha) = 1$, если $\Delta\alpha < 30^\circ$

или $= 1 - (\Delta\alpha - 30)/50$, если $\Delta\alpha \leq 80^\circ$

или $= 0$, если $\Delta\alpha > 80^\circ$

TOL – приемлемое отклонение длины водородной связи = 0.25 \AA ,

ΔR - отклонение длины водородной связи Н-О/Н от идеального значения = 1.9 \AA ,

$\Delta\alpha$ - отклонение угла водородной связи $\angle \text{N/O-N} \dots \text{O/N}$ от его теоретического значения 180° ,

$f(N_{\text{neighb}})$ различает вогнутые и выпуклые части поверхности белка и поэтому назначает больший вес полярным взаимодействиям, находящимся в карманах, а не находящимся поверхности белка. Эта функция рассчитывается согласно приведенному ниже уравнению 4:

$$f(N_{\text{neighb}}) = (N_{\text{neighb}}/N_{\text{neighb,o}})^\alpha, \text{ где } \alpha = 0.5^\circ$$

N_{neighb} - количество неводородных атомов белка, которые находятся ближе чем 5 \AA к любому данному атому белка.

$N_{\text{neighb,o}}$ является константой = 25

f_{pcs} - функция, которая учитывает площадь полярной поверхности контакта на водородную связь и поэтому различает сильные и слабые водородные связи, и её значение определяется следующим критериям:

$$f_{\text{pcs}} = \beta \text{ когда } A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} < 10 \text{ \AA}^2$$

$$\text{или } f_{\text{pcs}} = 1, \text{ когда } A_{\text{polar}}/N_{\text{HB}} > 10 \text{ \AA}^2$$

A_{polar} - размер полярной поверхности контакта белок - лиганд

N_{HB} - количество водородных связей

β – константа, равняющаяся 1.2

Для завершения модифицированной оценочной функции Бёма вычисляют вклады от ионного взаимодействия ΔG_{ionic} подобно вкладам от вышеописанных водородных связей, так как принята та же геометрическая зависимость.

Член N_{lip}^o рассчитывается согласно приведенному ниже уравнению 5:

$$N_{\text{lipo}} = \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}})$$

$f(r_{\text{IL}})$ рассчитывается для всех липофильных атомов лиганда, I, и всех липофильных атомов белка, L, согласно следующим критериям:

$f(r_{\text{IL}}) = 1$, когда $r_{\text{IL}} \leq R1$ $f(r_{\text{IL}}) = (r_{\text{IL}} - R1) / (R2 - R1)$, когда $R2 < r_{\text{IL}} < R1$

$f(r_{\text{IL}}) = 0$, когда $r_{\text{IL}} \geq R2$

Где: $R1 = r_1^{\text{vdw}} + r_L^{\text{vdw}} + 0.5$

и $R2 = R1 + 3.0$

и r_1^{vdw} – ван-дер ваальсов радиус атома I

и r_L^{vdw} – ван-дер ваальсов радиус атома L

Член N_{rot} является количеством способных вращаться связей боковой цепи аминокислоты и принимается как количество ациклических связей $sp^3 - sp^3$ и $sp^3 - sp^2$. Вращения конечных групп $-CH_3$ или $-NH_3$ не принимаются во внимание.

Последний член, E_{vdw} , рассчитывается согласно уравнению 6,

приведенному ниже:

$$E_{\text{vdw}} = \epsilon_1 \epsilon_2 \left(\left(r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}} \right)^{12} / r^{12} - \left(r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}} \right)^6 / r^6 \right), \text{ где:}$$

ϵ_1 и ϵ_2 – константы, зависящие от природы атома

$r_1^{\text{vdw}} + r_2^{\text{vdw}}$ – ван-дер-ваальсовы атомные радиусы

r - расстояние между парой атомов.

Относительно уравнения 6, в одном варианте константам ϵ_1 и ϵ_2 даны атомные значения: C: 0.245, N: 0.283, O: 0.316, S: 0.316, соответственно (то есть для атомов углерода, азота, кислорода и серы, соответственно). Относительно уравнений 5 и 6, ван-дер-ваальсовым радиусам дают атомные значения C: 1.85, N: 1.75, O: 1.60, S: 2.00 Å.

Следует понимать, что все predetermined значения и константы, данные в уравнениях выше, определены в пределах текущих представлений о взаимодействии белок - лиганд, особенно относительно типа вычисления, предпринимаемого здесь. Поэтому, возможно, что, поскольку эта оценочная функция далее уточняется, эти значения и константы могут измениться, следовательно, любые соответствующие числовые значения, которые дают желательные результаты в терминах оценки энергии связи белка с лигандом, могут использоваться и, следовательно, попасть в область данного изобретения.

Как описано выше, оценочная функция применяется к данным, извлечённым из базы данных конформаций боковой цепи, идентичностей атомов и межатомных расстояний. Для целей настоящего описания, количество молекул МНС класса II, включенных в эту базу данных - 42 модели плюс четыре установленных структуры. Должно быть очевидно из вышеприведенных описаний, что модульная природа построения вычислительного метода данного изобретения означает, что новые модели могут просто быть добавлены и просканированы с библиотекой пептидных скелетов и функцией исследования конформации боковых цепей, чтобы создать наборы дополнительных данных, которые могут быть обработаны функцией оценки пептида как описано выше. Это учитывает, что репертуар просканированных молекул МНС класса II легко может быть увеличен, а структуры и соответствующие данные могут быть заменены, если доступны данные для создания более точных моделей существующих аллелей. Существующий метод предсказания может быть калиброван через набор данных, включающий большое количество пептидов, сродство которых к различным молекулам МНС класса II было предварительно определено экспериментально. Посредством сравнения расчетных и экспериментальных данных, может быть определен отрезок значения, выше которого известно, что все экспериментально определенные Т-лимфоцитарные эпитопы правильно предсказаны.

Следует понимать, что, хотя описанная выше оценочная функция относительно проста по сравнению с некоторыми сложными методологиями, которые доступны, вычисления производятся чрезвычайно быстро. Следует также понимать, что цель состоит не в том, чтобы вычислить истинную энергию связи *per se* для каждого пептида, состыкованного со связывающей бороздкой избранного белка МНС класса II. Основная цель состоит в том, чтобы получить сравнительные данные энергии связи как вспомогательное средство для предсказания локализации Т-лимфоцитарных эпитопов, основанных на первичной структуре (то есть аминокислотной последовательности) избранного белка. Относительно высокая энергия связи или энергия связи выше выбранной пороговой величины предположила бы наличие Т-лимфоцитарного эпитопа в лиганде. Лиганд может тогда быть подвергнут по крайней мере одному кругу аминокислотной замены, а энергия связи перерассчитана. Вследствие быстрой природы вычислений, эти манипуляции пептидной последовательностью могут

производиться в интерактивном режиме в интерфейсе пользовательской программы на экономически доступном компьютерном оборудовании. Основные инвестиции в компьютерное оборудование, таким образом, не требуются.

5 Было бы очевидно для специалиста, что другое доступное программное обеспечение могло бы использоваться для тех же самых целей. В частности, может использоваться более сложное программное обеспечение, которое
10 способно состыковывать лиганды со связывающими центрами белков в сочетании с минимизацией энергии. Примеры состыковывающего программного обеспечения: DOCK (Kuntz et al, *J. Mol Biol.*, 161:269-288 (1982)), LUDI (Bohm, H.J., *J. Comput Aided Mol. Des.*, 8:623-632 (1994)) и FLEXX (Rarey M, et al., *ISMB*, 15 3:300-308 (1995)). Примеры молекулярного моделирования и программного обеспечения манипуляции включают: AMBER (Tripos) и CHARMM (Molecular Simulations Inc.). Использование этих вычислительных методов жёстко
20 ограничило бы производительность метода этого изобретения, вследствие долгого времени обработки, требуемого, чтобы делать необходимые вычисления. Однако, вероятно, что такие методы могли бы использоваться как 'вторичное сито', чтобы получить более точные вычисления энергии связи для пептидов, которые оказались 'положительно связывающимися' посредством метода данного изобретения. Ограничение времени обработки для сложных молекулярно-механических или молекулярно-динамических вычислений - то, что
30 определяется как дизайном программного обеспечения, которое делает эти вычисления, так и текущими технологическими ограничениями компьютерного оборудования. Можно ожидать, что, в будущем, с написанием более
35 эффективного кода и последующего увеличения скорости компьютерных процессоров, станет возможным производить такие вычисления в пределах более умеренного периода времени. Дальнейшая информация относительно энергетических функций, применяемых к макромолекулам, и рассмотрение различных взаимодействий, которые происходят внутри свернутой белковой структуры, может быть найдена в: Brooks, V.R., et al., *J. Comput. Chem.*, 4:187-
45 217 (1983), а дальнейшая информация касательно общих взаимодействий белок-лиганд может быть найдена в: Dauber-Osguthorpe et al., *Proteins* 4(1):31-47(1988), которые включены здесь в ссылки полностью. Полезная общая информация может также быть найдена, например, в Fasman, G.D., ed., *Prediction of Protein*
50

Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, New York, ISBN: 0-306 4313-9.

ПРИМЕР 2: Деиммунизированные формы Fc-лептина

5 Лептин – секретируемый, содержащий 146 аминокислотных остатков белок, участвующий в гомеостатических механизмах, поддерживающих жировую массу (например, WO 00/40615, WO 98/28427, WO 96/05309). Белок (и его антагонисты) несет значительный терапевтический потенциал для лечения 10 диабета, высокого кровяного давления и метаболизма холестерина.

Fc-лептин – сшитый белок, для которого серологический период полураспада существенно улучшен по сравнению с самим лептином (WO 15 0040615). Однако, некоторые формы Fc-лептина, например если Fc получен от IgG1 человека или IgG3 человека, потенциально показывают увеличенную иммуногенность при некоторых обстоятельствах, таких как применение методом 20 подкожной инъекцией. В клиническом эксперименте Фазы 1 было найдено, что лептин сам по себе является, по крайней мере, немного иммуногенным.

Изобретение раскрывает последовательности, идентифицированные в пределах 25 первичной последовательности лептина, которые являются потенциальными Т-лимфоцитарными эпитопами, на основании потенциала связывания МНС класса II. Это особенно относится к ветви лептина человека, содержащей приблизительно 146 остатков аминокислот. Другие предоставили 30 модифицированный лептин (US 5,900,404; WO96/05309), но их подходы были направлены прямо на улучшение коммерческого производства лептина, например, улучшения стабильности *in vitro*. Такие подходы не учитывали 35 важность Т-лимфоцитарных эпитопов для иммуногенных свойств белка, и не догадались прямо влиять на указанные свойства специфическим и контролируемым способом, согласно схеме настоящего изобретения.

40 Специфические формы Fc-лептина: Fc γ 1-лептин, Fc γ 2-лептин, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным доменом Fc, имеющим пониженное сродство к Fc-рецепторам.

45 Последовательности, которые следует изменить в лептине, показывают ниже:

Аминокислотная последовательность, которая является частью 50 последовательности иммуногенно немодифицированного белка ожирения человека (лептина) и имеет потенциальную способность связывать МНС класса

II, выбрана из следующей группы, идентифицированной согласно методу изобретения:

Пептидные последовательности в лептине человека с потенциальной способностью связывать МНС класса II человека.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

VPIQKVQDDTKTL, KTIVTRINDISHT, QSVSSKQKVTGLD, LDFIPGLHPILTL, HPILTLKMDQTL, QTLAVYQQILTSM, QILTSMPSRNVIQ, NVIQISNDLENLR, ENLRDLLHVLAFL, HVLAFSKSCHLPW, DSLGGVLEASGYS, TEVVALSRLQGS, QGSQDMLWQLDL,	QKVQDDTKTLIKT, TIVTRINDISHTQ, SSKQKVTGLDFIP, DFIPGLHPILTL, PILTLKMDQTLA, LAVYQQILTSMPS, TSMPSRNVIQISN, IQISNDLENLRDL, RDLLHVLAFLSKSC, LAFSKSCHLPWAS, SLGGVLEASGYST, EVVALSRLQGS, GSLQDMLWQLDLS,	KTLIKTIVTRIND, TRINDISHTQSVS, QKVTGLDFIPGLH, PGLHPILTLKMD, LTLKMDQTLAVY, AVYQQILTSMPSR, SRJWIQISNDLEN, NDLENLRDLLHVL, DLLHVLAFLSKSCH, CHLPWASGLETLD, GGVLEASGYSTEV, VALSRLQGSQDM, QDMLWQLDLSPGC	TLIKTIVTRINDI, NDISHTQSVSSKQ, TGLDFIPGLHPIL, GLHPILTLKMDQ, SKMDQTLAVYQQI, QQILTSMPSRNVI, RNVIQISNDLENL, LENLRDLLHVLAFL, LHVLAFLSKSCHLP, SGLETLDLGGVL, SGYSTEVVALSRL, SRLQGSQDMLWQ,
---	---	---	---

Замены, приводящие к исключению потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов из лептина человека (WT=дикий тип).

Остаток #	WT остаток	Замены													
3	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
6	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
13	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
14	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
17	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
18	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
21	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
24	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
30	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
36	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
39	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
41	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
42	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
45	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
48	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
49	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
51	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
54	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
58	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
60	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
61	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
64	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
65	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
68	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
73	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
74	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
76	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
80	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
83	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
86	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
87	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
89	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
90	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	

Остаток #	WT остаток	Замены													
		A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
92	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
98	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
100	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
104	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
107	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
110	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
113	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
114	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
119	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
123	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
124	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
126	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
129	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
133	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
136	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	

Любая из вышеназванных последовательностей пептида, может быть использована для модификации с помощью замены одной, или более аминокислот, для получения последовательности, обладающей пониженной или отсутствующей иммуногенностью.

ПРИМЕР 3: Деиммунизированные формы Fc-IL-1Ra

Настоящее изобретение предоставляет модифицированные формы антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra) с одним или более удаленными Т-лимфоцитарными эпитопами. IL-1 - важный воспалительный и иммуномодулирующий цитокин с плеотропным действием на ряд тканей, который, однако, может вносить вклад в патологию, связанную с ревматоидным артритом и другими болезнями, связанными с локальным повреждением ткани. Антагонист рецептора IL-1, способный ингибировать действие IL-1, был очищен, а его ген клонирован [Eisenburg S.P. et al. (1990) *Nature*, 343: 341-346; Carter D.B. et al. (1990) *Nature*, 344: 633-637]. Другие предоставили молекулы IL-1Ra [например, US 5,075,222]. Рекомбинантные формы этого белка имеют терапевтический потенциал для назначения при болезнях, где эффекты IL-1 вредны. Однако, остаётся дальнейшая потребность в аналогах IL-1Ra с улучшенными свойствами. Желаемое улучшение включает альтернативные схемы и методы для экспрессии и очистки упомянутых терапевтических средств, но также и в особенности, усовершенствование биологических свойств белка. Есть особая потребность в улучшении характеристик *in vivo* при назначении человеку. В этом отношении, очень желательно предоставить IL-1Ra со сниженным или отсутствующим потенциалом стимуляции иммунной реакции в человеческом организме. Ожидалось бы, что такие белки проявят увеличенное

время циркуляции внутри человеческого организма, и будут иметь особенную пользу для назначения при хронических или повторяющихся болезнях, таких как в случае множества показаний для IL-1Ra. Данное изобретение предоставляет модифицированные формы белков IL-1Ra, которые, как ожидается, продемонстрируют улучшенные свойства *in vivo*. Это определенно относится к белку IL-1Ra человека, который состоит из 152 остатков аминокислот (Eisenburg, S.P. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5232-5236).

Специфические формы Fc-IL-1Ra: Fcγ1-IL-1Ra, Fcγ2-IL-1Ra, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным доменом Fc, имеющим пониженное сродство к рецепторам Fc.

Пептидные последовательности в антагонисте рецептора интерлейкина-1 человека (IL-1RA) с потенциальной способностью связывать МНС класса II человека.

RKSSKMQAFRIWD,	SKMQAFRIWDVNO,	QAFRIWDVNQKTF,	FRIWDVNQKTFYL,
RIWDVNQKTFYLR,	IWDVNQKTFYLRN,	WDVNQKTFYLRNN,	KTFYLRNNQLVAG,
TFYLRNWQLVAGY,	FYLRNNQLVAGYL,	LRNNQLVAGYLQG,	RNNQLVAGYLQGP,
NQLVAGYLQGPV,	QLVAGYLQGPVNV,	LVAGYLQGPVNVN,	AGYLQGPVNVLEE,
GYLQGPVNVLEEK,	PNVNLEEKIDVVP,	VNLEEKIDVVPIE,	EKIDVVPIEPHAL,
IDVVPIEPHALFL,	DVVPIEPHALFLG,	VPIEPHALFLGIH,	HALFLGIHGGKMC,
ALFLGIHGGKMCL,	LFLGIHGGKMCLS,	LGIHGGKMCLSCV,	GKMCLSCVKSGDE,
MCLSCVKSGDETR,	SCVKSGDETRLQL,	ETRLQLEAVNITD,	TRLQLEAVNITDL,
LQLEAVNITDLSE,	EAVNITDLSENKQ,	VNITDLSENKQD,	TDLSENKQDKRF,
ENKQDKRFAFIR,	KRFAFIRSDSGPT,	FAFIRSDSGPTTS,	AFIRSDSGPTTSF,
TSFESAACPGWFL,	SFESAACPGWFLC,	PGWFLCTAMEADQ,	WFLCTAMEADQPV,
TAMEADQPVSLTN,	QPVSLTNMPDEGV,	VSLTNMPDEGVMV,	TNMPDEGVMVTKF,
PDEGVMVTKFYFQ,	EGVMVTKFYFQED,	GVMVTKFYFQEDE	

Замены, приводящие к исключению потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов

антагониста рецептора интерлейкин-1 человека (IL-1RA). (WT=дикий тип).

Остаток #	WT остаток	Замены													
10	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
13	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
15	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
16	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
18	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
23	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
24	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
25	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
30	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
31	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
34	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
35	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
40	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
42	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
46	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
48	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
49	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
51	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	

Остаток #	WT остаток	Замены													
56	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
57	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
58	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
60	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
65	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
67	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
70	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
78	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
80	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
83	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
85	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
88	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
98	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
100	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
101	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
119	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
120	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
121	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
125	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
131	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
133	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
136	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
141	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
142	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	

ПРИМЕР 4: Деиммунизированные формы Fc-BDNF

Данное изобретение предоставляет модифицированные формы нейротрофического фактора, происходящего из человеческого мозга (BDNF) с одним или более удаленными Т-лимфоцитарными эпитопами. BDNF - гликопротеин из белков семейства фактора роста нервов. Зрелый 119-аминокислотный гликопротеин образуется из большего предшественника, образуя нейротрофический фактор, который способствует выживанию популяций нейронных клеток [Jones K.R. & Reichardt L.F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8060-8064]. Другие предоставили модифицированные молекулы BDNF [US, 5,770,577] и методы для коммерческого производства рекомбинантных молекул BDNF [US, 5,986,070], Такие нейронные клетки все расположены в центральной нервной системе или прямо связанные с ней. Рекомбинантные препараты BDNF предоставили возможность исследовать терапевтический потенциал белка для стимуляции регенерации нерва и терапии дегенеративных болезней. Специфические формы Fc-BDNF: Fc γ 1-BDNF, Fc γ 2-BDNF, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным доменом Fc, имеющим пониженное сродство к рецепторам Fc.

Пептидные последовательности в нейротрофическом факторе из мозга человека (BDNF) с потенциальной способностью связывать МНС класса II человека.

5	GELSVCSISEWV, EWVTAADKKTAVD, VDMSGGTVTVLEK, EKVPVSKGQLKQY, QYFYETKCNPMGY, RGIDKRHWNSQCR, SYVRALTMDSKKR, IGWRFIRIDTSCV, IRIDTSCVCTLI,	LSVCSISEWVTA, WVTAADKKTAVDM, GTVTVLEKVPVSK, VPVSKGQLKQYFY, YFYETKCNPMGYT, RHWNSQCRTTQSY, RALTMDSKKRIGW, GWRFIRIDTSCVC, IDTSCVCTLIKR	DSISEWVTAADKK, KTAVDMMSGGTVTV, VTVLEKVPVSKGQ, GQLKQYFYETKCN, NPMGYTKEGCRGI, HWNSQCRTTQSYV, LTMDSKKRIGWRF, WRFIRIDTSCVCT,	SEWVTAADKKTAV, TAVDMMSGGTVTVL, TVLEKVPVSKGQL, KQYFYETKCNPMG, MGYTKEGCRGIDK, QSYVRALTMDSKK, KRIGWRFIRIDTS, RFIRIDTSCVCTL,
---	--	---	---	---

15 Замены, приводящие к исключению потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов нейротрофического фактора из мозга человека (BDNF) (WT = дикий тип).

Остаток #	WT остаток	Замены												
20 10	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
16	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
20	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
29	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
31	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
36	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
38	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
25 39	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
42	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
44	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
49	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
52	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
53	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
30 54	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
61	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
63	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
71	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
76	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
86	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
87	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
35 90	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
92	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
98	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
100	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
102	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
103	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
40 105	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

ПРИМЕР 5: Деиммунизированные формы Fc-EPO

Настоящее изобретение предоставляет модифицированные формы
 45 человеческого эритропоэтина (ЕРО) с одним или более удаленными Т-
 лимфоцитарными эпитопами. ЕРО – гликопротеиновый, гормон содержащий
 165-аминокислотных остатков, участвующий в созревании эритроидных клеток -
 50 предшественников в эритроциты. Естественно встречающийся ЕРО
 вырабатывается печенью в течение эмбрионального периода и почкой взрослых

и циркулирует в крови, стимулируя продукцию эритроцитов в костном мозге. Анемия почти неизменно является следствием почечной недостаточности вследствие уменьшения продукции ЕРО почками.

Рекомбинантный ЕРО используется как эффективное средство против анемии вследствие хронической почечной недостаточности.

Рекомбинантный ЕРО (экспрессируемый в клетках млекопитающих), имеющий последовательность аминокислот 1-165 из человеческого эритропоэтина [Jacobs, K. et al (1985) *Nature*, 313: 806-810; Lin, F.-K. et al (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:7580-7585], содержит три N-связанных и одну O-связанную олигосахаридные цепи, каждая из которых содержит на конце остатки сиаловой кислоты. Последние важны для способности ЕРО уклоняться от быстрого выведения из кровотока печеночным асиалогликопротеин-связывающим белком.

Недеиммунизированный Fc-ЕРО известен, например, из WO 99/58662, WO 99/02709.

Специфические формы Fc-ЕРО: Fc γ 1-ЕРО, Fc γ 2-ЕРО, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным доменом Fc, имеющим пониженное сродство к рецепторам Fc. ЕРО может быть гликозилирован, частично гликозилирован или иметь модифицированный тип гликозилирования.

Пептидные последовательности в эритропоэтине человека (ЕРО) с потенциальной способностью связывать МНС класса II человека

PRLICDSRVLERY,	RLICDSRVLERYL,	ICDSRVLERYLLE,	CDSRVLERYLLEA,
SRVLERYLLEAKE,	RVLERYLLEAKEA,	LERYLLEAKEAEN,	ERYLLEAKEAENI,
RYLLEAKEAENIT,	YLLEAKEAENITT,	LEAKEAENITTGC,	KEAENITTGCAEH,
ENITTGCAEHCSL,	CSLNENITVPDTK,	NENITVPDTKVNF,	ENITVPDTKVNFY,
NITVPDTKVNFYA,	ITVPDTKVNFYAW,	TKVNFYAWKRMEV,	VNFYAWKRMEVQG,
NFYAWKRMEVGGQ,	YAWKRMEVGGQAV,	KRMEVGGQAVEVW,	RMEVGGQAVEVWQ,
MEVGGQAVEVWQG,	QAVEVWQGLALLS,	AVEVWQGLALLSE,	VEVWQGLALLSEA,
EVWQGLALLSEAV,	VWQGLALLSEAVL,	WQGLALLSEAVLR,	QGLALLSEAVLRG,
LALLSEAVLRGQA,	ALLSEAVLRGQAL,	LSEAVLRGQALLV,	SEAVLRGQALLVN,
EAVLRGQALLVNS,	AVLRGQALLVNSS,	QALLVNSSQPWEP,	ALLVNSSQPWEPL,
LLVNSSQPWEPLQ,	QPWEPLQLHVDKA,	EPLQLHVDKAVSG,	LQLHVDKAVSGLR,
LHVDKAVSGLRSL,	KAVSGLRSLTLL,	SGLRSLTLLRAL,	RSLTLLRALGAQ,
SLTLLRALGAQK,	TLLRALGAQKEA,	TLLRALGAQKEAI,	RALGAQKEAISPP,
AQKEAISPPDAAS,	EAISPPDAASAAP,	SPPDAASAAPLRT,	ASAAPLRTITADT,
APLRTITADTFRK,	RTITADTFRKLFK,	TITADTFRKLFKV,	DTFRKLFKVYSNF,
RKLFKVYSNFLRG,	KLFKVYSNFLRGK,	FRVYSNFLRGKGLK,	RVYSNFLRGKGLK,
YSNFLRGKGLKLYT,	SNFLRGKGLKLYTG,	NFLRGKGLKLYTGE,	RGKGLKLYTGEACR,
GKGLKLYTGEACRT,	LKLYTGEACRTGD,	KLYTGEACRTGDR	

Замены, приводящие к исключению потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов эритропоэтина человека (ЕРО) (WT = дикий тип).

Остаток #	WT остаток	Замены												
5	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
6	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
11	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
12	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
15	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
16	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
17	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
25	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
35	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
39	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
41	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
46	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
48	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
49	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
51	W	A	C	D	E	G	H	K	M	P	Q	R	S	T
54	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
56	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
61	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
63	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
64	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
67	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
69	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
70	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
74	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
75	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
80	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
81	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
82	N	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
88	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
91	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
93	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
95	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
99	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
102	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
105	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
108	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
109	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
112	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
119	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
130	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
133	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
138	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
141	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
142	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
144	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
145	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
148	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
149	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
153	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
155	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
156	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

ПРИМЕР 6: Деиммунизированная форма G-CSF

Настоящее изобретение предоставляет модифицированные формы колониестимулирующего гранулоцитарного фактора человека (G-CSF) с одним или более удаленными Т-лимфоцитарными эпитопами. G-CSF - важный гемопозитический цитокин, в настоящее время используемый для назначения в случаях, в которых показано увеличение нейтрофилов крови. Они включают

терапию рака, различных инфекционных болезней и связанных с ними состояний, таких как сепсис. G-CSF используется также самостоятельно или в комбинации с другими средствами и цитокинами в экспансии кроветворных клеток *ex vivo* для трансплантации костного мозга.

Две формы G-CSF человека обычно различают для этого цитокина. Один - белок из 177 аминокислот, другой - белок из 174 аминокислот [Nagata и другие. (1986), EMBO J. 5: 575-581]; было найдено, что 174-аминокислотная форма имеет наиболее специфическую биологическую активность *in vivo*. Методы рекомбинантной ДНК сделали возможным производство G-CSF в промышленном масштабе с использованием систем экспрессии как эукариотических, так и прокариотических клеток - хозяев. Это особенно относится к обеим различаемым формам человеческого белка G-CSF, являющимся 177-аминокислотной разновидностью и 174-аминокислотной разновидностью.

Другие полипептидные аналоги и фрагменты пептида G-CSF были раскрыты ранее, включая формы, модифицированные сайт-специфичными заменами аминокислот и/ или модификацией химическими аддуктами. Таким образом, US 4,810,643 описывает аналоги с остатками Cys, частично замененные другой аминокислотой, и G-CSF с остатком Ala в первом (N-концевом) положении. EP 0 335 423 описывает изменение, по крайней мере, одной аминокислоты в полипептиде, имеющем G-CSF активность. EP 0 272 703 раскрывает производные G-CSF, имеющие аминокислоты, замененные или удаленные около N-конца. EP 0 459 630 описывает производные G-CSF, в которых Cys 17 и Asp 27 заменены остатками Ser. EP 0 243 153 раскрывает G-CSF, модифицированный посредством инактивации, по крайней мере, одного активного центра дрожжевой протеазы KEX2 для увеличения выработки рекомбинантной продукции, а US 4 904 584 раскрывают лизин-измененные белки. WO 90/12874 раскрывает дальнейшие Cys-измененные варианты, а австралийский патентный документ AU 10948/92 раскрывает добавление аминокислот к любому из концов молекулы G-CSF с целью благоприятствования укладки молекулы после прокариотической экспрессии. Дальнейший австралийский документ, AU 76380/91, раскрывает варианты G-CSF в положениях 50-56 в G-CSF содержащем 174 аминокислотных остатка и в

положениях 53-59 для 177- аминокислотной формы. Дополнительные изменения в отдельных остатках His были также раскрыты.

Недеиммунизированный Fc-G-CSF известен, например, из WO 99/58662. Специфические формы Fc-G-CSF: Fcγ1- G-CSF, Fcγ2- G-CSF, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным доменом Fc, имеющим пониженное сродство к рецепторам Fc.

Пептидные последовательности в колониестимулирующем гранулоцитарном факторе человека (G-CSF) с потенциальной способностью связывать МНС класса II человека

TPLGPASSLPQSF,	SSLPQSFLKCLE,	QSFLKCLEQVRK,	SFLKCLEQVRKI,
FLLKCLEQVRKIQ,	KCLEQVRKIQGDG,	EQVRKIQGDGAAL,	RKIQGDGAALQEK,
AALQEKLVSECAT,	EKLVSECATYKLC,	KLVSECATYKLCH,	AALQEKLCATYKL,
EKLCATYKLCHPE,	ATYKLCHPEELVL,	YKLCHPEELVLLG,	EELVLLGHSLGIP,
ELVLLGHSLGIPW,	HSLGIPWAPLSSC,	IPWAPLSSCPSQA,	APLSSCPSQALQL,
QALEGISPELGPT,	GCLSQLHSGFLY,	SQLHSGFLYQGL,	SGLFLYQGLLQAL,
GLFLYQGLLQALE,	LFLYQGLLQALEG,	FLYQGLLQALEGI,	QGLLQALEGISPE,
GLLQALEGISPEL,	QALEGISPELGPT,	EGISPELGPTLDT,	PTLDTLQLDVADF,
DTLQLDVADFATT,	LQLDVADFATTIW,	LDVADFATTIWQQ,	TTIWQQMEELGMA,
TIWQQMEELGMAP,	QQMEELGMAPALQ,	EELGMAPALQPTQ,	LGMAPALQPTQGA,
PALQPTQGAMPAF,	GAMPAFASAFQRR,	PAFASAFQRRAGG,	SAFQRRAGGVLVA,
GGVLVASHLQSF,	GVLVASHLQSFLE,	VLVASHLQSFLEV,	SHLQSFLEVSYRV,
QSFLEVSYRVLRH,	SFLEVSYRVLRLH,	LEVSYRVLRHQAQ,	

Замены, приводящие к исключению потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов колониестимулирующего гранулоцитарного фактора человека (G-CSF) (WT = дикий тип).

Остаток #	WT остаток	Замены												
		A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
3	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
9	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
14	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
15	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
18	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
21	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
24	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
31	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
35	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
39	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
41	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
47	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
48	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
49	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
50	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
54	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
56	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
58	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
61	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
69	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
71	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
75	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
78	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
82	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
83	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

Остаток #	WT остаток	Замены												
		A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
84	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
85	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
5 88	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
89	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
92	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
95	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
99	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
103	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
10 106	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
108	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
110	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
113	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
117	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
118	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
15 121	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
124	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
130	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
137	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
140	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
144	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
20 151	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
152	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
153	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
157	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
160	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
161	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
25 163	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

ПРИМЕР 7: Деиммунизированные формы KGF

Существующее изобретение предусматривает модифицированные формы фактора роста кератиноцита (KGF) человека с удаленным одним или больше Т-клеточным эпитопом. KGF является членом семейства белков фактора роста фибробласта (FGF) / гепарин-связывающего фактора роста. Это - секретируемый гликопротеин, экспрессируемый преимущественно в легком, поддерживая заживление мелких ран, стимулируя рост кератиноцитов и других эпителиальных клеток [Finch et al (1989), Science 24: 752-755; Rubin et al (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 802-806]. Зрелая форма гликопротеина содержит 163 аминокислотных остатка и может быть выделена из культуральной среды, во время культивирования специфических линий клетки [Rubin et al, (1989) там же.], или получают, применяя рекомбинантные методы [Ron et al (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988. Белок имеет лечебно-профилактическое значение для стимуляции роста эпителиальных клеток при многих серьезных заболеваниях и назначается для репарации повреждений. Это открытие в особенности касается KGF белка человека, содержащего в зрелой (преобразованной) форме 163 аминокислотных остатков.

Другие способы обеспечивают молекулы KGF [например, US, 6 008 328; WO 90/08771;] включая модифицированные KGF [Rop и др. (1993) там же; WO 95/01434] но

5

Специфические формы Fc- KGF: Fcγ1- KGF, Fcγ2- KGF, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом и, выборочно, модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродство к Fc-рецепторам.

10

Пептидные последовательности фактора роста кератиноцитов (KGF) человека с потенциальной активностью связываться с молекулами MHC класса II человека.

15

NDMTPEQMATNVN, RSYDMEGGDIRV, IRVRRLLFCRTQWY, QWYLRIDKRGKVK, QEMKNNYNIMEIR, MEIRTVAVGIVAI, VAIKGVESEFYLA, FYLAMNKEGKLYA, CNFKELILENHYN, NHYNTYASAKWTH, EMFVALNQKGIPV, IPVRGKKTKEQK,	DMTPEQMATNVNC, YDMEGGDIRVRR, RRLFCRTQWYLRI, WYLRIDKRGKVKG, NNYNIMEIRTVAV, RTVAVGIVAIGV, KGVSESEFYLAMNK, LAMNKEGKLYAKK, KELILENHYNNTYA, NTYASAKWTHNGG, FVALNQKGIPVRG, KTKKEQKTAHFLP	EQMATNVNCSSPE, DYMEGGDIRVRRL, RLFCRTQWYLRID, LRIDKRGKVKGTQ, YNIMEIRTVAVGI, VAVGIVAIGVES, SEFYLAMNKEGKL, GKLYAKKECNEDC, ELILENHYNNTYAS, AKWTHNGGEMFVA, VALNQKGIPVRGK,	TNVNCSSPERHTR, GDIRVRRLLFCRTQ, TQWYLRIDKRGKV, GKVKGTQEMKNNY, NIMEIRTVAVGIV, VGIVAIGVSESEF, EFYLAMNKEGKLY, KLYAKKECNEDCN, LILENHYNNTYASA, GEMFVALNQKGIP, KGIPVRGKKTKEK,
---	---	--	--

25

Замены, приводящие к исключению потенциальных T-лимфоцитарных эпитопов фактора роста кератиноцита (KGF) человека (WT = дикий тип)

30

35

40

45

50

Остаток #	WT остаток	Замены												
5	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
10	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
14	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
26	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
28	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
29	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
34	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
36	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
39	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
40	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
45	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
46	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
47	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
49	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
55	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
61	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
65	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
67	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
68	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
70	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
73	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
75	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
77	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
78	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
80	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
83	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
87	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
88	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
89	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T
91	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T

Остаток #	WT остаток	Замены													
97	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
98	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
109	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
112	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
113	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
114	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
118	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
121	Y	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
126	W	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
133	M	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
134	F	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
135	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
137	L	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
142	I	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	
144	V	A	C	D	E	G	H	K	N	P	Q	R	S	T	

Пример 8: Деиммунизированный ингибитор sTNF-R (I) и sTNF в пределах соответствующих Fc- сшивок

Ингибиторы Fc-sTNF-R (I) и Fc-sTNF - сшитые белки, в которых серологический период полураспада расширен по сравнению с самими ингибиторами sTNF-R (I) и sTNF. Однако, некоторые формы Fc-TNF-RI, такие, где Fc получены из IgG1 или IgG3 человека, способны демонстрировать повышенную иммуногенность при некоторых обстоятельствах, таких как применение для подкожной инъекции. Настоящее изобретение обеспечивает модифицированные растворимые формы рецептора типа I фактора некроза опухоли (sTNF-RI) с одним или более удаленными T-лимфоцитарными эпитопами.

sTNF-RI (растворимый рецептор типа I фактора некроза опухоли) является производным рецептора фактора некроза опухоли человека, ранее описан [Smith, С.А. и др., (1990) *Science* 248: 1019-1023; Kohno, Т. и др., (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8331-8335; Beltinger, С.Р. и др. (1996) *Genomics* 3_5:94-100], включает в себя внеклеточный домен интактного рецептора и имеет молекулярную массу приблизительно 30KDa. Известны также и другие дополнительные растворимые ингибиторы TNF, в особенности, его форма 40KDa [US 6 143 866]. Растворимые формы способны связывать с высоким сродством альфа фактор некроза опухоли и ингибировать *in vitro* цитотоксическую активность цитокина. Рекомбинантные препараты sTNF-RI имеют значительную терапевтическую ценность для лечения болезней, где избыточный уровень фактора некроза опухоли вызывает патогенный эффект. Такие показания как, например, кахексия, сепсис, аутоиммунные и другие нарушения, включая, в частности, ревматоидный артрит могут быть мишенью для терапевтического

воздействия препаратами sTNF-RI. Другие, включая Brewer и др., US, 6,143,866, обеспечили модифицированные молекулы sTNF-RI

5 Пептидные последовательности 30KDa sTNF-RI человека с потенциальной активностью связываться с молекулами MHC класса II человека:

DSVCPQGKYIHPO, YLYNDPCPGPGQDT, GQVEISSCTVDRD, 10 NQYRHYWSENLFQ, NLFQCFNCSLCLN, GTVHLSCQEKQNT, GFFLRENECVSCS, TKLCLPQIENVKKG,	KYIHPQNNISICT, NHLRHCLSCSKCR, VEISSCTVDRDRTV, RHYWSENLFQCFN, QCFNCSLCLNGTV, VHLSCQEKQNTVC, FFLRENECVSCSN, LCLPQIENVKGTGTE,	NSICCTKCHKGTY, HCLSCSKCRKEMG, CTVDRDTCGCRK, HYWSENLFQCFNC, CSLCLNGTVHLSC, EKQNTVCTCHAGF, ECVSCSNCKKSLE, PQIENVKGTEDSG,	TYLYNDPCPGPGQD, KEMGQVEISSCTV, DTCGCRKNQYRH, ENLFQCFNCSLCL, LCLNGTVHLSCQE, NTVCTCHAGFFLR, KSLECTKLCLPQI, SGTTVLLPLVIFV
---	---	---	---

15 Пептидные последовательности в ингибиторе 40KDa sTNF человека с потенциальной активностью связываться с молекулами MHC класса II человека:

ТРУАРЕРРРSTCRL, AQMCCSKCSPGQH, 20 STYTQLWNWVPEC, ECLSCGSRCSDDQ, NRICTCRPGWYCA, APLRKCRPGFGVA, GTFSNNTSSTDIC, CNVVAIPGNASRD, TRSMAPGAVHLPQ, 25 PEPSTAPSTSFLI,	CRLREYYDQTAQM, KCSPGQHAKVFCT, TQLWNWVPECLSC, SRCSSDQEVTVQAC, PGWYCALSKQEGC, PGFGVARPGTETS, TDICRPHQICNVV, NVVAIPGNASRDA, RSMAPGAVHLPQP, SFLPMGSPSPAEG,	REYYDQTAQMCCS, AKVFCTKTSDTV, QLWNWVPECLSCG, QEVTVQACTREQNR, GWYCALSKQEGCR, FGVARPGTETSDV, HQICNVVAIPGNA, VAIPGNASRDAVC, VHLPQVSTRSQH, FLLPMGSPSPAEG	EYYDQTAQMCCSK, KVFCTKTSDTVCD, NWVPECLSCGSR, QNRICTCRPGWYC, CALSKQEGCRLCA, SDVVCKPCAPGTF, ICNVVAIPGNASR, DAVCTSTTTPTRS, QPVSTRSQHTQPT,
---	---	--	---

ПРИМЕР 9 (растворимый TNF-R2):

30 Fc-sTNF-R2 являются сшитыми белками, в которых серологический период полураспада расширен по сравнению с собственно sTNF-R2. Однако, некоторые формы Fc-TNF-R2, такие, где Fc является производным IgG1 или IgG3 человека, способны демонстрировать повышенную иммуногенность при некоторых
35 обстоятельствах, таких как применение для подкожной инъекции.

Растворимый рецептор 2 фактора некроза опухоли (sTNF-R2) является производным человеческого рецептора 2 фактора некроза опухоли описанного ранее [Smith, C.A. и др., (1990) *Science* 248: 1019-1023; Kohno, T. и др., (1990)
40 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8331-8335; Beltinger, C.P. и др., (1996) *Genomics* 35: 94-100], содержащий внеклеточный домен интактного рецептора.

45 Растворимые формы способны связывать фактор некроза опухоли с высокой аффинностью и ингибировать цитостатическую деятельность цитокина *in vitro*.
Рекомбинантные препараты sTNF-R2 имеют значительную терапевтическую ценность для лечения болезней, где избыточный уровень фактора некроза
50 опухоли причиняет патогенный эффект. Специфический рекомбинантный препарат названный этанерцепт (etanercept), получил клиническое одобрение

для лечения ревматического артрита, и этот и другие подобные агенты могут быть полезными при лечении других показаний, таких как кахексия, сепсис и аутоиммунные нарушения. Этанерцепт - димерный белок слияния содержащий 5
внуклеточный домен молекулы TNFR2 человека в комбинации с Fc доменом молекулы IgG1 человека. Димерная молекула включает 934 аминокислоты [US, 5,395,760; US, 5,605,690; US, 5,945,397].

10 Белковые последовательности в связующем TNF домене белка TNFR2 человека с потенциальной активностью связывания MHC класса II человека:

ТРУАРЕРРРРРРРР, CRLREYYDQTAQM, REYYDQTAQMCCS, EYYDQTAQMCCSK,
AQMCCSKCSPGQH, KCSFGQNAKVFCT, AKVFCTKTSDTV, KVFCTKTSDTVCD,
15 STYTQLWNWVPEC, TQLWNWVPECLSC, QLWNWVPECLSCG, NWVPECLSCGSRG,
ECLSCGSRGSSDQ, SRCSSDQEVTAQ, QEVTAQACTREQNR, QNRICRCRPGWYC,
NRICRCRPGWYCA, PGWYCALSKQEGC, GWYCALSKQEGCR, CALSKQEGCRLCA,
APLRKCRPGFGVA, PGFGVARPGTETS, FGVARPGTETSDV, SDVVCKPCAPGTF,
20 GTFSNTTSSDTC, TDICRPHQICNVV, HQICNVVAIPGNA, ICNVVAIPGNASR,
CNVVAIPGNASRD, NVVAIPGNASRDA, VAIPGNASRDAVC, DAVCTSTTTPTRS,
TRSMAPGAVHLPQ, RSMAPGAVHLPQP, VHLPQPVSTRSQH, QPVSTRSQHTQPT,
PEPSTAPSTSFL, SFLPMGSPPAE, FLLPMGSPPAEG

25 ПРИМЕР 10: Неприродные формы Бета-Глюкоцереброзидазы (β -GCR)

Fc- β -GCR являются шитыми белками, в которых серологический период полураспада расширен по сравнению с собственно β -GCR. Однако, некоторые 30
формы Fc - β -GCR, такие, где Fc является производным IgG1 или IgG3 человека, обладают потенциалом показывать увеличенную иммуногенность при некоторых обстоятельствах, таких как подкожное введение. Настоящее изобретение 35
обеспечивает модифицированные формы человеческого GCR, предпочтительно Fc- β -GCR, с одним или более удаленными T-лимфоцитарными эпитопами

Бета-Глюкоцереброзидаза (b-D-глюкозил-N-ацилсфингозин 40
глюкогидролаза, E.C. 3.2.1.45) представляет собой мономерный гликопротеин состоящий из 497 аминокислотных остатков. Фермент является катализатором гидролиза гликолипида глюкоцереброзида на глюкозу и церамид. Недостаток активности GCR проявляется в виде болезни лизосомного накопления, известной 45
как болезнь Гауше (Gaucher disease). Болезнь характеризуется накоплением глюкоцереброзида, поглощаемого макрофагами ткани, которые скапливаются в печени, селезенке, костном мозге и других органах. Болезнь обладает различной 50
степенью тяжести, от типа 1, болезни с гематологическими проблемами, но без вовлечения нервной системы, до типа 2, болезни, проявляющейся сразу после

рождения с экстенсивным вовлечением нервной системы, очень прогрессирующей и заканчивающейся фатально в 2-х летнем возрасте. В некоторых классификациях также признан третий тип заболевания, который также характеризуется нейрональным поражением. Раньше, единственной дееспособной терапией болезни Гауше было применение GCR, полученной из человеческой плаценты (известной как аглуцераза), но в последнее время появился фармацевтический препарат рекомбинантной GCR ("Ceredase" и "Cerezyme"), который доказал свою эффективность при лечении болезни типа I [Niederau, С. и др. (1998) *Eur. J. Med. Res.* 3: 25-30].

В соответствии с изобретением, определенные коммерческие формы гликоцереброзидазы исследованы, им предсказано чрезвычайно иммуногенные свойства, так как эти формы разработаны с высоким содержанием олигосахарида маннозы. При введении такого белка, как Ceredase или Cerezyme, не природного происхождения, белок предпочтительно связывается с рецепторами маннозы на антиген-представляющих клетках, таких как макрофаги или дендритические клетки. Белок не природного происхождения затем поглощается, часть его разлагается до пептидов, а пептиды доставляются МНС класс II на Т-лимфоцитарный рецептор. После мутации последовательности гликоцереброзидазы, что получаемые пептиды не могут связываться с МНС класса II, иммуногенность снижается. Другие предлагают GCR молекулы, включая модифицированные GCR [US,5,236,838], но это учение не придает значения важности Т-лимфоцитарных эпитопов к иммуногенным свойствам белка.

Белковые последовательности GCR человека с потенциальной активностью связывания МНС класса II человека:

PCIPKSFYSSVV,	KSGFYSSVVCVNC,	FGYSSVVCVNCAT,	SSVVCVNCATYCD,	SVVCVNCATYCDs,
VCVNCATYCDSPD,	ATYCDSPDPPTFP,	DSFDPPTFPALGT,	PTFPALGTFSRYE,	PALGTFSRYESTR,
GTFSRYESTRSGR,	SRYESTRSGRRME,	GRRMELSMGPIQA,	RRMELSMGPIQAN,	RMELSMGPIQANH,
MELSMGPIQANHT,	LSMGPIQANHTGT,	MGPIQANHTGTGL,	GPIQANHTGTGLL,	TGLLTLQPEQKF,
GLLTLQPEQKFQ,	LLTLQPEQKFQK,	LTLQPEQKFQKVK,	TLQPEQKFQKVKG,	PEQKFQKVKGFGG,
QKFQKVKGFGGAM,	QKVKGFGGAMTDA,	KGFGGAMTDAAL,	GFGGAMTDAALN,	GAMTDAALNILA,
AMTDAALNILAL,	MTDAALNILALS,	AALNILALSPPAQ,	ALNILALSPPAQN,	LNILALSPPAQN,
NILALSPPAQNLL,	LALSPPAQNLLK,	ALSPPAQNLLKS,	PAQNLLKSYFSE,	AQNLLKSYFSEE,
QNLLKSYFSEEG,	NLLKSYFSEEGI,	LLKSYFSEEGIG,	KSYFSEEGIGYNI,	SYFSEEGIGYNI,
FSEEGIGYNIIRV,	EGIGYNIIRVPM,	GIGYNIIRVPMAS,	IGYNIIRVPMASC,	YNIIRVPMASCDF,
NIIRVPMASCDFS,	IIRVPMASCDFS,	IRVPMASCDFSIR,	VPMASCDFSIRTY,	PMASCDFSIRTYT,
SCDFSIRTYTYAD,	CDFSIRTYTYADT,	FSIRTYTYADTPD,	RTYTYADTPDDFQ,	TYTYADTPDDFQL,
YTYADTPDDFQLH,	ADTPDDFQLHMFS,	PDDFQLHNFSLPE,	DDFQLHNFSLPEE,	FQLHNFSLPEEDT,
HNFSLPEEDTKLK,	FSLPEEDTKLKIP,	SLPEEDTKLKIPL,	EEDTKLKIPLIHR,	TKLKIPLIHRALQ,
KLKIPLIHRALQL,	LKIPLIHRALQLA,	IPLIHRALQLAQR,	PLIHRALQLAQR,	IHRALQLAQRVSL,
RALQLAQRPVSL,	ALQLAQRPVSLLA,	LQLAQRPVSLAS,	RPVSLASPWTSP,	PVSLASPWTSP,
VSLASPWTSPTW,	SLLASPWTSPTWL,	SPWTSPWLKTNG,	TSPTWLKTNGAVN,	PTWLKTNGAVNGK,
TWLKTNGAVNGKG,	GAVNGKGLKQGP,	GSLKQPGDIYHQ,	GDIYQWTWARYFV,	DIYQWTWARYFVK,
QWTWARYFVKFLDA,	WARYFVKFLDAYA,	ARYFVKFLDAYAE,	RYFVKFLDAYAEN,	YFVKFLDAYAENK,
FVKFLDAYAENKL,	VKFLDAYAENKQL,	KFLDAYAENKQLF,	DAYAENKQLFWAV,	YAENKQLFWAVTA,
HKLQFWAVTAENE,	LQFWAVTAENEPS,	QFWAVTAENEPSA,	FWAVTAENEPSAG,	WAVTAENEPSAGL,

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p>	<p>VTAENEPSAGLLS, YFQCLGFTPEHQ, DFIARDLGPTLAN, VRLMLDDQRLLL, DQRLLLPHWAKVV, WAKVVLTDPAAK, AKYVHGIAVHWYL, VHWYLDFLAPAKA, AKATLGETHRLFP, HRLFPNTMLFASE, MLFASEACVGSKF, QSVRLGSWDRGMQ, RGMQYSHSIITNL, SIITNLLYHWGVV, HVVGWTDWNLALN, LALNPEGPNVWR, SPIIVDITKDTFY, TFYKQPMFYHLGH, GHFSKFIPEGSQR, VGLVASQKNDLDA, VALMHPDGS AVVV, VVVLRSSKD VPL, LTIKDP AVGFLET, ETISPGYSIHTYL,</p>	<p>PSAGLLSGYPFQC, QCLGFTPEHQ RDF, RDLGPTLANSTHH, RLMLDDQRLLLP, QRLLLPHWAKVVL, AKVVLTDPAAKY, KYVHGIAVHWYLD, HWYLDFLAPAKAT, ATLGETHRLFPNT, RLFPNTMLFASEA, ACVGSKFWEQSVR, VRLGSWDRGMQYS, MQYSHSIITNLLY, TNLLYHVVGWTDW, VVGWTDWNLALNP, PNVWRNFVDSPII, PIIVDITKDTFYK, QPMFYHLGHFSKF, SKFIPEGSQRVGL, GLVASQKNDLDAV, ALMHPDGS AVVVV, VVLNRSSKD VPLT, PAVGLETISPGY, PGYSIHTYLWHRQ,</p>	<p>AGLLSGYPFQCLG, LGFTPEHQ RDFIA, LGPTLANSTHHNV, LLMLDDQRLLLPH, RLLPHWAKVVLV, KVVLTDPEAAKYV, YVHGIAVHWYLD, WYLDFLAPAKATL, GETHRLFPNTMLF, GTHRLFPNTMLFA, NTMLFASEACVGS, GSKFWEQSVRLGS, RLGSWDRGMQYSH, QYSHSIITNLLYH, NLLYHVVGWTDWN, VGWTDWNLALNPE, NWVRNFVDSPIIV, PIVDITKDTFYKQ, PMFYHLGHFSKFI, KFIPEGSQRVGLV, SQKNDLDAVALMH, SAVVVVLNRSSKD, KD VPLTIKDP AVG, VGFLETISPGYSI, PGYSIHTYLWRRQ</p>	<p>GLLSGYPFQCLGF, FTPEHQ RDFIARD, PTLANSTHHNVRL, LMLDDQRLLLPHW, LLLPHWAKVVLTD, VVLTDPAAKYVH, HGIAVHWYLDFLA, LDFLAPAKATLGE, ETHRLFPNTMLFA, NTMLFASEACVGS, SKFWEQSVRLGSW, GSWDRGMQYSHSI, YSHSIITNLLYHV, LLYHVVGWTDWNL, TDWNLALNPEGGP, RNFVDSPIIVDIT, VDITKDTFYKQPM, MFYHLGHFSKFI, IPEGSQRVGLVAS, NDLDAVALMHPDG, AVVVVVLNRSSKD V, VPLTIKDP AVGFLE, GFLETISPGYSIH,</p>	<p>SGYFPQCLGFTPE, RDFIARDLGPTLA, HNVRLMLDDQRL, DDQRLLLPHWAKV, PHWAKVVLTDPEA, EAAKYVHGIAVHW, IAVHWYLDFLAPA, DFLAPAKATLGET, THRLFPNTMLFAS, TMLFASEACVGSK, KFWEQSVRLGSWD, WDRGMQYSHSIIT, HSIITNLLYHVVG, YHVVGWTDWNLAL, WNLALNPEGPNW, NFVDSPIIVDITK, DTFYKQPMFYHLG, YHLGHFSKFIPEG, QRVGLVASQKNDL, DAVALMHPDGS AV, VVVVLNRSSKD V, PLTIKDP AVGFLE, FLETISPGYSIHT,</p>
------------------------------	--	--	---	--	---

ПРИМЕР 11: Деиммунизированные формы Fc-IL2

20 Недеиммунизированный Fc-IL2 был описан, например, в патенте WO 96/08570. Специфические деиммунизированные формы Fc-IL2: Fc γ 1-EL2 , Fc γ 2-IL2, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом, и выборочно
25 модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 12: Деиммунизированные формы Fc-IL12

30 Недеиммунизированный Fc-IL12 был описан, например, в патенте WO 99/29732. Специфические деиммунизированные формы Fc-IL12: Fc γ 1- IL12 , Fc γ 2- IL12, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом, и выборочно
35 модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 13: Деиммунизированные формы Fc-TNF α

40 Недеиммунизированный Fc- TNF α был описан, например, в патенте WO 99/43713. Специфические деиммунизированные формы Fc-TNF α : Fc γ 1- TNF α , Fc γ 2- TNF α , обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом, и выборочно
45 модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 14: Деиммунизированные формы Fc-GM-CSF

50 Недеиммунизированный Fc-GM-CSF был описан, например, в патентах: WO 99/43713 и WO 01/07081. Специфические деиммунизированные формы Fc- GM-CSF: Fc γ 1-GM-CSF , Fc γ 2-GM-CSF, обе формы, предпочтительно со линкерным

пептидом, и выборочно модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 15: Деиммунизированные формы Fc-subtilisin

5 Специфические деиммунизированные формы Fc-субтилизина: Fc γ 1-субтилизин, Fc γ 2-субтилизин, обе формы, предпочтительно со линкерным пептидом, и выборочно модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 16: Деиммунизированные формы Fc-инсулин

15 Специфические деиммунизированные формы Fc- инсулина: Fc γ 1- инсулин, Fc γ 2- инсулин, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом, и выборочно модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 17: Деиммунизированные формы Fc-PSMA

20 Недеиммунизированный Fc- PSMA был описан, например, в патентах: WO 96/08570 и WO 01/0708. Специфические деиммунизированные формы Fc- PSMA: Fc γ 1- PSMA , Fc γ 2- PSMA, обе формы, предпочтительно с линкерным пептидом, и выборочно модифицированным Fc доменом, имеющим пониженное сродством к Fc-рецепторам.

ПРИМЕР 18:

30 Деиммунизированные объединенные протеины содержащие антитела анти-EGFR пришитые к цитокину.

Гуманизированное и мышинное или крысиное моноклональное антитело 425 (hMAb 425, US 5,558,864; EP 0531 472), мышинное или крысиное и химерное моноклональное антитело 225 (сMAb 225, US 4,943,533 и EP 0359 282) и мышинное или крысиное и гуманизированное MAб 4D5 (hMab 4D5 = Herceptin®) были деиммунизированны, в соответствии с изобретением, и сшиты к де-иммунизированному IL2, или не-модифицированному IL2. Сшивка антител к цитокининам представляет собой ситуацию, когда необходимость уменьшить иммуногенность особенно велика. Обычно, терапевтические антитела могут индуцировать анти-идиотипные антитела, которые нейтрализуют эффективность терапевтических антител. Это действительно бывает так, когда терапевтическое антитело вводится в малых или средних количествах, что является противоположностью очень высоким дозам, когда может быть достигнут допустимый предел. Например, терапевтические антитела Herceptin и Rituxan

обычно назначаются в больших дозах, несколько сотен миллиграммов. Напротив, сшитое антитело-цитокин обычно даются в дозах на порядок меньших, в несколько миллиграммов. Таким образом, доза сшивки антитело-цитокин лежит в пределах, имеющих тенденцию вызывать формирование антител анти-идиотипа. Наличие сопряженного цитокина имеет тенденцию чрезмерно увеличивать иммуногенность уже иммуногенных антител. Антитело 425 - нечеловеческое антитело, которое направлено к антигену EGF-R и взаимодействует с раковыми клетками ободочной кишки. Это антитело было сшито с IL-2, как описано в Примере 13. Присутствие IL-2 или другого цитокина усиливает иммуногенность антитела, в частности, в вариабельной области.

В данных параграфах изобретение описано более детально, для конструкции моноклонального анти-EGFR антитела 425-IL2, которое, как было показано, обладает высоким терапевтическим действием. Однако изобретение не ограничено этим антителом, названной конструкцией и ее несколькими существующими формами, но может распространяться и на другие anti-EGFR антитела и их сшитые конструкции, предпочтительно на сшивку цитокина с иммуноглобулинами, прежде всего на химерное антитело 225 (с225-II-2), который имеет очень похожие свойства.

В принципе, нечеловеческая, химерная или гуманизированная версия анти-EGFR антител может быть использована для синтеза вышеупомянутых IL-2 сшитых молекул. Если не заявлено иначе, то все молекулы в вариабельных тяжелых и легких цепях пронумерованы как у Kabat и др., 1991 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services). Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы, пронумерованы линейно, начиная от первой аминокислоты эпитопа, начиная с первой аминокислоты тяжелой и легкой цепи.

1. Сравнение со структурами мышинной подгруппы.

Аминокислотная последовательность мышинной или крысиной 425 VH (тяжелая цепь) и VK (легкая цепь) сравнивалась с общепринятой последовательностью тяжелых и легких цепей по Kabat для мышинной или крысиной подгрупп. 425 VH может быть отнесена к мышинной тяжелоцепочной подгруппе IIВ. Сравнение с общепринятой последовательностью для этой подгруппы показало, что серин в положении 94 в 425 VH, является необычным. Наиболее часто встречающийся остаток в данном положении, это аргинин. 425

VK 425 VH может быть отнесена к мышинной каппа цепочной подгруппе VI. Сравнение с общепринятой последовательностью для этой подгруппы показало, что остатки в положениях 45 - 47, 60 и 100 в 425 VK являются необычными для этой подгруппы. Аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с данными Kabat.

2. Сравнение с человеческими структурами.

Аминокислотные последовательности мышинной или крысиной 425 VH (изменяемая тяжелая цепь) и VK (изменяемая легкая цепь каппа) сравнивались с последовательностями линий зародышевых клеток человека VH (Tomlinson, I.M и др., (1992) J. Mol.Biol. 227: 776-798) и VK последовательностями (Cox, J.P.L. и др., (1994) Eur. J. Immunol. 24:827-836), а так же с последовательностью области J линий зародышевых клеток человека (Routledge, E.G. и др., в, *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man*, Clark, M. изд. Academic Titles, Nottingham, UK, сс.13-44, 1991). Последовательность 425 у грызунов для тяжелой, и легкой цепей, может быть взята, например из EP 0531472.

Эталонной человеческой структурой, выбранной для 425 VH был VH1GRR с человеческим JH6. Последовательность VH1GRR в справочнике заканчивается на 88 остатке. Поэтому нет соответствующего остатка для необычно встречающегося серина в 94 положении последовательности грызунов. Эта последовательность линии зародышевых клеток человека была найдена в реконструированном зрелом антителе гена с 4 аминокислотными изменениями. Эталонной человеческой структурой, выбранной для 425 VK была L6/vg с человеческим JK2. Эта последовательность линии зародышевых клеток человека была найдена в преобразованном зрелом антителе тяжелой цепи без аминокислотных изменений.

3. Проектирование "венированных" последовательностей

Вслед за идентификацией эталонных последовательностей человеческой структуры, некоторые неидентичные остатки аминокислот в структурах 425 VH и VK были изменены на соответствующие аминокислоты в эталонных последовательностях человеческой структуры. Остатки, которые рассматриваются как критические для структуры антитела и связывания, были исключены из этого процесса и не изменялись. Мышиные или крысиные остатки, которые сохранились на этой стадии, являются в значительной мере не

поверхностными, скрытыми остатками, в отличие от остатков возле N конца, например, которые близки к CDR в окончательном антителе (1-8, предпочтительно 1-5 аминокислотных остатка)

Этот процесс дает последовательность, которая грубо напоминает «венированное» антитело, в котором поверхностные остатки в основном человеческие, а скрытые остатки такие же, как в оригинальной последовательности грызунов.

4. *Фрагментарный анализ пептида.*

Мышиные и венированные последовательности 425 VH и VK анализировались, используя метод согласно изобретению. Аминокислотные последовательности разделялись на все возможные 13- мерные пептиды последовательно представлялись моделям связывающей бороздки аллотипов HLA-DR и каждому пептиду назначалась степень связывания для каждой аллели. Рассчитывается конформационный показатель для каждой связанной в кармане боковой цепи пептида. Этот показатель основан на стерическом перекрытии, потенциальных водородных связях между пептидом и остатками в связывающей бороздке, электростатических взаимодействиях и благоприятствующих контактах между остатками пептида и кармана. Конформация каждой боковой цепи затем изменяется и показатель пересчитывается. После определения наивысшего конформационного показателя, затем высчитывается степень связывания, основываясь на связанных в бороздках гидрофобных остатках, гидрофильных остатках вне бороздки и количестве остатков, которые попадают в связывающую бороздку. Пептиды, которые, как известно, связываются с MHC класса II человека, достигают высокой степени связывания почти без ошибок. Таким образом, пептиды, которые достигают значительной степени связывания в текущем анализе, рассматриваются как потенциальные T-лимфоцитарные эпитопы. Результаты фрагментарного анализа пептида показаны в Таблице 1 для 425 VH и 425 VK. Потенциальные T-лимфоцитарные эпитопы отнесены к порядковому номеру первого остатка 13-мера.

Таблица 1. T-лимфоцитарные эпитопы у грызунов и венированных 425 последовательностей.

Последовательность	Количество потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов	Номер первого остатка 13 мера и количеством связанных аллелей в скобках
Грызуны 425 VH	8	31(7), 35(17), 43(7), 46(8), 58(10), 62(12), 81(11), 84(16)
Венированные 425 VH	7	31(7), 43(7), 46(8), 58(10), 62(11), 81(11), 84(16)
Грызуны 425 VK	9	1(8), 2(5), 17(5), 27(5), 43(16), 72(18), 75(10), 92(10), 93(17)
Венированные 425 VK	4	27(5), 43(16), 92(8), 93(17)

5. Удаление потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов.

Аминокислотные остатки для замены пронумерованы как в Kabat.

Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы указаны линейным номером первого остатка тринадцатимера.

Аминокислотные замены, необходимые для удаления потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов из венированного 425 варибельной области тяжелой цепи следующие:

- Замещение пролина на аланин в остатке 41 (Kabat номер 41) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 31.

- Замещение пролина на лейцин в остатке 45 (Kabat номер 45) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 43. Пролин в положении 45 был найден в последовательности линий зародышевых клеток человека VH, DP52.

- Замещение аланина на изолейцин в остатке 48 (Kabat номер 48) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 46.

- Замещение валина на аланин в остатке 68 (Kabat номер 67) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 58.

- Замещение изолейцина на лейцин в остатке 70 (Kabat номер 69) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 62.

- Замещение треонина на серин в остатке 91 (Kabat номер 87) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 81 и 84.

Аминокислотные замены, необходимые для удаления потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов из венированного 425 варибельной области легкой цепи следующие:

- Замещение гистидина на тирозин в остатке 35 (Kabat номер 36) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 27.

• Замещение аланина на треонин в остатке 50 (Kabat номер 51) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 43. Этот остаток внутри CDR2. Аланин обычно находят в этом положении в антителах человека и грызунов.

Альтернативное замещение для удаления этого эпитопа – замена аланина на лейцин в положении 45 (Kabat номер 46). Отсутствует консервативное замещение, которое приводило бы к устранению потенциального эпитопа.

Аланин найден в этом положении в некоторых антителах Аланин был найден в этом положении в некоторых антителах.

• Замещение пролина на изолейцин в остатке 94 (Kabat номер 95) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 92. Kabat остаток 95 находится в CDRL3. Пролин обычно в этом положении в последовательностях антитела мыши и не существует замены вне CDR, которая устранила бы потенциальный эпитоп.

• Замещение валина на лейцин в остатке 103 (Kabat номер 104) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 93.

б. Разработка деиммунизированных последовательностей

Деиммунизируемые последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей были разработаны с учетом изменений, необходимых для удаления потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов и, с учетом структурных остатков, которые могли бы быть критичными для строения и связывания антитела. В дополнение к деиммунизированным последовательностям, которые основаны на «венированной» последовательности, была разработана дополнительная последовательность для каждого VH и VK, основанная на последовательности грызунов, определенная как «пронизанная» версия пептида мыши (Mo PT). Для этой версии непосредственно в мышинной последовательности были сделаны изменения, чтобы устранить Т-лимфоцитарные эпитопы, но изменения сделаны только вне CDR, которые, как полагают, не являются нежелательными для связывания. Никакой попытки по удалению поверхностных (В-лимфоцитарные) эпитопов не было сделано в этой версии деиммунизированной последовательности.

Первичный деиммунизированный VH включает замены 1 - 6 в вышеописанной Секции 5 и не включает никаких потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов. Дальнейшие 4 деиммунизированные последовательности VH были разработаны, чтобы проверить влияние различных необходимых замен на связывание антител. Кумулятивные изменения,

сделанные в первичной деиммунизированной последовательности (425 VH1GRR-VH-v1), и сохраняющиеся потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы детализированы в Таблице 2. Мышиная версия последовательности включена для сравнения.

Таблица 2: Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированном 425 VH

Вариант	Кумулятивные изменения остатка	Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы
425 VH1GRR-VH-v1	Отсутствуют	Отсутствуют
425 VH1GRR-VH-v2	48A → I	46(8)
425 VH1GRR-VH-v3	45P → L	43(7), 46(8)
425 VH1GRR-VH-v4	67V → A, 69I → L	43(7), 46(8), 58(10), 62(11)
425 VH1GRR-VH-V5	41P → A	31(7), 43(7), 46(8), 58(10), 62(11)
425 VH-МоРТ	NA	43(7), 46(8)

Первичный деиммунизированный VK включает замены 1 - 4 в вышеописанной Секции 5 и не включает никаких потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов. Дальнейшие 4 де-иммунизированные последовательности VK были разработаны, чтобы проверить влияние различных необходимых замен на связывание антител. Версия 2 – альтернатива Версии 1, в которой была использована альтернативная замена для удалений той же самой потенциальной Т-лимфоцитарной антигенной детерминанты. Кумулятивные изменения, сделанные в первичной деиммунизированной последовательности (425 L6-vg-VK-v1), и сохраняющиеся потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы детализированы в Таблице 3. Мышиная версия пептида включена для сравнения.

Таблица 3: Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированном 425 VK

Вариант	Кумулятивные изменения остатка	Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы
425 L6-vg-VK-v1	Отсутствуют	Отсутствуют
425 L6-vg-VK-v1	51 A → T, 46L → A	Отсутствуют
425 L6-vg-VK-v1	46 A → L	43(16)
425 L6-vg-VK-v1	95 P → I	43(16), 92(8)
425 L6-vg-VK-v1	36 H → Y	27(5), 43(16), 92(8)
425VK-МоРТ	NA	27(5), 43(16), 92(8)

Таблица 4: Первоначальные и «венированные» последовательности VH и VK мышинового Mab 425

425 VH мыши

5 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRAGQGLEWIGEFN
PSNGRRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYDG
RYFDYWGQGTTTLTVSS

10 425 VK мыши

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGSGTKLEIK

15 425 VH «венированный»

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKAAGQGLEWIGEFN
PSNGRRTNYNEKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYDG
RYFDYWGQGTTTLTVSS

20 425 VK «венированный»

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQQKPGQSPRLLIYDTSNLAS
GVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKLEIK

25 *Таблица 5: Деиммунизированные последовательности переменных тяжелой и легкой цепи Mab 425*

425 деиммунизированный VH1

30 QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGPEWAGEF
NPSNGRRTNYNEKFKSRVTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDG
RYFDYWGQGTTTLTVSS

35 425 деиммунизированный VK1

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRLLIYDASNLA
SGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

425 деиммунизированный VH2

40 QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGPEWIGEFN
PSNGRRTNYNEKFKSRVTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDGR
YFDYWGQGTTTLTVSS

45 425 деиммунизированный VK2

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQQKPGQSPRALIYDTSNLA
SGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

50 425 деиммунизированный VH3

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFN
 PSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKSTSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDGR
 YFDYWGQGTTTLTVSS

5 425 деиммунизированный VK3

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRLLIYDTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHPFTFGQGTKVEIK

10 425 деиммунизированный VH4

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFN
 PSNGRNTNYNEKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDG
 RYFDYWGQGTTTLTVSS

15 425 деиммунизированный VK4

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWHQKPGQSPRLLIYDTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

20 425 деиммунизированный VH5

QVQLVQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAAGQGLEWIGEFN
 PSNGRNTNYNEKFKSRATLTVDKSTSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDG
 RYFDYWGQGTTTLTVSS

25 425 деиммунизированный VK5

QIVLTQSPATLSASPGERATMSCSASSSVTYMYWYQKPGQSPRLLIYDTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

30 425 VH, последовательность пептида мыши (версия Mo PT)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQAPGQGLEWIGEFN
 PSNGRNTNYNEKFKSRVTITVDKSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYYCASRDYDYDGR
 YFDYWGQGTTTLTVSS

35 425 VK, последовательность пептида мыши (версия Mo PT)

QIVLTQSPATLSASPGEKATMTCSASSSVTYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
 GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRLEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIK

40 Как уже упомянуто, модифицированные конструкции антитело анти-EGFR-
 цитокин, предпочтительно Mab 425-II2, согласно изобретению, могут

45 использоваться в фармацевтических композициях и фармацевтических

средствах, предпочтительно для лечения рака. "Рак" и "опухоль" касаются или
 описывают физиологические состояния у млекопитающих, которое обычно

50 характеризуются нерегулируемым ростом клеток. С помощью фармацевтических
 композиций, согласно настоящему изобретению, могут лечиться опухоли, такие

как опухоли груди, сердца, легкого, тонкой кишки, ободочной кишки, селезенки, почки, пузыря, головы и шеи, яичника, простаты, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

5 По аналогии с антителом могут быть получены 425 сходных сшитых конструкций посредством использования моноклонального антитела 225 в мышинных, химерных или гуманизированных формах.

10 ПРИМЕР 19: Деиммунизированные формы антитела 14.18 - IL2 и KS-1/4 - IL2.

15 Цитокиновый интерлейкин 2 (IL-2) был сшит со специфическими моноклональными антителами KS-1/4 и ch14.18, направленными на связанные с опухолью антигены - адгезионную молекулу эпителиальных клеток (антиген Еp-CAM, KSA, KS1/4) и дисиаialogанглиозид GD, соответственно, с образованием сшитых белков ch14.18-IL-2 и KS1/4-IL-2, соответственно, (US 5 650 150, EP 0 20 338 767). Эти антитела были деиммунизированы согласно изобретению и сшиты с иммуногенно модифицированным IL-2 или немодифицированным IL-2.

Антитело анти-Еp-CAM KS1/4

25 Моноклональное антитело KS1/4 - мышинное антитело, которое специфически связывается с клеточным поверхностным антигеном ЕpCAM (адгезионная молекула эпителиальной клетки) массой 40 000 дальтон, найденным в больших количествах на клетках аденокарциномы и также найденным в намного более низких количествах на некоторых нормальных эпителиальных клетках. Показано, что это антитело эффективно для обнаружения болезни. Был описан ряд сшивок KS-1/4 с одиночными и 35 комбинированными цитокинами, такими как IL-2 и IL-12 (WO98/25978, WO01/58957A и WO 01/10912). Эти сшитые белки эффективны в моделях рака у животных. Однако вследствие наличия цитокинов эти сшитые белки особенно 40 иммуногенны. Нужны измененные молекулы антитела KS со сниженной склонностью вызывать иммунную реакцию при назначении человеческому организму. Модифицированные последовательности в Mab KS1/4, 45 предоставляющие модифицированное антитело KS согласно изобретению, показаны ниже. Венированная форма KS-1/4, в которой Т-лимфоцитарные эпитопы в вариабельных областях были полностью удалены мутацией, как определено в соответствии с критериями, данными выше в разделе о 50 компьютерных алгоритмах, была эффективно экспрессирована в клетках

млекопитающих и связывалась с антигеном ЕрСАМ только с приблизительно 8-кратным понижением сродства. Эта молекула была названа VHv1/VKv1. Второе антитело, VHv2/VKv1, имело только приблизительно 3-кратное понижение сродства и отличалось от VHv1/VKv1 заменой единственной аминокислоты. Эти два антитела были экспрессированы в клетках млекопитающих как сшитые белки KS -IL2.

KS (VHv1/VKv1)-IL2 и KS (VHv2/VKv1) являются наиболее предпочтительными вариантами изобретения касательно лечения широкого спектра раковых заболеваний человека посредством иммунной терапии.

1 Сравнение со структурами подгруппы мыши

Аминокислотные последовательности мышинных KS VH и VK сравнивались для согласования последовательностей для мышинных подгрупп тяжелой и легкой цепи Кабата (Kabat et al., 1991). Мышиный KS VH не может быть отнесен ни к одной Подгруппе, но наиболее близок к Подгруппе II (A) и V (A). Необычные остатки найдены в положении 2, в котором обычно находится валин, 46, в котором обычно находится глутаминовая кислота, и 68, в котором обычно находится треонин. Остаток 69 - чаще лейцин или изолейцин. В 82b наиболее часто находят серин. Мышиный KS VK может быть отнесен к Подгруппе VI ('Рисунок 2). Необычные остатки найдены в 46 и 47, которые оба обычно являются лейцином. Остаток 58 необычен или с лейцином или с валином, обычно находимыми в этом положении.

2 Сравнение с человеческими структурами

Аминокислотные последовательности мышинных KS VH и VK сравнивались с последовательностями линий зародышевых клеток человека VH (Tomlinson et al., 1992) и VK (COX et al. 1994), а также с линиями зародышевых клеток человека J области (Routledge et al., 1993). Человеческая структура для сравнения, отобранная для KS VH, была DP10 с человеческим JH6. Эта наследственная последовательность была найдена в перестроенном зрелом гене антитела без изменений аминокислот. Человеческая структура для сравнения, отобранная для KS VK, была B1. Для структуры - 2 использовалась последовательность зрелого человеческого антитела IMEV (в Kabat et al., 1991). Эта последовательность идентична мышинной последовательности, непосредственно примыкающей к CDR2. Последовательность J области была

человеческим JK4. Эта генетическая последовательность не была найдена как перестроенная легкая цепь зрелого антитела.

3 Разработка венерованных последовательностей

5 Вслед за идентификацией стандартных последовательностей структуры человека, некоторые неидентичные остатки аминокислот в пределах структур 425 VH и VK были заменены на соответствующие аминокислоты из стандартной 10 последовательности человека. Остатки, которые, как полагают, являются критическими для строения и связывания антитела, были исключены из этого процесса и не изменены. Мышиные остатки, которые были сохранены на этой 15 стадии, являются в значительной степени неповерхностными, скрытыми остатками, в отличие от остатков около N-конца, например, которые близки к CDR в конечном антителе. Этот процесс даёт последовательность, которая грубо напоминает "венерованное" антитело, поскольку поверхностные остатки 20 являются главным образом человеческими, а скрытые остатки – такие же, как в первоначальной мышиной последовательности.

4 Последовательный анализ пептида

25 Мышиная и венерованная последовательности KS VH и VK были проанализированы с использованием метода согласно изобретению. Аминокислотные последовательности разделялись на все возможные 13-меры. 30 13-мерные пептиды последовательно представлялись моделям связывающей бороздки аллотипов HLA-DR, и каждому пептиду назначалась степень связывания для каждой аллели. Конформационный показатель рассчитывался для каждой связанной в кармане боковой цепи пептида. Этот показатель основан 35 на пространственном перекрывании, потенциальных водородных связях между пептидом и остатками в связывающей бороздке, электростатических взаимодействиях и благоприятных контактах между пептидом и остатками в 40 кармане. Потом конформация каждой боковой цепи изменялась, а показатель рассчитывался повторно. После того как определен наивысший конформационный показатель, рассчитывается степень связывания, основанная 45 на связанных в бороздке гидрофобных остатках, гидрофильных остатках вне бороздки и количестве остатков, которые помещаются в связывающую бороздку. Известные элементы, связывающиеся с MHC класса II, достигают значительной 50 степени связывания почти без ошибочных результатов. Таким образом, пептиды, достигающие значительной степени связывания в текущем анализе, как

полагают, являются потенциальными Т-лимфоцитарными эпитопами. Результаты анализа последовательности пептидов для мышинных и венерованных последовательностей показаны в Таблице 1.

Таблица 1: Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы в мышинных и венерованных последовательностях KS

Последовательность	Количество потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов	Локализация потенциальных эпитопов (№ потенциальных связывающих МНС элементов)
Мышиный KS VH	6	35(11), 62(17), 78(12), 81(12), 89(6), 98(15)
Мышиный KS VH	5	30(7), 62(15), 78(11), 89(6), 98(15)
Мышиный KS VK	6	1(14), 2(5), 17(5), 27(5), 51(13), 72(18)
«Венерованный» KS VK	3	1(17), 27(5), 51(13)

5 Удаление потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов

Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы удаляют, производя замены аминокислот в специфическом пептиде, который составляет эпитоп. Замены производят, вставляя аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами, если это возможно. Однако, чтобы удалить некоторые потенциальные эпитопы, следует заменить аминокислоты различного размера, заряда или гидрофобности. Если должны быть сделаны изменения в пределах CDR, которые могли бы повлиять на связывание, следует сделать вариант с заменой и без замены специфической аминокислоты. Нумерация аминокислотных остатков для замены - согласно Kabat. Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы соответствуют номеру первого остатка 13-мера.

Изменения аминокислот, требуемые для удаления Т-лимфоцитарных эпитопов из венерованной вариабельной области тяжелой цепи KS, были следующие:

1. Замена аргинина на лизин в остатке 38 (номер 38 по Kabat) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 30.

2. Замена аланина на лейцин в остатке 72 (номер 71 по Kabat) и изолейцина на фенилаланин в остатке 70 (номер 69 по Kabat) удаляет

потенциальный эпитоп в остатке 62. Изолейцин в остатке 69 по Kabat и аланин в остатке 71 по Kabat найдены в последовательности человеческого наследственного VH, DP10.

5 3. Замена лейцина на аланин в остатке 79 (номер 78 по Kabat) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 78.

10 4. Замена треонина на метионин в остатке 91 (номер 87 по Kabat) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 89.

15 5. Замена метионина на изолейцин в остатке 100 (номер 96 по Kabat) в CDRH3 удаляет потенциальный эпитоп в остатке 98. Не существует никакой замены в CDRH3, которая удаляет этот потенциальный эпитоп.

20 Аминокислотные замены, требующиеся для удаления потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов из «венированной» варибельной области легкой цепи KS, были следующие:

25 1. Замена изолейцина на метионин в остатке 32 (номер 33 по Kabat) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 27. Этот остаток находится в пределах CDR2. В антителе человека в этом положении обычно находят изолейцин.

30 2. Потенциальный эпитоп в положении 1 удаляется заменой валина на лейцин (номер 3 по Kabat).

35 3. Замена серина на аланин в остатке 59 (номер 60 по Kabat) удаляет потенциальный эпитоп в остатке номер 51.

6 Проектирование деиммунизированных последовательностей

40 Деиммунизированные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи были разработаны в соответствии с изменениями, необходимыми для удаления потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов, и в соответствии с учётом структурных остатков, которые могли бы быть критическими для строения и связывания. В дополнение к деиммунизированным последовательностям, основанным на «венированной» последовательности, была разработана дополнительная последовательность для каждого VH и VK, основанная на мышинной последовательности, определённая как "пронизанная" версия пептида мыши (Mo PT). Для этой версии прямо в мышинной последовательности были сделаны изменения, чтобы исключить Т-лимфоцитарные эпитопы, но сделаны только изменения вне CDR, которые, как полагают, не являются вредными для связывания. Не было сделано никакой попытки удалить поверхностные (В-лимфоцитарные) эпитопы в этой версии

деиммунизированной последовательности. Первичный деиммунизированный VH включает замены 1 - 5 в вышеописанной Секции 5 и одно дополнительное изменение в остатке 43 (номер 43 по Kabat). Лизин, найденный в мышинной последовательности, замещался на глутамин из человеческой структуры. Лизин положительно заряжен и поэтому существенно отличается от глутамина; эта область может быть вовлечена в контакты VH/VL. Первичный деиммунизированный VH не включает никаких потенциальных Т-лимфоцитарных эпитопов. Дальнейшие 4 деиммунизированные последовательности VH были разработаны, чтобы проверить влияние различных необходимых замен на связывание антител. Кумулятивные изменения, сделанные в первичной деиммунизированной последовательности (KSDIVHv1) и сохраняющиеся потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы детализированы в Таблице 2. Мышиная версия последовательности включена для сравнения.

Таблица 2: Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированном KS VH

Вариант	Кумулятивные замены остатка	Потенциальные эпитопы (№ потенциальных связывающих МНС элементов из 18 протестированных)
KSDIVHv1	Отсутствуют	Отсутствуют
KSDIVHV2	96M → I	98(15)
KSDIVHv3	71A → L, 78L → A	62(16), 78(11), 98(15)
KSDIVHv4	38 R → K	30(7), 62(16), 78(11), 98(15)
KSDIVHvS	68T → A, 69I → F	30(7), 62(17), 78(11), 98(15)
KSMoPTVH	NA	98(15), 78(12)

Первичный деиммунизированный VK включает замены 1 - 3 в вышеописанной Секции 5. Дальнейшие 3 деиммунизированные VK были разработаны, чтобы проверить влияние различных необходимых замен на связывание антител. Кумулятивные изменения, сделанные в первичной деиммунизированной последовательности (KSDIVKv1) и сохраняющиеся потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы детализированы в Таблице 3.

Таблица 3: Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированном KS VK

Вариант	Кумулятивные изменения остатка	Потенциальные эпитопы (№ потенциально связывающих МНС элементов из 18 протестированных)
KSDIVKv1	Отсутствуют	Отсутствуют
KSDIVKv2	331 → M	27(5)
KSDIVKv3	3V → L	1(17), 27(5)
KSDIVKv4	60 S → A	1(17), 27(5), 5(13)
KSMoPTVK	NA	Отсутствуют

Последовательности версий модифицированных эпитопов:

KS VH «венированный»:

QIQLVQSGPELKKPGSSVKiSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINT
YTGEPTYADDFKGRFTFTIETSTSTAYLQLNNLRsEDmATYfCVRFISKGDYWGQ
GTTVTVSS

KS VK «венированный»:

QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAS
GFPARFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPYTFGGGTKVEIK

KS деиммунизированный VH1

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINT
YTGEPTYADDFKGRFTITAETSTSTLYLQLNNLRSEDTATYFCVRFMSKGDYWG
QGTTVTVSS

KS деиммунизированный VK1

QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYILWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLASG
FPSRFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPYTFGGGTKVEIK

KS деиммунизированный VH2

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINT
YTGEPTYADDFKGRFTITAETSTSTLYLQLNNLRSEDTATYFCVRFISKGDYWGQ
GTTVTVSS

KS деиммунизированный VK2

QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAS
GFPSRFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPYTFGGGTKVEIK

KS деиммунизированный VH3

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLKWMGWINT
YTGEPTYADDFKGRFTITLETSTSTAYLQLNNLRSEDTATYFCVRFISKGDYWGQ
GTTVTVSS

KS деиммунизированный VK3

QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAS
GFPSRFSGSGSGTSTYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGKVEIK

5

KS деиммунизированный VH4

QIQLVQSGPELKKPGSSVXISCKASGYTFTIS_hFGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFTITLETSTSTAYLQLNNLRSEDTATYFCVRFISKGDYWG
QGTTVTVSS

10

KS деиммунизированный VK4

QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGQPPKPWIFDTSNLAS
GFPARFSGSGSGTSTYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGKVEIK

15

KS деиммунизированный VH5

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFAFTLETSTSTAYLQLNNLRSEDTATYFCVRFISKGDYW
GQTTVTVSS

20

KS деиммунизированный VK5

QILLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIYDTSNLAS
GFPARFSGSGSGTSTYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGKVEIK

25

KS VH последовательность пептида мыши (Mo PT)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFVFSLETSASTAFLQLNNLRSEDTATYFCVRFISKGDYW
GQGTSVTVSS

30

KS VK последовательность пептида мыши (Mo PT)

QIVLTQSPATLSASPGERVITITCSASSSVSYMLWYLQKPGSSPKPWIFDTSNLASG
FPSRFSGSGSGTSTYSLIISLEAEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGKLEIK

35

KS VH мыши

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQTPGKGLKWMGWIN
TYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDMATYFCVRFISKGDYW
GQGTSVTVSS

40

KS VK мыши

QILLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMLWYQQKPGSSPKPWIFDTSNLAS
GFPARFSGSGSGTSTYSLIISMEAEEDAATYYCHQRSGYPTYTFGGGKLEIK

45

Mab 14.18-IL-2

По аналогии, моноклональное антитело 14.18 было сшито с IL-2 и
деиммунизировано согласно изобретению.

50

Потенциальные Т-лимфоцитарные эпитопы в мышинных и «венированных» последовательностях 14.18:

Последовательность	Количество потенциальных Т-лимфоцитов	Локализация потенциальных эпитопов
Мышиный 14.18 VH	11	3(17), 9(15), 30(5), 35(17), 39(15), 43(9), 58(12), 62(11), 81(11), 84(16), 101(7)
«Венированный» 14.18 VH	5	43(9), 58(12), 62(11), 81(11), 84(16)
Мышиный 14.18 VK	7	7(7), 13(11), 27(15), 49(11), 86(17), 97(11), 100(4)
«Венированный» 14.18 VK	5	27(15), 49(11), 86(17), 97(11), 100(17)

Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированных 14.18 VH:

Вариант	Кумулятивные изменения остатков	Потенциальные эпитопы (№ потенциальных связывающих МНС элементов из 18 протестированных)
14.18DIVH1	Отсутствуют	Отсутствуют
14.18DIVH2	41I → P, 45L → T, 50L → A	Отсутствуют
14.18DIVH3	65S → G	58(8)
14.18DIVH4	71A → V	58(8), 62(4)
14.18DIVH5	45T → L, 41P → I	43(9), 58(8), 62(4)
14.18MORTVH	NA	43(9), 58(12), 62(11)

Аминокислотные изменения и потенциальные эпитопы в деиммунизированных 14.18 VK:

Вариант	Кумулятивные изменения остатков*	Потенциальные эпитопы (№ потенциальных связывающих МНС элементов из 18 протестированных)
14.18DIVKI	Отсутствуют	Отсутствуют
14.18DIVK2	46L → M, 49Y → H	Отсутствуют
14.18DIVK3	96P → T, 100Q → G	97(5)
14.18DIVK4	96T → L	97(11)
14.18DIVK5	27e S → R	27(15), 97(11)
14.18DIVK6	46M → L	27(15) 49(11), 97(11)
14.18MoPTVK	NA	27(15), 49(11), 97(11), 100(4)

Последовательности версий модифицированных эпитопов:

14.18 VH «венированный»:

EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAPGQRLEWIG AIDPY
 5 YGGTSYNQKFKGRATLSVDKSSSQAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQG
 TTVTSS

14.18 VK «венированный»:

10 DVVMTQSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIH
 KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDLAVYFCSQSTHVPPLTFGQGTK
 LEIK

14.18 деиммунизированный VH1

15 EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAIGQRLEWIGLIDPY
 YGGTSYNQKFKSRVTITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGT
 TTVTSS

14.18 деиммунизированный VK1

20 DVVMTQSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY
 KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGQGTK
 25 VEIK

14.18 деиммунизированный VH2

EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAPGQRTEWIG AIDPY
 30 YGGTSYNQKFKSRVTITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQGT
 TTVTSS

14.18 деиммунизированный VK2

35 DVVMTQSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIH
 KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGQGTK
 VEIK

14.18 деиммунизированный VH3

40 EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAPGQRTEWIG AIDPY
 YGGTSYNQKFKGRVTITADKSSSQAYMHLKSLTSEDTAVYYCVSGMEYWGQG
 TTVTSS

14.18 деиммунизированный VK3

45 DVVMTQSPGTLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKMLIH
 KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPTTFGGGTK
 50 VEIK

14.18 деиммунизированный VH4

EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAPGQRTEWIG AIDPY
 YGGTSYNQKFKGRVTITVDKSSSQAYMHLKSLTSED TAVYYCVSGMEYWGQG
 TTVT VSS

14.18 деиммунизированный VK4

DVVM TQSPG TLPVSLGERATISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPKMLIH
 KVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPLTFGGG TK
 VEIK

14.18 деиммунизированный VH5

EVQLLQSGPELKKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAIGQRLEWIG AIDPY
 YGGTSYNQKFKGRVTITVDKSSSQAYMHLKSLTSED TAVYYCVSGMEYWGQG
 TTVT VSS

14.18 деиммунизированный VK5

DVVM TQSPG TLPVSLGERATISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQSPKMLIH
 KVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDMAVYFCSQSTHVPPLTFGGG TK
 VEIK

14.18 VH последовательность пептида мыши (Mo PT)

EVQLVQSGPEVEKPSASVKISCKASGSSFTGYNMNWVRQAIGKSLEWIG AIDPY
 YGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSED TAVYYCVSGMEYWGQG
 TTVT VSS

14.18 VK последовательность пептида мыши (Mo PT)

DVVM TQTPGSLPVSAGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIH
 KVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDSGVYFCSQSTHVPPLTFGAG TK
 LELK

14.18 VH мыши

EVQLLQSGPELEKPSASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIGKSLEWIG AIDPY
 YGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDS AVYYCVSGMEYWGQG
 TSVTVSS

14.18 VK мыши

DVVM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIH
 KVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAG TK
 LELK

Предшествующее описание и примеры приводятся как иллюстративные, и не должны восприниматься как исчерпывающие. Другие варианты в пределах смысла и охвата этого изобретения всё ещё возможны и будут с готовностью представлены квалифицированным специалистам.

Формула изобретения

1. Искусственный слитый белок формулы:

$A-L_n-X$,

где А означает часть Fc молекулы антитела или целое антитело или его фрагменты sFv, Fab, Fab', F(ab')₂, выбранные из группы, включающей:

моноклональное антитело 225 и производные,
моноклональное антитело 425 и производные,
моноклональное антитело KS 1/4 и производные,
моноклональное антитело 14.18 и производные,
анти-CD_x-антитело, где x это целое число 1-25;

X означает цитокин, выбранный из группы, включающей IL-2, IL-12, EPO, G-CSF, GM-CSF, TNFα, эндостатин и ангиостатин,

L означает линкерный пептид,
n=0 или 1,

полученный из родительского искусственного слитого белка и имеющий аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности указанного родительского искусственного слитого белка и проявляющий пониженную иммуногенность за счет снижения количества Т-клеточных эпитопов относительно количества эпитопов родительского слитого белка при экспозиции в иммунной системе данного вида, где указанные Т-клеточные эпитопы имеют пептидную последовательность, которая обладает способностью связываться со связывающимися группами молекулы MHC класса II, причем по меньшей мере А не имеет или имеет пониженное число Т-клеточных эпитопов, причем указанный иммуногенно модифицированный искусственный слитый белок получают с помощью способа, предусматривающего

(i) идентификацию одного или более потенциальных Т-клеточных эпитопов в пределах аминокислотной последовательности слитого белка, где указанная идентификация включает:

отбор сегментов белка, перекрывающихся на 1-5 аминокислотных остатков, где длина каждого из сегментов составляет 13 аминокислотных остатков;

последовательное вычисление константы связывания каждого сегмента со связывающей бороздкой молекулы MHC класса II с использованием оценивающей функции Бема, модифицированной тем, что дополнительно учитывается вклад энергии ван-дер-ваальсового отталкивания и липофильного взаимодействия попарно между всеми липофильными атомами выбранных сегментов белка и всеми липофильными атомами связывающей бороздки молекулы MHC класса II, необязательно, сравнение расчетных данных с экспериментальными данными о сродстве пептидов с MHC класса II;

выбор сегментов с наиболее высокими значениями энергии связывания или необязательно, выбор сегментов со значениями энергии связывания, превышающими значения экспериментальных данных:

(ii) изменение *in silico* от 1 до 9 аминокислотных остатков в пределах идентифицированных потенциальных последовательностей Т-клеточных эпитопов на аминокислотные остатки, устраняющие способность указанных эпитопов связываться с MHC класса II, с сохранением функции белка;

(iii) получение вариантов измененных последовательностей Т-клеточных эпитопов методом рекомбинантной ДНК;

(iv) испытание указанных вариантов на наличие пониженной иммуногенности при неизменной терапевтической активности и, при необходимости,

(v) повторение шагов (i)-(iv).

2. Слитый белок по п.1, в котором X является IL2.

3. Способ конструирования слитого белка по п.1, включающий:

(i) идентификацию одного или более потенциальных Т-клеточных эпитопов в пределах аминокислотной последовательности слитого белка, где указанная идентификация включает:

отбор сегментов белка, перекрывающихся на 1-5 аминокислотных остатков, где длина каждого из сегментов составляет 13 аминокислотных остатков;

последовательное вычисление константы связывания каждого сегмента со связывающей бороздкой молекулы МНС класса II с использованием оценивающей функции Бема, модифицированной тем, что дополнительно учитывается вклад энергии ван-дер-ваальсового отталкивания и липофильного взаимодействия попарно между всеми липофильными атомами выбранных сегментов белка и всеми липофильными атомами связывающей бороздки молекулы МНС класса II, необязательно, сравнение расчетных данных с экспериментальными данными о сродстве пептидов с МНС класса II;

выбор сегментов с наиболее высокими значениями энергии связывания или необязательно, выбор сегментов со значениями энергии связывания, превышающими значения экспериментальных данных:

(ii) изменение *in silico* от 1 до 9 аминокислотных остатков в пределах идентифицированных потенциальных последовательностей Т-клеточных эпитопов на аминокислотные остатки, устраняющие способность указанных эпитопов связываться с МНС класса II, с сохранением функции белка;

(iii) получение вариантов измененных последовательностей Т-клеточных эпитопов методом рекомбинантной ДНК;

(iv) испытание указанных вариантов на наличие пониженной иммуногенности при неизменной терапевтической активности и, при необходимости,

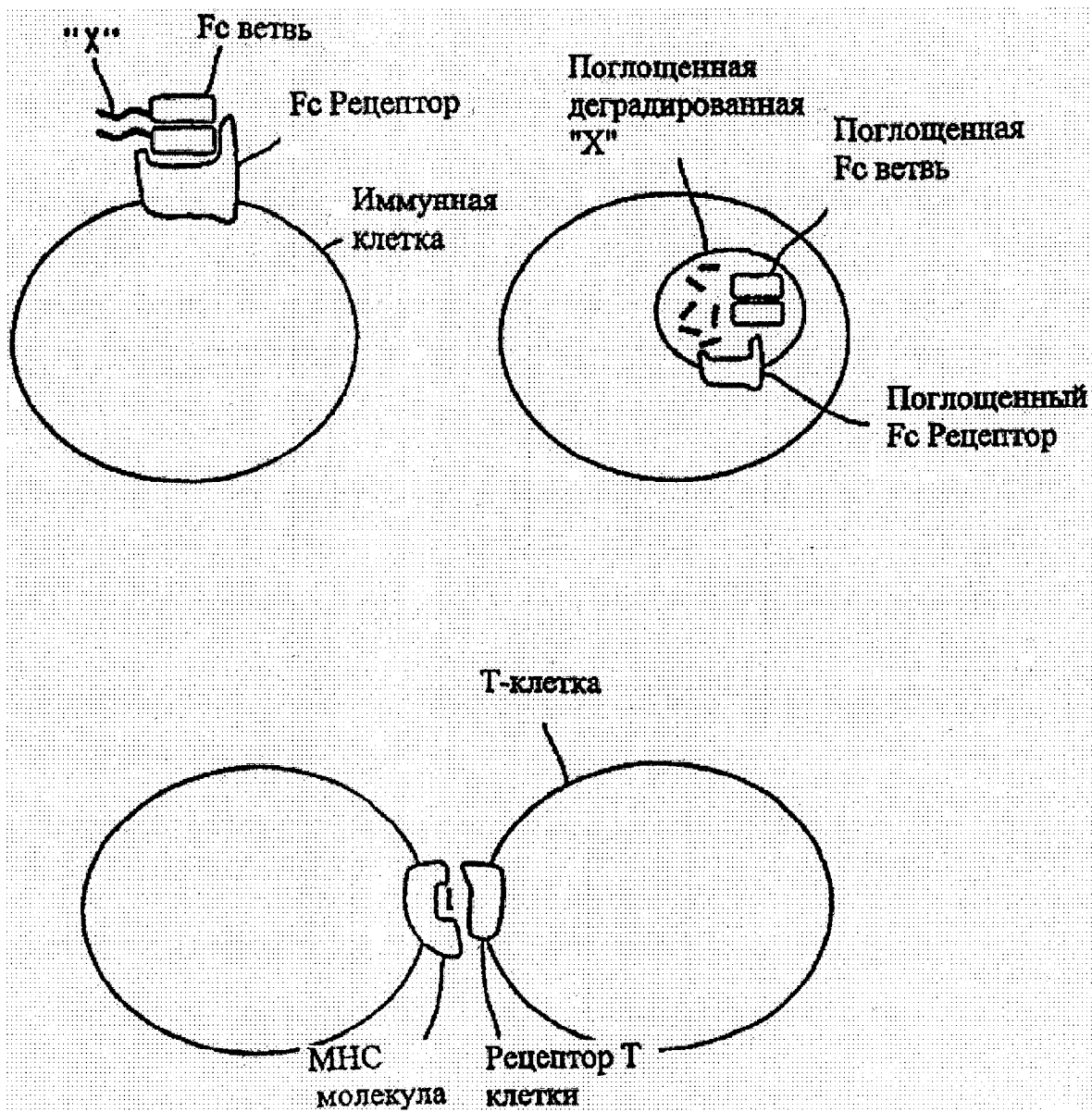
(v) повторение шагов (i)-(iv).

4. Применение слитого белка по п.1 для приготовления фармацевтической композиции для лечения опухоли.

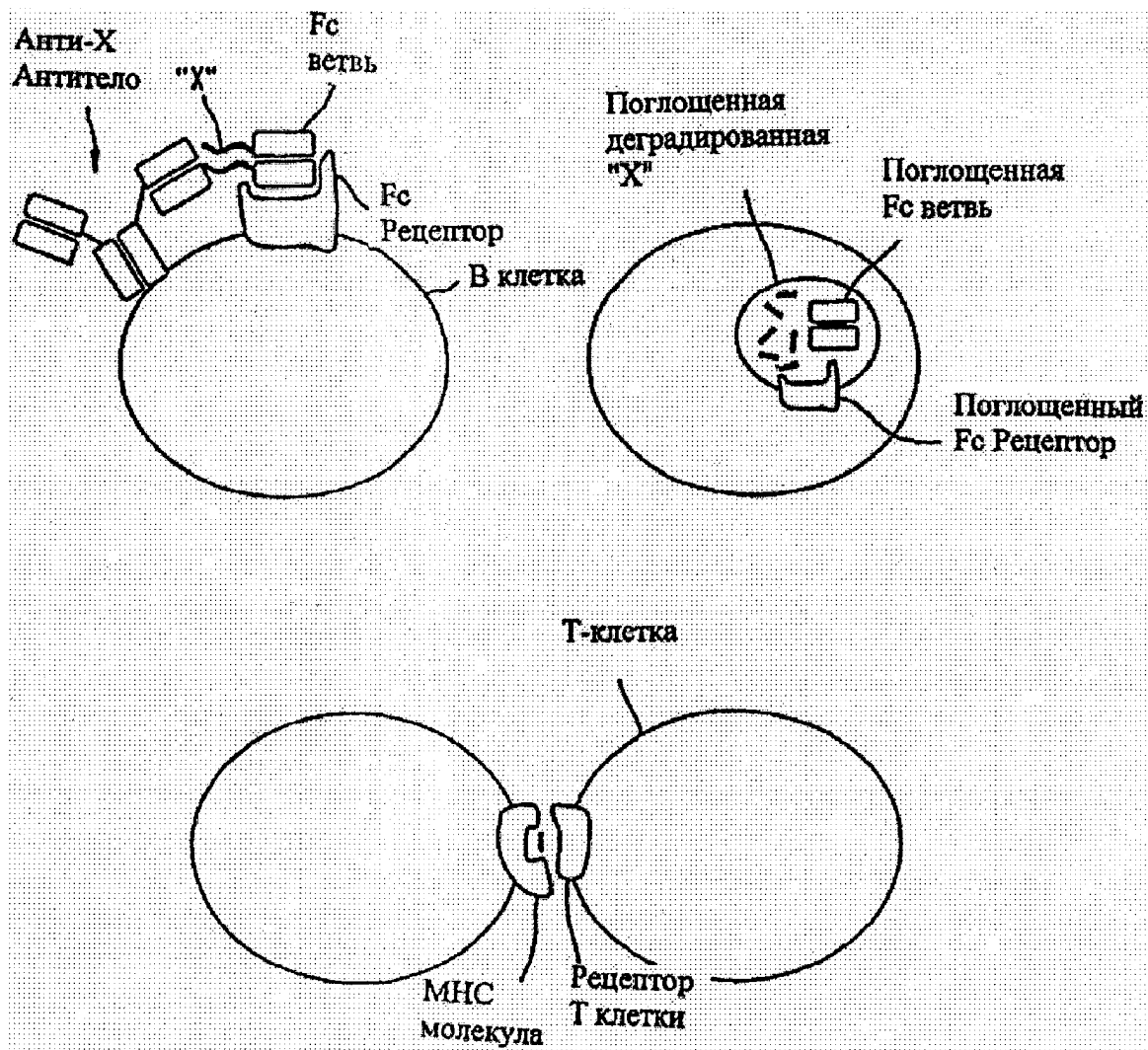
Приоритет по пунктам:

19.02.2001 по пп.1, 2, 4;

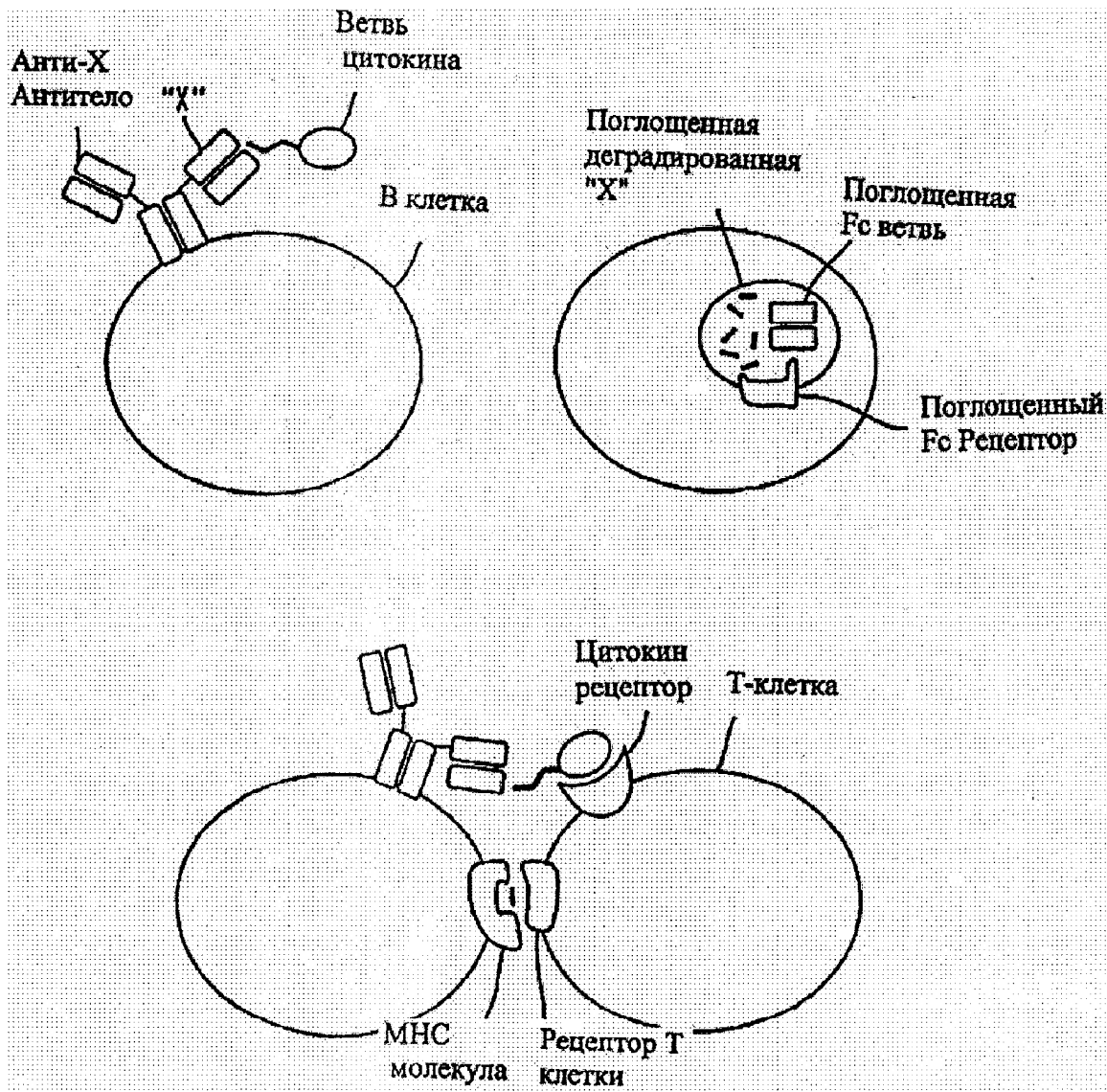
05.04.2001 по п.3.



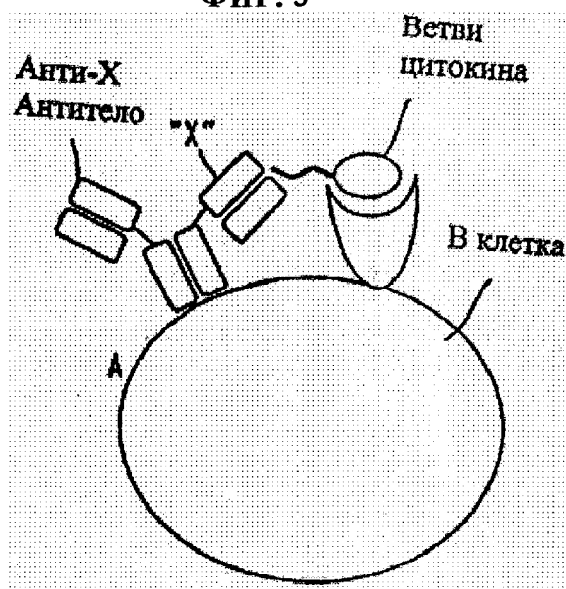
ФИГ. 1



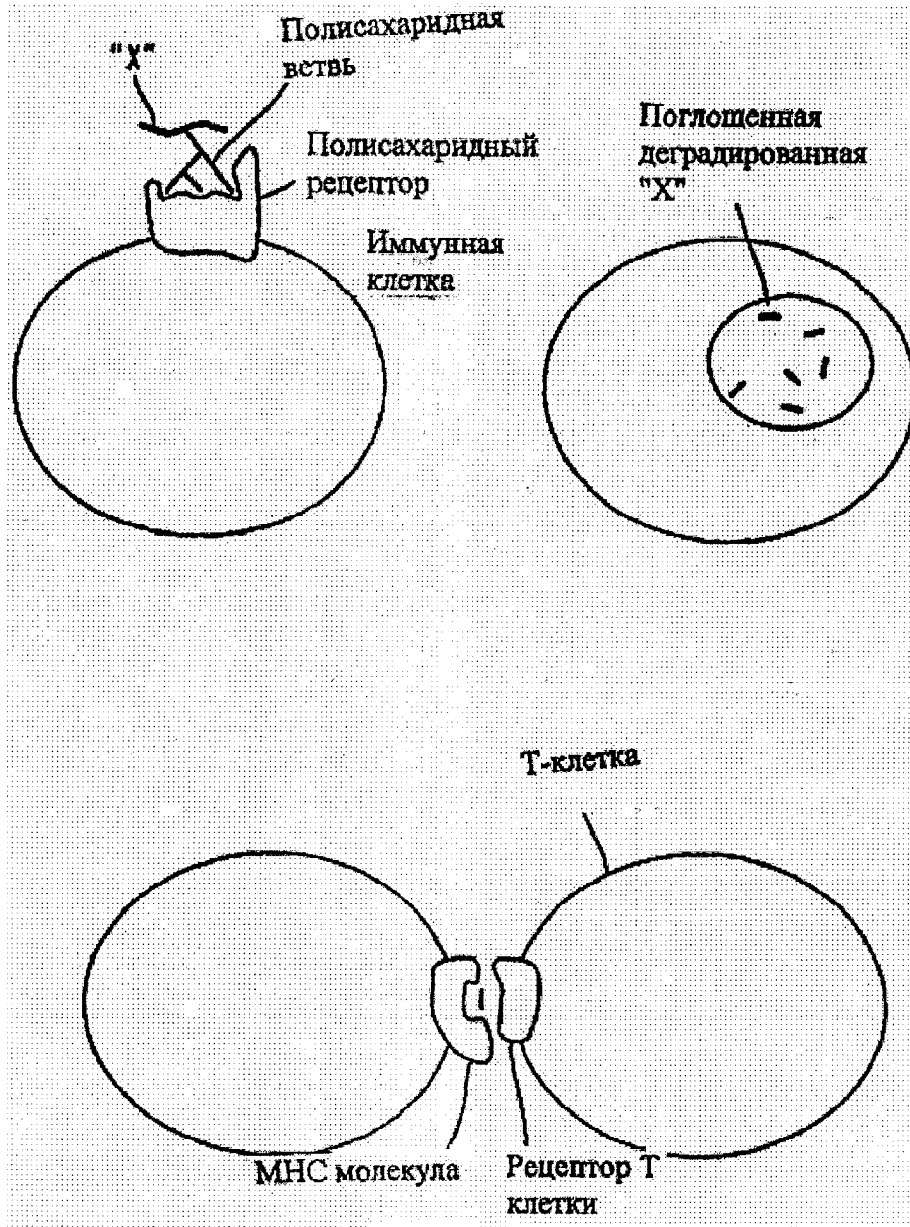
ФИГ. 2



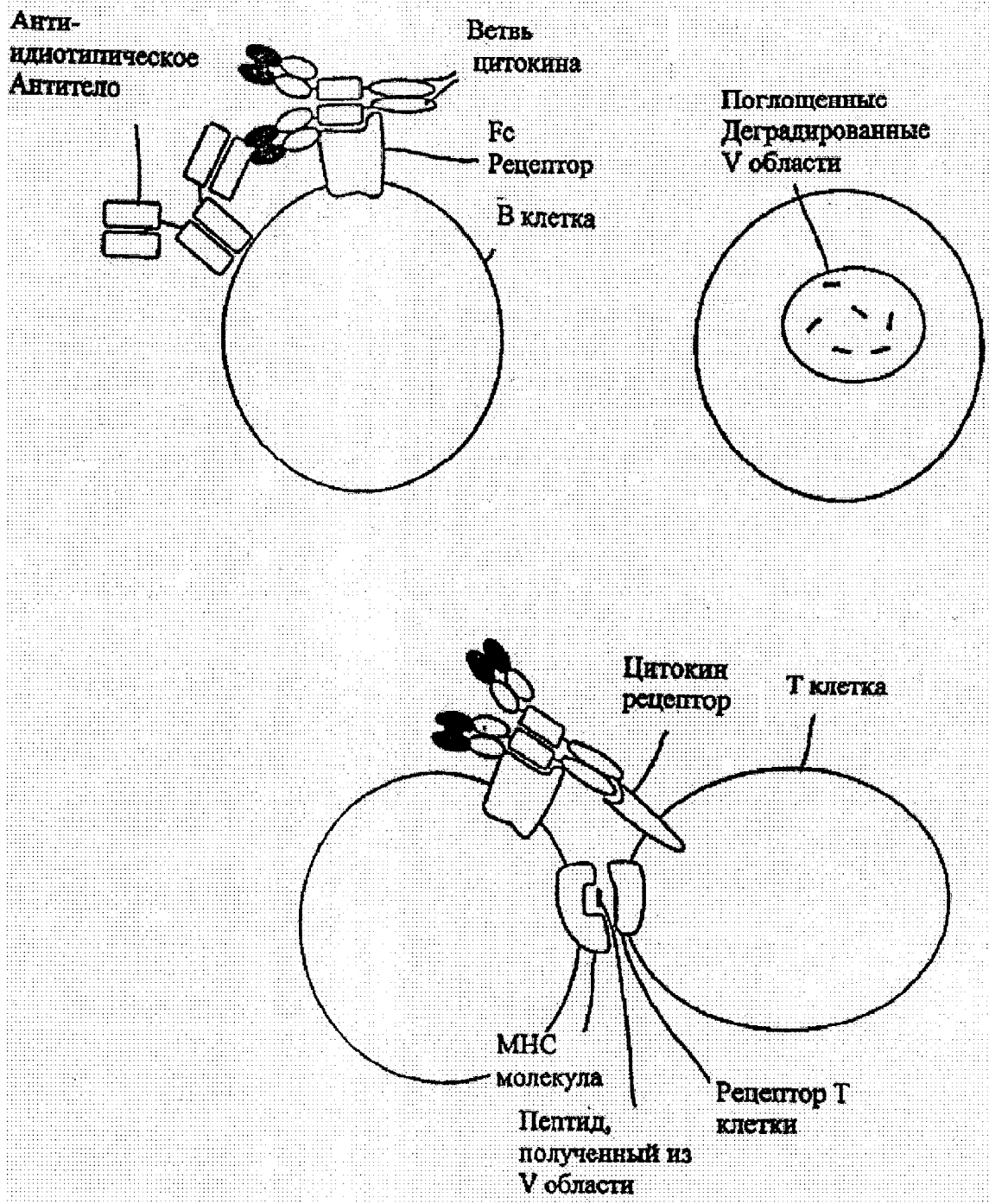
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6