



(51) МПК
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 16/30 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019137008, 19.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 19.11.2019

Дата регистрации:
 01.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.11.2019

(45) Опубликовано: 01.10.2020 Бюл. № 28

Адрес для переписки:
 121205, Москва, Инновационный центр
 "Сколково", ул. Нобеля, 5, оф. 125, ООО "ЦИС
 "Сколково", Котлов Дмитрий Владимирович

(72) Автор(ы):

Холоденко Роман Васильевич (RU),
 Доронин Игорь Игоревич (RU),
 Ларин Сергей Сергеевич (RU),
 Кибардин Алексей Владимирович (RU),
 Розов Федор Николаевич (RU),
 Холоденко Ирина Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 «Реал Таргет» (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO 2018152530 A1, 23.08.2018. US
 20190048085 A1, 14.02.2019. RU 2462476 C2,
 27.09.2012.

(54) СОЗДАНИЕ КОНЬЮГАТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ И ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ С ПРЕПАРАТАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к иммуноконъюгату для лечения GD2-позитивных онкологических заболеваний. Также раскрыта композиция, содержащая указанный иммуноконъюгат. Раскрыт способ лечения GD2-

специфичного опухолевого заболевания с помощью указанного иммуноконъюгата. Изобретение позволяет эффективно лечить заболевания, ассоциированные с GD2. 3 н. и 6 з.п. ф-лы, 8 ил., 6 пр.

RU 2 733 430 C1

RU 2 733 430 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C07K 16/30 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019137008, 19.11.2019**

(24) Effective date for property rights:
19.11.2019

Registration date:
01.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: **19.11.2019**

(45) Date of publication: **01.10.2020 Bull. № 28**

Mail address:

**121205, Moskva, Innovatsionnyj tsentr "Skolkovo",
ul. Nobelya, 5, of. 125, OOO "TSIS "Skolkovo",
Kotlov Dmitrij Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**Kholodenko Roman Vasilevich (RU),
Doronin Igor Igorevich (RU),
Larin Sergei Sergeevich (RU),
Kibardin Aleksei Vladimirovich (RU),
Rozov Fedor Nikolaevich (RU),
Kholodenko Irina Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoi otvetstvennostiu
«Real Target» (RU)**

(54) **CREATION OF CONJUGATES OF GD2-SPECIFIC ANTIBODIES AND FRAGMENTS OF GD2-SPECIFIC ANTIBODIES WITH PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, particularly to an immunoconjugate for treating GD2-positive oncological diseases. Also disclosed is a composition containing said immunoconjugate.

Disclosed is a method of treating a GD2-specific tumor disease using said immunoconjugate.

EFFECT: invention provides effective treatment of diseases associated with GD2.

9 cl, 8 dwg, 6 ex

**1 C 1
0
4 3 0
4 3 0
2 7 3 3 4 3 0
R U**

**R U
2 7 3 3 4 3 0
C 1**

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения конструкций на основе антител к опухолеассоциированному ганглиозиду GD2. Данные антитела и их фрагменты могут найти применение в медицине, иммунологии и биотехнологии для приготовления терапевтических препаратов для лечения GD2-позитивных онкологических заболеваний.

Уровень техники

Прогнозируется, что мировой рынок конъюгатов антител с лекарственными препаратами (ADCs, от англ. antibody-drug conjugates) будет иметь значительные перспективы, и совокупный среднегодовой темп роста (CAGR) до 2023 г. составит 19%. Рынок ADCs считается достаточно открытым, и востребованы разработки, направленные на создание новых более эффективных и безопасных молекул, а также на оптимизацию методов их создания. В настоящий момент на рынке присутствуют только 5 ADCs, одобренные FDA. Около 80 ADCs находятся примерно в 600 клинических испытаниях по терапии как гематологических, так и солидных опухолей. Большой интерес к данной технологии обусловлен тем, что ADCs могут объединять лучшие терапевтические качества составляющих их компонентов, а именно избирательность действия моноклональных антител будет сочетаться с высоким цитотоксическим эффектом химиопрепаратов.

Стратегия создания ADCs заключается в снижении системной токсичности, характерной для химиопрепаратов, а также в усилении эффекторных свойств терапевтических антител. Для проявления активности таким конъюгатам кроме интернализации в клетку необходимо также высвобождение препарата, поскольку обычно сама конструкция не обладает цитотоксической активностью. Соотношение химиопрепарата к векторной молекуле не велико и составляет 3-10 молекул на антитело или фрагмент антитела, поскольку большее количество лекарства может привести к потере связывающей способности векторной молекулы (Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer. 2002 Oct; 2(10):750-63).

Моноклональные антитела составляют основу ADCs и распознают антигены, представленные на раковых клетках. Такой антиген должен обладать способностью интернализироваться для того чтобы связанный с антителом препарат транспортировался в клетку, где этот цитотоксический агент и осуществляет свою противоопухолевую функцию (Damelin M, et al., Evolving strategies for target selection for antibody-drug conjugates. Pharm Res 2015;32:3494-507). Стоит отметить, что антитела сами способны осуществлять противоопухолевую функцию, например, за счет снижения сигналов, которые стимулируют опухолевую прогрессию, или за счет прямой индукции клеточной гибели опухолевых клеток (Doronin II, et al., Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. BMC Cancer. 2014 Apr 28;14:295), а также за счет Fc-опосредованных эффекторных механизмов. Однако наличие собственной противоопухолевой активности у антител не является ключевым требованием при создании ADCs.

В научной литературе представлено всего несколько работ по использованию фрагментов антител для создания ADCs. Так в работе Kim et al. были получены конъюгаты анти-CD30 диабоды с анти-тубулиновыми лекарствами, monomethyl auristatin E или F. Лекарства были конъюгированы в соотношении 4 молекулы на 1 молекулу диабоды через дипептидный линкер, расщепляемый протеазами. Данные ADCs имели высокую цитотоксичность *in vitro* и значимый противоопухолевый ответ в ксенографтной модели при хорошо переносимых концентрациях. В то же время противоопухолевый

ответ ADCs диабоды несколько уступал соответствующим ADCs на основе полноразмерных антител (Kim, K. M., et al. *Mol. Cancer Ther.* 2008. 7, 2486-2497).

Ганглиозид GD2 является маркером многих опухолей, среди которых нейробластома, глиома, меланома, различные саркомы, мелкоклеточный рак легкого. В нормальных клетках эта молекула практически не представлена, за исключением минорной экспрессии на клетках головного мозга, в периферических нервах и меланоцитах кожи. При опухолевой трансформации экспрессия ганглиозида GD2 возрастает на порядки, достигая 10 миллионов молекул на клетку, что делает его перспективной мишенью для противоопухолевой терапии (Ahmed M., and Cheung N.K. *Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy.* *FEBS Lett*, 2014. 588(2):288-97). Наиболее перспективным подходом для использования онкоассоциированности ганглиозида GD2 в противоопухолевой терапии является иммунотерапия с применением моноклональных антител. Одно из основных достоинств иммунотерапии рака заключается в том, что иммунные эффекторные клетки распознают и уничтожают опухолевые клетки, которые недоступны традиционным методам лечения, с исключительной специфичностью и одновременно генерируют долгосрочный иммунный надзор против раковых клеток. В середине 80-х годов в доклинических исследованиях были показаны значимые противоопухолевые эффекты мышинных GD2-специфичных антител на различных животных моделях рака (Katano M, Irie RF. *Immunol Lett.* 1984;8 (4):169-74). Однако в настоящий момент только один препарат, Unituxin (на основе химерного GD2-специфичного антитела Dinutuximab) был одобрен для клинического применения. Unituxin характеризуется значимой эффективностью действия и повышает на 20% 3-летнюю выживаемость пациентов с нейробластомой высокого риска в комбинированной терапии по сравнению с выживаемостью пациентов, получавших только химиотерапию.

Однако использование препарата Unituxin имеет ряд ограничений, среди которых недостаточная эффективность действия и побочные эффекты. Ограниченная эффективность действия химерных GD2-специфичных антител во многом обусловлена низкой активностью иммунных эффекторных клеток внутри солидных опухолей, а также большим размером антител, которые плохо проникают в плотные новообразования. В значительной степени данные ограничения могут быть преодолены за счет получения иммуноконъюгатов с лекарственными препаратами, а также путем использования фрагментов антител (Kholodenko RV, et al. *Curr Med Chem.* 2019; 26(3): 396-426).

Целью данного исследования являлось создание новых конъюгатов антител (или фрагментов антител) с препаратами, эффективных в элиминации GD2-позитивных опухолевых клеток. Данное изобретение расширяет круг имеющихся кандидатных молекул для лечения GD2-позитивных онкологических заболеваний.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание терапевтического агента на основе антител к GD2 и разработка нового эффективного и безопасного способа лечения пациентов с онкологическими заболеваниями, характеризующимися присутствием ганглиозида GD2 на поверхности клеток опухоли. Также задачей настоящего изобретения является расширение арсенала средств для подавления пролиферации и индукции гибели GD2-позитивных опухолевых клеток. Для этого были получены очищенные химерные GD2-специфичные антитела и scFv-фрагменты антител для последующей конъюгации цитотоксических препаратов, относящихся к классу доластинов и мейтансиноидов через расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Одной

из задач, решаемых в настоящем изобретении, являлась отработка методик ковалентной пришивки цитотоксических препаратов, несущих линкер, к GD2-специфичным антителам и scFv фрагментам, а также очистки полученных конъюгатов. На GD2-позитивных и GD2-негативных опухолевых линиях проведен анализ цитотоксического действия полученных конъюгатов GD2-специфичных антител и фрагментов антител с цитотоксическими препаратами. Противоопухолевые эффекты, полученных ADCs были оценены в релевантной сингенной мышинной модели рака.

Указанные задачи решали путем создания нового терапевтического агента для лечения GD2-специфичных опухолевых заболеваний, представляющего собой иммуноконъюгат, специфически связывающий ганглиозид GD2 и имеющего общую формулу: A-(Л-Ц)_n, где (а) А - антитело, фрагмент антитела или мультимерный фрагмент антитела, который включает в себя от одного до четырех антигенсвязывающих участка, имеющего тяжёлую цепь (или ее часть), содержащую H-CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:1, H-CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:2, и H-CDR3 с SEQ ID NO:3, и лёгкую цепь (или ее часть), содержащую L-CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:4, L-CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:5, и L-CDR3 с SEQ ID NO:6; (б) Л является линкером; (в) Ц является цитотоксическим или цитостатическим агентом; и (г) n варьируется от 1 до 8.

В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат характеризуется тем, что тяжёлая цепь содержит вариабельный домен с последовательностью, гомологичной по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат характеризуется тем, что лёгкая цепь содержит вариабельный домен с последовательностью, гомологичной по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат может содержать полноразмерные антитела к GD2.

В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат характеризуется тем, что цитотоксический или цитостатический агент выбран из группы: монометил ауристин Е, монометил ауристин F, монометил ауристин D, мейтансиноид DM4 или мейтансиноид DM1.

В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат характеризуется тем, что n составляет 2, 4, 6 или 8.

В некоторых вариантах изобретения данный иммуноконъюгат характеризуется тем, что А представляет собой мультивалентную конструкцию, содержащую два, три или четыре антигенсвязывающих фрагмента антитела, соединенных между собой при помощи ковалентной конъюгации с молекулой полиэтиленгликоля.

Указанная задача также решается путем создания фармацевтической композиции для лечения GD2-специфичного опухолевого заболевания, содержащей вышеописанный иммуноконъюгат в терапевтически эффективном количестве, а также фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель. В некоторых вариантах изобретения GD2-специфичным опухолевым заболеванием является нейробластома или другие GD2-позитивные опухоли (глиома, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, саркома).

Указанная задача также решается путем создания способа лечения GD2-специфичного опухолевого заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающего введение субъекту эффективного количества вышеописанной композиции.

Техническим результатом, достигаемым при осуществлении изобретения, является создание нового, эффективного варианта терапевтического агента на основе антител

к ганглиозиду GD2 для лечения GD2-специфичного опухолевого заболевания.

Полученный терапевтический агент обладает рядом свойств, необходимых для его эффективного и безопасного использования, в том числе агент обладает повышенной цитотоксичностью *in vitro* и *in vivo* по отношению к клеткам, содержащим на поверхности ганглиозид GD2. Варианты агента, содержащие антигенсвязывающие фрагменты антитела, но не полноразмерные антитела, характеризуются отсутствием нежелательных эффекторных функций, а также уменьшенным размером, что обеспечивает лучшее проникновение агента в опухолевые ткани. Мультивалентность фрагментов при помощи молекулы ПЭГ придает им стабильность и увеличенное время нахождения в кровотоке.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. А - 12% ПААГ электрофорез химерных антител 14.18 (ch14.18) в восстанавливающих условиях. Дорожка 1 - маркеры, дорожка 2 - ch14.18

Б - 12% ПААГ электрофорез scFv фрагментов 14.18 в восстанавливающих условиях. Дорожка 1 - маркеры, дорожка 2 - scFv 14.18

В - Вестерн-блот scFv фрагментов 14.18. Инкубация с anti-FLAG антителами (1:6000). Визуализация с использованием 1-Step Ultra TMB-Blotting Solution.

Фиг. 2. Структура конъюгата GD2-специфичного антитела с монометил ауристатином Е.

Фиг. 3. А - 12% ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях химерных антител 14.18, scFv фрагментов и конъюгатов антител с лекарством на их основе. 1 - ch14.18-ММАF, 2 - ch14.18, 3 - scFv 14.18, 4 - scFv-ММАЕ.

Б - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения антител ch14.18 и конъюгатов антител с лекарственными препаратами (ADCs) ch14.18-ММАЕ в двух молярных соотношениях антитело:химиопрепарат. После инкубации с HRP-мечеными анти-human антителами (1:6000) реакцию проявляли Ultra TMB-ELISA Substrate Solution.

В - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения антител ch14.18 и ADCs (ch14.18-ММАЕ и ch14.18-ММАF). После инкубации с HRP-мечеными анти-human антителами (1:6000) реакцию проявляли TMB субстратом (субстрат-хромогенная смесь TMB, Иммунотех).

Г - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения scFv-фрагментов антител. После инкубации с HRP-мечеными анти-FLAG антителами (1:6000) реакцию проявляли Ultra TMB-ELISA Substrate Solution.

Фиг. 4. А. Структура конъюгата GD2-специфичного антитела с DM1.

Б - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения антител ch14.18 и ADCs ch14.18-DM1. После инкубации с HRP-мечеными анти-human антителами (1:6000) реакцию проявляли Ultra TMB-ELISA Substrate Solution.

В - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения scFv 14.18 и ADCs scFv 14.18-DM1. После инкубации с HRP-мечеными анти-human антителами (1:6000) реакцию проявляли Ultra TMB-ELISA Substrate Solution.

Г - прямой иммуноферментный анализ, на подложке сорбирован ганглиозид GD2. Добавлены серийные разведения тетра-scFv 14.18 и ADCs тетра-scFv14.18-DM1. После инкубации с HRP-мечеными анти-human антителами (1:6000) реакцию проявляли Ultra TMB-ELISA Substrate Solution.

Фиг. 5. Проточная цитофлуориметрия. Окрашивание клеток линий IMR-32, EL-4 и NGP-127 GD2-связывающими молекулами. Контроль - интактные клетки.

В МТТ-тесте на выбранных GD2-позитивных и GD2-негативных клеточных линиях были проверены цитотоксические эффекты полученных ADCs.

5 Фиг. 6. Оценка клеточной гибели под действием ADCs, несущих MMAE или MMAF.

А - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с ch14.18-MMAE в течение 72 ч. Б - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с ch14.18-MMAF в течение 72 ч. В - МТТ-тест клеток EL-4 инкубированных с ch14.18-MMAE и ch14.18-MMAF в течение 72 ч. Г - МТТ-тест клеток EL-4 инкубированных с scFv 14.18-MMAE и scFv 14.18-MMAF в течение 72 ч.

Фиг. 7. Оценка клеточной гибели под действием ADCs, несущих DM1.

А - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с ch14.18-DM1 в течение 72 ч. Б - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с scFv 14.18-DM1 в течение 72 ч. В - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с di-scFv 14.18-DM1 в течение 72 ч. Г - МТТ-тест клеток EL-4, IMR-32 и NGP-127 инкубированных с tetra-scFv 14.18-DM1 в течение 72 ч.

Фиг. 8. Оценка противоопухолевых эффектов ADCs в мышинной сингенной GD2-позитивной модели рака. После развития опухоли (200-250 мм³) мышам внутривенно вводили антитела ch14.18, ADCs ch14.18-MMAF или физраствор 4 раза с интервалом в 4 дня.

Подробное раскрытие изобретения

Определения и термины

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены некоторые термины, использованные в настоящем описании изобретения.

25 В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Под «субъектом» следует понимать человека или другое млекопитающее.

30 Ганглиозидом GD2 в настоящем описании называется дисиаialogанглиозид, экспрессированный на поверхности опухолевых клеток нейроэктодермального происхождения со следующей IUPAC формулой: (2R,4R,5S,6S)-2-[3-[(2S,3S,4R,6S)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-2-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-6-[(E)-3-hydroxy-2-

35 (octadecanoylamino)octadec-4-enoxy]oxan-3-yl]oxy-3-hydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-4-yl]oxy-3-amino-6-carboxy-4-hydroxyoxan-2-yl]-2,3-dihydroxypropoxy]-5-amino-4-hydroxy-6-(1,2,3-trihydroxypropyl)oxane-2-carboxylic acid.

Термин «антигенсвязывающий, или функциональный, фрагмент антитела» в использованном здесь значении означает один или несколько фрагментов антитела, 40 которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, ганглиозидом GD2). Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела; (iv) два домена Fv-фрагмента, VL и VH, объединённых при помощи синтетического линкера в одну белковую цепь, в которой VL и VH области спариваются с образованием одновалентной конструкции (известна как одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); см., например, Bird et al., *Science*, 1988, 242:

423-426). Указанные фрагменты антител получают обычными методами, известными специалистам в данной области. В предпочтительных вариантах настоящего изобретения антигенсвязывающие фрагменты антител не обладают или обладают сниженными эффекторными функциями; в частности, антигенсвязывающие фрагменты антител могут не содержать Fc-регион.

Некоторые мультивалентные конструкции по настоящему изобретению могут содержать от двух до нескольких антигенсвязывающих фрагментов антител, каждый из которых способен специфически связываться с ганглиозидом GD2; таким образом, содержать два или несколько антиген-связывающих участков. Антигенсвязывающие фрагменты антител в мультивалентной конструкции могут включать переменные области, а также, иногда, константные области, выделенные из последовательностей иммуноглобулинов, специфически связывающих GD2. Предпочтительно, но без обязательных ограничений, антигенсвязывающие фрагменты в составе мультивалентной конструкции по настоящему изобретению не обладают или обладают сниженными эффекторными функциями. Мультивалентность, т.е. способность связывать сразу несколько молекул антигена, обеспечивает конструкции по настоящему изобретению высокую avidность (стабильность взаимодействия между конструкцией и клеткой, экспрессирующей антигены на поверхности), что в свою очередь обеспечивает улучшенные антигенсвязывающие свойства конструкции.

Используемые антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему изобретению могут представлять собой «химерные» или «гуманизированные» фрагменты антител. Химерные фрагменты означают фрагменты антител, которые включают последовательности переменной области тяжелой и/или легкой цепей из одного вида и последовательности константной области из другого вида. Гуманизированные фрагменты означают фрагменты антител, которые включают последовательности фрагментов человеческих антител, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки каркасной области (FR) заменены остатками аналогичных сайтов из антител грызунов.

В некоторых вариантах изобретения антигенсвязывающие фрагменты антител согласно изобретению содержат области тяжелых и/или легких цепей, включающие в себя аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям предпочтительных фрагментов антител, где указанные антигенсвязывающие фрагменты антител сохраняют нужные антигенсвязывающие свойства согласно изобретению (связывание с ганглиозидом GD2 и индукция клеточной гибели). Гомологичные фрагменты антител могут быть получены путем мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредуемого мутагенеза) соответствующих молекул нуклеиновых кислот с последующим тестированием кодируемого модифицированного фрагмента антител на сохранение его функций в соответствии с описанными здесь функциональными анализами.

Используемый здесь термин «процент гомологии двух последовательностей» эквивалентен термину «процент идентичности двух последовательностей». Процент идентичности двух последовательностей определяется числом положений идентичных аминокислот в этих двух последовательностях с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального сопоставления двух последовательностей путем выравнивания. Процент идентичности равен числу идентичных аминокислот в данных положениях с учетом выравнивания последовательностей, разделенному на общее число положений и умноженному на 100. Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть

определен с помощью программы NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Термин «фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель» относится к таким носителям, растворителям и/или наполнителям, которые, являясь неактивными ингредиентами, в рамках проведенного медицинского заключения, пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.д. и отвечают разумному соотношению пользы и риска. «Неактивные ингредиенты» входят в состав лекарственного средства или вакцинного препарата для улучшения его растворимости и/или стабильности, а также для улучшения фармакокинетики и более эффективной доставки к специфическим органам или тканям. Неактивные ингредиенты включают в себя множество веществ, известных специалистам в области фармацевтики, таких как вещества для контроля pH или осмотического давления, антибактериальные агенты, антиоксиданты, поверхностно активные вещества (например, полисорбат 20 или 80), криостабилизаторы, консерванты, растворители, загустители, наполнители, носители (микро- или нано-частицы) и другие вещества.

Термин «терапевтически эффективное количество» подразумевает такое количество фармацевтической композиции, которое при попадании в организм субъекта будет эффективно индуцировать элиминацию клеток опухоли, экспрессирующих ганглиозид GD2. При применении в комбинированной терапии термин «эффективное количество» относится к комбинации количеств активных ингредиентов, прием которых ведет к превентивному или терапевтическому эффекту при последовательном или одновременном приеме. Точное требуемое количество может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от вида млекопитающего, возраста и общего состояния пациента, тяжести заболевания, методики введения препарата, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п. Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем изобретении, может быть введена в организм пациента в любом количестве и любым путем введения, эффективным для лечения и/или профилактики онкологических заболеваний.

Две трети иммуноконъюгатов ADCs, которые проходят клинические испытания, в качестве цитотоксического агента несут два типа антимитотических соединений: ауристатины и мейтансиноиды (Beck, A. & Reichert, J. M. mAbs 2014. 6, 15-17). Этот факт свидетельствует о сложности в подборе цитотоксических молекул, которые бы соответствовали ряду требований, зачастую противоречащих друг другу. Эти требования включают высокий уровень цитотоксического потенциала, относительная гидрофильность, отсутствие восприимчивости к MDR1-опосредованному оттоку, что является основным механизмом резистентности для ADCs (Salomon, P. L. & Singh, R. 2015. Mol. Pharm. 12, 1752-1761). Наиболее часто используемыми цитотоксическими агентами являются антимицротрубчаточные соединения или соединения, повреждающие ДНК (Beck A, et al. Nat Rev Drug Discov 2017; 16:315-37). В первую группу входят аналоги dolastatin 10-based auristatin (Senter PD, Sievers EL. Nat Biotechnol 2012;30:631-7.), мейтансиноиды (maytansinoids) (Amiri-Kordestani L, et al. Clin Cancer Res 2014;20: 4436-41) и тубулизины (tubulysins) (Li JY, et al. Cancer Cell 2016;29:117-29.). Во вторую группу входят аналоги калихеамицина (AppelbaumFR, Bernstein ID. Blood 2017;130:2373-76.) и аналоги дуокармицина (van der Lee MM, et al. Mol Cancer Ther 2015;14:692-703.). Также на клинической стадии разработки ADCs используются другие лекарства, такие как ингибиторы топоизомераз (аналоги камптотецина) (Nakada T., et al. Bioorg Med Chem Lett 2016;26:1542-45.) и ДНК-алкилаторы (пирролбензодиазепины) (Mantaj J, et al. Angew Chem Int Ed Engl 2017;56:462-88.), а также ингибиторы РНК полимеразы II (например,

α-аманитин) (Liu Y, et al. Nature 2015;520:697-701.). Эти агенты были выбраны благодаря их высокой цитотоксичности, таким образом, что они способны разрушать опухолевые клетки в тех внутриклеточных концентрациях, которые достигаются после интернализации ADCs. Эти агенты предпочтительны для использования в настоящем изобретении.

Линкер, используемый в настоящем изобретении для связывания цитотоксического агента с антителом, должен иметь высокую стабильность в циркуляции, поскольку нестабильное связывание может приводить к высвобождению цитотоксического агента еще в кровотоке, что приведет к системной токсичности и снижению эффективности (Thomas A, et al., Lancet Oncol 2016;17:e254-e62.). Тем не менее, он должен обеспечивать эффективное высвобождение лекарственного средства после интернализации ADCs. В настоящее время в клинике используется два основных класса линкеров: расщепляемые и нерасщепляемые. Расщепляемые линкеры могут быть процессированы химически или ферментативно. Было разработано три различных типа механизмов высвобождения: (1) линкеры, чувствительные к кислотной среде, такие как гидразоновые линкеры, которые расщепляются в лизосомах в результате низкого pH (Nolting B. Methods Mol Biol 2013;1045:71-100.); (2) линкеры, чувствительные к лизосомальным протеазам, такие как валин-аланин и валин-цитруллин пептидные линкеры, которые разрезаются лизосомальными ферментами (Dubowchik GM, et al. Bioconjug Chem 2002;13:855-69.); и (3) редокс-чувствительные линкеры, такие как линкеры на основе дисульфидной связи, которые восстанавливаются в цитоплазме (Erickson HK, et al. Bioconjug Chem 2010;21:84-92). Нерасщепляемые линкеры являются высоко стабильными в циркуляции и внутри клетки, таким образом, высвобождение цитотоксического агента зависит от полного протеолитического расщепления антитела в лизосомах после интернализации ADCs. При этом активный катаболит включает цитотоксический агент, присоединенный к линкеру, все еще прикрепленный к аминокислотному остатку антитела (Erickson HK, et al. Cancer Res 2006;66:4426-33.). Примерами нерасщепляемых линкеров могут служить тиоэфирный линкер, используемый в trastuzumab emtansine (Lewis Phillips GD, et al. Cancer Res 2008;68:9280-90.) или малеимидокапроновая кислота, связанная с монометилауристатином F (mc-MMAF), используемая в некоторых ADCs, которые проходят клинические испытания, например depatuxizumab mafodotin (Phillips AC, et al. Mol Cancer Ther 2016;15:661-9).

В качестве одного из подходов в настоящем изобретении предлагается использовать GD2-связывающие фрагменты антител без Fc-домена для элиминации GD2-положительных опухолевых клеток. Ранее авторами было показано, что Fab-фрагменты GD2-специфичных антител сохраняют способность индуцировать клеточную гибель в опухолевых клетках (Doronin II et al., Bull Exp Biol Med, 2013, Mar;154(5):658-63), несмотря на отсутствие Fc-ассоциированных эффекторных функций. Для увеличения продолжительности нахождения фрагментов антител в кровотоке была применена процедура пегилирования - ковалентная конъюгация с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ). Этот метод был неоднократно успешно использован для других белковых молекул. Эта процедура действительно увеличивала продолжительность нахождения GD2-связывающих фрагментов антител в кровотоке, но при этом эффективность индукции клеточной гибели опухолевых клеток не всегда была достаточной.

Неожиданно было обнаружено, что присоединение двух или более GD2-связывающих фрагментов антител к одной молекуле ПЭГ повышает цитотоксические эффекты GD2-связывающих фрагментов антител к клеткам опухоли [Kholodenko IV et al., Molecules 2019, 24(21), 3835]. Такая мультивалентная конструкция также обладает достаточно

длинным временем жизни в кровотоке, и, потенциально, сниженными побочными эффектами на нервные окончания по сравнению со стандартными антителами. Дело в том, что такая конструкция не будет индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность из-за отсутствия Fc-региона; при этом Fc-независимая цитотоксичность сильно зависит от концентрации GD2 на поверхности клетки, поэтому цитотоксичное действие мультивалентной конструкции будет более специфичным по отношению к опухолевым клеткам. Наличие молекулы ПЭГ в составе мультивалентной конструкции улучшает фармакокинетические характеристики молекулы за счет снижения печеночного клиренса и уменьшения поглощения ретикулоэндотелиальной системой; кроме того, пегилирование значительно повышает EPR-эффект (enhanced permeation and retention effect) - свойство препарата преимущественно локализоваться в опухоли при внутривенном введении. Препарат, накопленный в результате пассивной адресной доставки в очаге опухолевого роста, будет активно и избирательно взаимодействовать только с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими ганглиозид GD2. Таким образом, описанная мультимеризация с использованием молекулы ПЭГ повышает как фармакокинетические, так и фармакодинамические свойства фрагментов антител к GD2.

Нижеследующие примеры приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Способы получения используемых в настоящем изобретении фрагментов GD2-специфичных антител были описаны в патенте РФ №2663104, содержание которого включено в данное описание. Также, в патенте РФ №2663104 были представлены данные, подтверждающие улучшение фармакокинетических и фармакодинамических свойств терапевтических агентов, содержащих мультивалентные конструкции фрагментов антител.

Пример 1. Материалы и методы для экспериментов, описанных в данном изобретении.

Культивирование клеток.

Для культивирования эукариотических клеток использовали следующие среды: полная среда (ПС) на основе одной из сред в зависимости от типа клеток: RPMI-1640/RPMI-1640 Hybri-Max/DMEM/EMEM (pH 7,4), содержащих 10% FBS (инактивированная в течение 30 мин при 56°C), 2 mM L-глутамин с добавлением пенициллина/стрептомицина.

Получение кондиционированной среды клеток CHO, продуцирующих GD2-специфичные антитела 14.18, а также scFv фрагменты этих антител. Клетки наращивали до критических для выживания концентраций. Кондиционированные среды из флаконов переносили в 50 мл пробирки и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и переносили в новые пробирки, которые центрифугировали 15 мин при 1000 g для освобождения от клеточного дебриса. Перед выделением антител и фрагментов антител супернатант дополнительно фильтровали через фильтр с порами 0,4 мкм.

Выделение антител и scFv-фрагментов антител.

Для выделения антител из супернатанта использовали колонку с Protein A агарозой из набора реактивов MAbTrap Kit Protein A (GE Healthcare, США). После промывки и активации колонки связывающим буфером на нее наносили кондиционированную среду. Колонку промывали от не связавшихся белков, затем элюировали антитела. Очищенные антитела собирали и проводили две последовательные ионообменные хроматографии.

Для выделения и очистки scFv-фрагментов из кондиционированной среды использовали колонку с Protein L агарозой из набора реактивов HiTrap Protein L (GE Healthcare, США). После промывки и активации колонки связывающим буфером на нее наносили супернатант, содержащий scFv-фрагменты. Колонку промывали от не связавшихся белков, элюцию проводили буфером с pH 3.0, а затем pH раствора доводили до нейтральных значений TRIS буфером. scFv-фрагменты 14.18 переводили в фосфатный буфер (PBS) pH 7.2 на фильтрах Amicon Ultra 10 кДа и стерилизовали фильтрацией через 0.22-мкм мембрану. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на приборе BioDrop μ LITE (BioDrop, UK).

Мультимеризация scFv-фрагментов GD2-специфичных антител через пегилирование.

Для усиления терапевтического потенциала фрагментов GD2-специфичных антител и улучшения их фармакокинетических свойств авторами было использовано сайт-направленное пегилирование, целью которого было не только увеличение времени циркуляции фрагментов в крови, но и усиление цитотоксических свойств за счет получения стабильных мультимеров фрагментов GD2-специфичных антител. Для получения ди-, три- и тетрамеров фрагментов антител использовали стандартные реагенты ПЭГ-малеимид-2 и ПЭГ-малеимид-4 (JenKem Technology USA, США <https://www.jenkemusa.com>). Используемые производные ПЭГ позволяют присоединять к одной молекуле ПЭГ несколько (от 1 до 4) молекул фрагментов.

Для проведения реакции пегилирования scFv-фрагментов моноклональных антител к раствору фрагментов (2.5 мг/мл) в буфере для пегилирования (20 мМ фосфатный буфер, с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, pH 7.5) добавляли стоковый раствор 15 мМ TCEP до достижения конечной концентрации TCEP 0.1 мМ. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 90 мин при аккуратном перемешивании. От восстановителя избавлялись центрифугированием через фильтры Amicon Ultra-4 (максимальная пропускающая способность 10 кДа), либо используя колонки для высаливания Zeba Desalting Columns (TermoFisher, США). Затем к раствору фрагментов антител добавляли соответствующие растворы малеимид-ПЭГ, в различных соотношениях. Инкубация длилась 16-18 ч при комнатной температуре с аккуратным перемешиванием на шейкере. Эффективность пегилирования оценивали с помощью ПААГ-электрофореза. После подбора оптимальных условий проведения пегилирования выход реакций составлял не менее 90%.

Для разделения полученных пегилированных фрагментов и получения чистых фракций, содержащих индивидуальные моно- и мультимеры фрагментов антител, проводили хроматографическую очистку с использованием анионообменной хроматографии или гель-фильтрации.

В одном из вариантов, для разделения полученных продуктов реакций пегилирования фрагментов антител проводили катионообменную хроматографию на колонке TSK-GEL SP-5PW с использованием ВЭЖХ-системы Beckman System gold, подвижная фаза: элюирующий буфер (25 мМ CH₃COOH, pH 4.0), линейный градиент 0 мМ - 250 мМ NaCl (в течение 90 мин при комнатной температуре, скорость потока 1 мл/мин).

Альтернативно, для разделения полученных продуктов реакций пегилирования использовали гель-фильтрацию (эксклюзионную хроматографию) - колонку Superdex 200 10/30 GL и элюент PBS, пропущенный через фильтр 0.22 мкм. Скорость потока 0.6 мл/мин.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и вестерн блот.

Электрофорез проводили в 12% акриламидном геле по методу Леммли. Гель окрашивали красителем Кумасси R250. После проведения электрофореза белки из геля

переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса, используя камеру V10-SDB (Biostep, Германия). Затем проводили блокирование сайтов неспецифического связывания мембраны путем инкубации в 5% растворе сухого обезжиренного молока (Roth, Германия) в течение часа при легком покачивании. После
5 трех отмывок в PBS, содержащем 0.1% Tween 20, проводили инкубацию с HRP-меченными anti-FLAG-специфичными антителами 1:6000 в течение часа. Реакцию визуализации специфических белков на мембране проводили, используя 1-Step Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Scientific, США), согласно методике производителя. Гели и мембраны анализировали на приборе Gel Doc EZ Imager и обрабатывали в программе
10 Image Lab (Bio-Rad).

Получение конъюгатов антител/фрагментов антител с цитотоксическими препаратами MMAE/MMAF

Для получения иммуноконъюгатов ADCs использовали химерные GD2-специфичные антитела 14.18 или scFv фрагменты 14.18 (описанные в патенте РФ №2663104) и конъюгат
15 mc-vc-PAB-MMAE (или mc-vc-PAB-MMAF). Данный конъюгат состоит из малеимидокапроильной группы для связывания с тиольной группой антител, дипептида валин-цитруллин в качестве расщепляемого, чувствительного к лизосомальным ферментам линкера и цитотоксических веществ монометил ауристатина E или F. Для проведения реакции мягкого восстановления цистеиновых мостиков антител и концевого
20 цистеина scFv фрагмента к раствору белков (2.5 мг/мл) в буфере для восстановления (20 мМ фосфатный буфер, с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, pH 6.0) добавляли стоковый раствор 10 мМ TCEP до достижения конечной концентрации TCEP 1 мМ в случае антител и 0.5 мМ в случае фрагментов антител. Инкубацию проводили при
25 комнатной температуре в течение 60 мин при аккуратном перемешивании. От восстановителя избавлялись центрифугированием через фильтры Amicon Ultra-4 (максимальная пропускающая способность 10 кДа), либо используя колонки для высаливания Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, США). Затем к раствору антител или фрагментов антител добавляли соответствующие растворы
30 mc-vc-PAB-MMAE (или mc-vc-PAB-MMAF) в различных молярных соотношениях. Использовали два варианта буферов для сайт-направленной реакции: фосфатный буфер - 20 мМ фосфатный буфер, с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, pH 6.0 или боратный буфер, 1 мМ EDTA, 250 мМ NaCl, pH 8.0. Инкубация длилась 2 ч при комнатной температуре с аккуратным перемешиванием на шейкере. Для очистки ADCs от
35 непрореагировавшего низкомолекулярного компонента (mc-vc-PAB-MMAE или mc-vc-PAB-MMAF) использовали колонки для высаливания Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO, затем конъюгаты стерилизовали фильтрацией через 0.22 мкм мембрану. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на приборе BioDrop μ LITE.

Получение конъюгатов антител/фрагментов антител с цитотоксическим препаратом DM1

Другим форматом для ADCs был выбран конъюгат цитотоксического препарата мейтансиноида DM1 и антитела (фрагмента антитела), связанных между собой
нерасщепляемым линкером сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC). Данный бифункциональный линкер соединяется с цистеином
45 DM1 за счет малеимидной группы, а с аминокетонами лизина фрагмента антитела за счет тиоэфирной группы. При попадании в лизосомы из ADCs высвобождается DM1, который является эффективным антимиотическим агентом, вызывающим гибель клетки даже в очень низких концентрациях.

Конъюгаты антител/фрагментов антител с SMCC-DM1 получали двумя способами.

1) В первом случае GD2-специфичные антитела/фрагменты антител переводили в буфер, содержащий 50 мМ фосфата калия и 2 мМ ЭДТА, pH 7,0. SMCC (MedChemExpress, USA) растворяли в DMSO и добавляли к раствору белка до конечного молярного отношения SMCC / Ab 10: 1. Реакцию проводили в течение 3 часов при комнатной температуре при перемешивании. Затем МСС-модифицированное антитело (фрагмент антитела) очищали на обессоливающей колонке Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO, уравновешенной в 35 мМ цитрате натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0. DM1, растворенный в DMSO, добавляли к соединению МСС-антитело (фрагмент антитела), в молярном отношении DM1 к белку 10:1. Реакцию проводили в течение 4-20 часов при комнатной температуре при перемешивании.

2) Во втором случае GD2-специфичные антитела/фрагменты антител переводили в буфер, содержащий 35 мМ цитрата натрия с 150 мМ NaCl и 2 мМ EDTA, pH 6,0. Конъюгат SMCC-DM1 (MedChemExpress, USA), растворенный в DMSO, добавляли к антителу/фрагменту антител, в молярном отношении DM1 к белку 10:1. Реакцию проводили в течение 4-20 часов при комнатной температуре при перемешивании.

В обоих случаях для очистки ADCs от непрореагировавшего низкомолекулярного компонента использовали колонки для высаливания Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO, затем конъюгаты стерилизовали фильтрацией через 0.22 мкм мембрану. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на приборе BioDrop μ LITE.

Оценка специфичности связывания полученных ADCs с ганглиозидом GD2 в ИФА.

Ганглиозид GD2 раскапывали в лунки 96-ти луночного планшета Greiner ELISA-plate microlon H.V. в 50 мкл этанола. Конечная концентрация ганглиозида составляла 0.1 мкг/лунка. Сорбция ганглиозида проводилась в течение 18 ч при температуре 4°C. Забивку сайтов неспецифического связывания осуществляли в 2% растворе BSA в PBS в течение 1 часа при 37 °C. Лунки промывали в PBS-T (PBS + Tween 0.05%) 3 раза на автоматическом вошере Autowash II (Labsystems, Испания). В лунки добавляли различные разведения ADCs на основе GD2-специфичных антител или их фрагментов в PBS-T. Инкубация с антителами/фрагментами длилась не менее 2 часов при 37°C. После 3 отмывок в PBS-T, в лунки раскапывали анти-видовые HRP-меченные антитела или анти-FLAG HRP-меченные антитела (титр 1:6000). Через 1 час после инкубации при 37 °C и трех отмывок в PBS-T, в лунки вносили 100 мкл проявителя (субстрат-хромогенная смесь TMB, Иммунотех или 1-Step Ultra TMB-ELISA Solution). После развития окрашивания реакцию останавливали внесением в лунки 50 мкл 10% H₂SO₄. Измерение оптической плотности проводили при 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo scientific, США).

Окрашивание клеток GD2-позитивных и GD2-негативных линий GD2-специфичными антителами для проточной цитофлуориметрии.

Клетки GD2-позитивных и GD2-негативных линий отмывали 2 раза в РВА (PBS с добавлением 1% FBS, 0.02% NaN₃). Окрашивание AlexaFluor488-мечеными антителами к GD2 или их фрагментами проводили в 100 мкл в течение 1 часа при 4°C. После двух отмывок в PBS объем образца доводили до 0,5 мл и переносили в цитометрические пробирки для последующего измерения на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США). В каждом образце регистрировали не менее 5×10³ клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Изучение цитотоксических эффектов GD2-специфичных антител и их фрагментов.

МТТ-тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры [Denizot F. J. *ImMunol. Methods.* 1986.]. Клетки инкубировали с ADCs в течение 72 ч, затем центрифугировали (8 мин, 300g), осадок суспендировали и добавляли по 30 мкл/лунка раствора МТТ (5 мг/мл в PBS). После выпадения кристаллов формазана (2-4 ч) его растворяли добавлением 100 мкл DMSO. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре для планшетов Multiscan FC (ThermoScientific, США) при длине волны 540 нм. Построение графиков выполняли в программе SigmaPlot, MS Excel. Представленные результаты являются либо средним значением как минимум трех независимых экспериментов.

Оценка противоопухолевых эффектов ADCs в сингенной GD2-позитивной модели рака.

Клетки EL-4 ($1 \cdot 10^7$) вводились подкожно мышам линии C57BL/6 (самки в возрасте от 12 до 14 недель). При достижении опухолями размеров около 200 мм^3 , мышей случайным образом разделяли на 3 группы (в каждой группе по 5 мышей). В первой экспериментальной группе мыши получали внутривенные инъекции химерных GD2-специфичных антител 14.18 (100 мкг/мышь или 4 мкг/кг), во второй экспериментальной группе мыши получали внутривенные инъекции ADCs ch14.18-MMAF (100 мкг/мышь или 4 мкг/кг). В контрольной группе мыши получали внутривенные инъекции физраствора. Проводили 4 введения с интервалом в 4 дня.

Пример 2. Очистка химерных GD2-специфичных антител и scFv-фрагментов антител.

Анализ экспрессии и очистки химерных GD2-специфичных антител 14.18, а также их scFv-фрагментов проводили методом белкового электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS в восстанавливающих условиях (Фиг.1 А, Б). scFv фрагменты дополнительно анализировали с помощью иммуноблоттинга, используя антитела, специфичные к FLAG-tag (Фиг. 1 В). На электрофорезе антител видны 2 белковые полосы, соответствующие легким и тяжелым цепям иммуноглобулинов (Фиг.1 А), а для фрагментов антител - одна полоса около 27 кДа, что соответствует расчетной массе scFv фрагмента. Данный белок также эффективно связывает анти-FLAG антитела (Фиг. 1В), что подтверждает наличие FLAG-tag, включенного в состав конструкции. Секретируемый белок после очистки был представлен преимущественно в мономерной форме, несмотря на то, что в структуру молекулы был включен концевой цистеин. В тоже время для предотвращения возможной димеризации фрагментов с "незакрытыми" концевыми цистеинами проводили экзогенное закрытие концевого цистеина путем добавления окисленного глутатиона. Продукция и чистота выделенных химерных GD2-специфичных антител и scFv фрагментов были на достаточно высоком уровне.

Пример 3. Создание конъюгатов химерных GD2-специфичных антител и scFv фрагментов с цитотоксическими препаратами MMAE и MMAF.

Для получения ADCs проводили конъюгацию малеимид активированного линкера, несущего MMAE или MMAF, с тиольными группами цистеиновых мостиков в случае химерных антител или с концевым цистеином scFv фрагментов. Общая структура конъюгата антитела с MMAE представлена на Фиг. 2.

Были подобраны молярные соотношения антител/фрагментов антител и конструкций, несущих MMAE (или MMAF), а также оптимальный буфер для проведения сайт-направленной реакции. В результате подбора условий на одну молекулу антитела приходилось в среднем 4 молекулы цитотоксического вещества ($n=4$), а с молекулой scFv фрагмента связывалась только одна молекула лекарственного препарата ($n=1$), что определялось дизайном конструкции фрагмента, в который включен один концевой

цистеин. На Фиг. 3А представлены результаты электрофоретического разделения химерных антител 14.18 (Ch14.18), scFv фрагментов 14.18 и конъюгатов антител с лекарством на их основе. Конъюгация линкера, несущего цитотоксическое соединение ММАЕ, с антителами и фрагментами антител не привела к значительному изменению молекулярной массы, что является ожидаемым в силу низкой молекулярной массы конструкции (1330 Да) и пришивки от 1 до 4 таких молекул на 1 молекулу антитела или фрагмента антитела. Конъюгация не приводила к образованию агрегатов или, напротив, к разрушению белка. Однако пришивка таких конъюгатов могла повлиять на антиген-связывающие характеристики полноразмерных GD2-специфичных антител и scFv фрагментов. Поэтому была проведена оценка связывания полученных ADCs с ганглиозидом GD2 в сравнении с исходными GD2-связывающими молекулами. Результаты прямого ИФА представлены на Фиг. 3Б-Г.

Как видно из Фиг. 3, сайт-направленная конъюгация препаратов ММАЕ и ММАФ не значительно повлияла на способность GD2-связывающих молекул взаимодействовать с ганглиозидом GD2 и можно заключить, что данный подход получения ADCs оправдан и перспективен, поскольку антитела 14.18, а также их scFv фрагменты сохраняют антиген-связывающую способность после проведения модификаций по тиольным группам белка. Также было показано, что для всех вариантов полученных ADCs специфичность не менялась и не наблюдалась кросс-реактивности с другими ганглиозидами (GD3, GM2 и GD1b) даже при высоких концентрациях конъюгатов.

Пример 4. Создание конъюгатов химерных GD2-специфичных антител и scFv фрагментов с цитотоксическим препаратом DM1.

Общая структура конъюгата антитела с DM1 представлена на Фиг. 4А. В данном случае пришивка DM1 происходит случайным образом по аминокислотным группам лизинов, входящих в состав антитела или фрагмента антител. В структуре антител 14.18 лизины представлены как в константных частях, так и в переменных доменах. Пришивка молекул лекарственного препарата в антиген-связывающей области антитела способна снизить или полностью воспрепятствовать взаимодействию с антигеном. Поэтому подбор оптимальных молярных соотношений лекарственного препарата DM1 и белка являлся важной задачей, особенно в случае scFv фрагментов антител, поскольку в их состав входят только переменные домены антитела. В результате подбора условий на одну молекулу антитела приходилось в среднем 4-5 молекулы цитотоксического вещества, а с молекулой scFv фрагмента без значительного снижения взаимодействия с антигеном связывалась максимум 1-2 молекулы DM1. Для мультимерных фрагментов антител в результате подбора условий получилось повысить число n до 4-5. Оценка связывания полученных ADCs с ганглиозидом GD2 в сравнении с исходными GD2-связывающими молекулами представлены на Фиг. 4Б, В и Г.

Пример 5. Цитотоксические эффекты ADCs в экспериментах *in vitro*.

На первом этапе были подобраны несколько GD2-позитивных и -негативных клеточных линий. На Фиг. 5 представлено цитофлуориметрическое окрашивание клеток человеческой нейробластомы IMR-32, мышшиной лимфомы EL-4 и человеческой нейробластомы NGP-127 GD2-специфичными антителами, из которого видно, что линия NGP-127 является GD2-негативной, а линии IMR-32 и EL-4 - GD2-позитивные, причем экспрессия GD2 на клетках EL-4 выше, чем на клетках линии IMR-32.

Из представленных данных видно, что ADCs, содержащие лекарственные препараты ММАЕ или ММАФ, индуцируют значительный уровень клеточной гибели только в клетках линий, несущих GD2, и не действуют на GD2-негативные клетки в выбранном диапазоне концентраций (Фиг. 5А, Б). Концентрация, ингибирующая на 50%

выживаемость клеток (IC50%) для линии EL-4 составляла 65 pM в случае инкубации с ch14.18-ММАF (включающие полноразмерные химерные антитела) и 310 pM в случае инкубации с ch14.18-ММАЕ (Фиг. В). Данные очень низкие значения IC50% вероятно являются синергичным эффектом действия цитотоксического химиопрепарата и GD2-специфичных антител, которые обладают собственной прямой цитотоксической активностью. Для клеток EL-4 конъюгат с препаратом ММАF оказался более эффективным, чем ADC с ММАЕ. Данная закономерность была характерна как для GD2-специфичных антител, так и для scFv фрагментов 14.18. В целом, цитотоксическая активность scFv фрагментов была значительно ниже полноразмерных антител, что вероятно связано с более низкой аффинностью фрагментов к GD2 и с тем, что в конъюгат на основе scFv включена только одна молекула цитотоксического препарата, тогда как в ADC полноразмерного антитела входит в среднем 4 молекулы препарата. В тоже время получение ADCs на основе фрагментов антител имеет значительный потенциал и перспективы, поскольку именно этот формат антител способен улучшить терапевтический индекс конъюгатов антител с лекарством за счет улучшения фармакокинетических характеристик и снижения побочных эффектов. Мы получили мультимерные пегелированные фрагменты антител, сочетающие в себе преимущества полноразмерных антител и моновалентных фрагментов антител. Их время циркуляции в крови и аффинность сопоставима или даже превосходит полноразмерные антитела, они лишены Fc-опосредованных побочных эффектов и характеризуются лучшим накоплением в опухоли за счет меньших размеров. В дальнейшей работе пегелированные фрагменты будут использованы нами для создания ADCs, наряду с оптимизацией ADCs на основе полноразмерных антител.

ADCs, содержащие лекарственный препарат DM1, также индуцируют значительный уровень клеточной гибели только в клетках линий, несущих GD2 с незначительным воздействием на GD2-негативные клетки в выбранном диапазоне концентраций (Фиг. 7). ADCs на основе антител с конъюгированным DM1 индуцируют клеточную гибель с незначительно меньшей эффективностью по сравнению с ADCs, несущими ММАЕ и ММАF. Цитотоксическая активность ADCs, содержащих мономерные scFv фрагменты, оказалась схожей при использовании обоих вариантов лекарственных препаратов.

Мультимеризация фрагментов антител приводила к усилению антиген-связывающей способности фрагментов антител и, потенциально, к увеличению цитотоксических свойств молекул. В то же время важными параметрами для проявления противоопухолевых эффектов терапевтических молекул является их размер и масса. Например, молекулы с массой более 150 кДа имеют ограниченный потенциал в клинике в силу неспособности проходить через стенки сосудов. В связи с этим, мультимеры фрагментов антител с молекулярной массой более 150 кДа не использовались в дальнейшей работе. Под данное ограничение не попадали и были проанализированы в последующих цитотоксических тестах моно-, ди- и тетра-scFv-ПЭГ, а также моно- и ди-Fab-ПЭГ.

В работе было показано, что ADCs с мультимерными фрагментами антител индуцируют клеточную гибель опухолевых клеток значительно сильнее, чем ADCs на основе мономерных фрагментов (Фиг. 7).

Пример 6. Противоопухолевые эффекты ch14.18-ММАF в сингенной GD2-позитивной модели рака.

Поскольку клеточная линия EL-4 была получена из мышей линии C57BL/6 и для нее характерен высокий уровень экспрессии ганглиозида GD2, то данные клетки были использованы для создания сингенной модели рака для изучения противоопухолевых

эффектов созданных ADCs. Опухолевые клетки вводили мышам подкожно. Для эксперимента был выбран конъюгат полноразмерного антитела ch14.18 с цитотоксическим препаратом MMAF, поскольку он проявил максимальную активность в экспериментах *in vitro*. В качестве контроля были созданы 2 группы мышей, которым после развития опухоли, внутривенно вводили исходные “голые” антитела или физраствор в качестве отрицательного контроля (Фиг. 8).

Рост опухолей в мышах был крайне агрессивным и характеризовался экспоненциальным ростом. Вероятно, это связано с высокой пролиферацией клеток EL-4, так в культуре удвоение этих клеток происходит за 8 часов, хотя для большинства клеточных линий клеточный цикл составляет около 18-20 часов. В данном эксперименте наблюдался противоопухолевый эффект исходных антител, но он был незначительным и, в целом, не влиял на развитие опухолевого процесса. В отличие от исходных антител, конъюгат антитела с лекарством значительно замедлял рост опухоли в данной группе мышей, а у одной мыши этой группы была зафиксирована полная элиминация опухоли. Кроме того, следует отметить, что явных токсических эффектов у здоровых мышей на введение ADCs в концентрации 10 мкг/кг не было зафиксировано.

Таким образом, в данном изобретении были наработаны и очищены GD2-специфичные антитела и scFv-фрагменты GD2-специфичных антител. Были отработаны методики и получены конъюгаты антител/фрагментов антител с лекарственными препаратами (ADCs). Была проведена оценка цитотоксических эффектов полученных ADCs, показавшая их высокую селективность и эффективность цитотоксического действия. Проведенные эксперименты на сингенной модели рака показали неожиданные и значительные противоопухолевые эффекты полученных иммуноконъюгатов ADCs, что открывает перспективы использования этих иммуноконъюгатов для терапии GD2-позитивных онкологических заболеваний.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ООО Реал Таргет
 <120> СОЗДАНИЕ КОНЪЮГАТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ И ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ
 <160> 8
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H-CDR1
 <400> 1
 Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H-CDR2
 5 <400> 2
 Asp Pro Tyr Tyr Gly
 1 5
 <210> 3
 <211> 4
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H-CDR3
 <400> 3
 15 Gly Met Glu Tyr
 1
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> L-CDR1
 <400> 4
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 25 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> L-CDR2
 <400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 35 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> L-CDR3
 <400> 6
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr
 1 5 10
 <210> 7
 45 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

RU 2733 430 C1

<223> VH-CH1hum-C

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 5 Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 20 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 25 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 30 210 215

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> VL-CLhum2

<400> 8

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 45 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

				85					90					95				
	Thr	His	Val	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu		
				100					105					110				
5	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp		
			115					120					125					
	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn		
			130				135					140						
	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu		
	145					150					155					160		
10	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp		
				165						170				175				
	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr		
				180					185				190					
	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser		
15			195				200					205						
	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
			210				215					220						

(57) Формула изобретения

- 20 1. Иммуноконъюгат для лечения GD2-позитивных онкологических заболеваний, обладающий общей формулой А-(Л-Ц)_n, где
- (а) А - антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, специфически связывающий ганглиозид GD2, или мультимер фрагментов антитела, который включает в себя от одного до четырех антигенсвязывающих фрагмента антитела, каждый из которых специфически связывает ганглиозид GD2, имеющие тяжёлую цепь, содержащую Н-CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:1, Н-CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:2 и НCDR3 с SEQ ID NO:3, и лёгкую цепь, содержащую L-CDR1 с последовательностью SEQ ID NO:4, L-CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:5 и L-CDR3 с SEQ ID NO:6;
- 30 (б) Л является линкером;
- (в) Ц является цитотоксическим или цитостатическим агентом; и
- (г) n варьирует от 1 до 8.
2. Иммуноконъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что тяжёлая цепь содержит переменный домен с последовательностью, гомологичной по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO:7.
3. Иммуноконъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что лёгкая цепь содержит переменный домен с последовательностью, гомологичной по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO:8.
4. Иммуноконъюгат по п.1, характеризующийся тем, что цитотоксический или цитостатический агент выбран из группы производных доластинов или мейтансиноидов.
- 40 5. Иммуноконъюгат по п. 4, характеризующийся тем, что цитотоксический или цитостатический агент выбран из группы: метил ауристатин Е, метил ауристатин F, метил ауристатин D, мейтансиноид DM4 или мейтансиноид DM1.
6. Иммуноконъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что А представляет собой мультивалентную конструкцию, содержащую два, три или четыре антигенсвязывающих фрагмента антитела, каждый из которых специфически связывает ганглиозид GD2, соединённых между собой при помощи ковалентной конъюгации с молекулой полиэтиленгликоля.

7. Композиция для лечения GD2-специфичного опухолевого заболевания, содержащая, по меньшей мере, иммуноконъюгат по любому из пп. 1-6 в терапевтически эффективном количестве, а также фармацевтически приемлемый носитель, растворитель и/или наполнитель.

5 8. Композиция по п.7, характеризующаяся тем, что GD2-специфичным опухолевым заболеванием является нейробластома, глиома, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы или саркома.

9. Способ лечения GD2-специфичного опухолевого заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества
10 композиции по п.7.

15

20

25

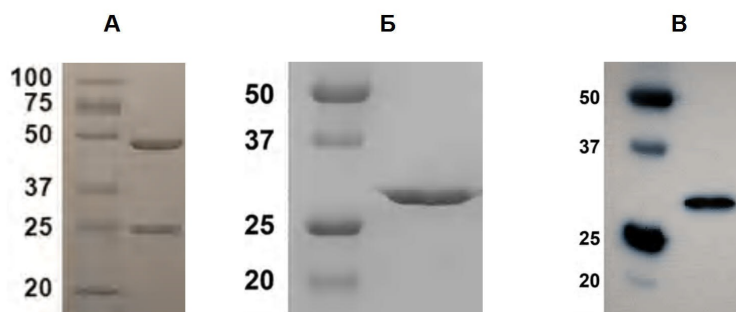
30

35

40

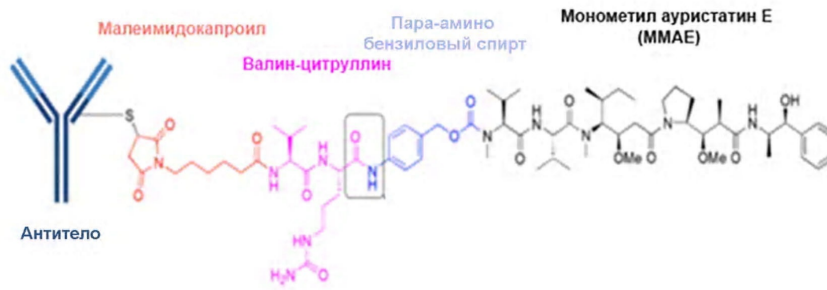
45

1

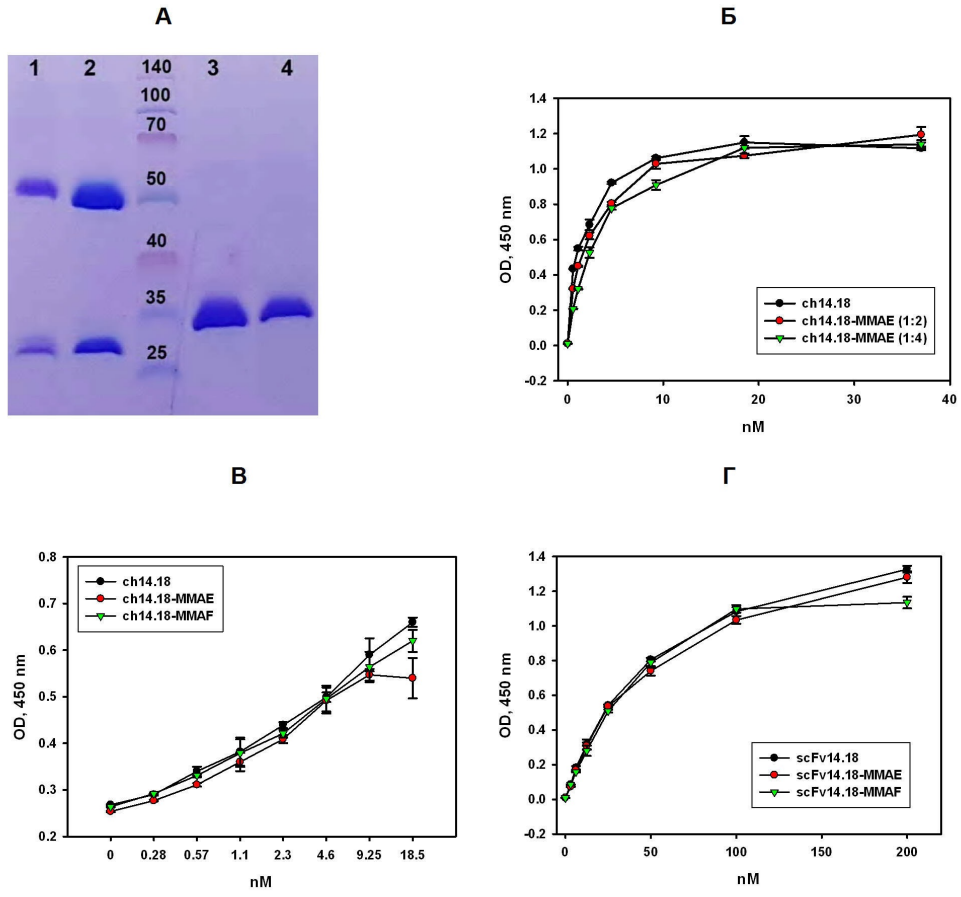


Фиг.1

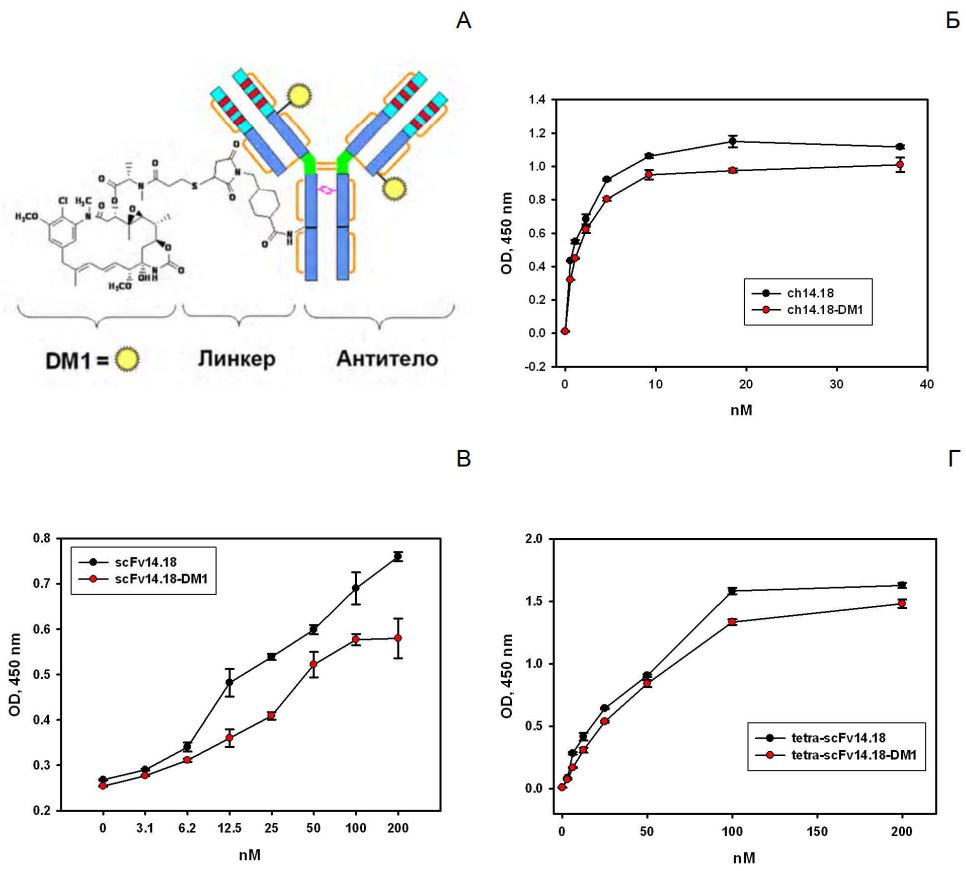
2



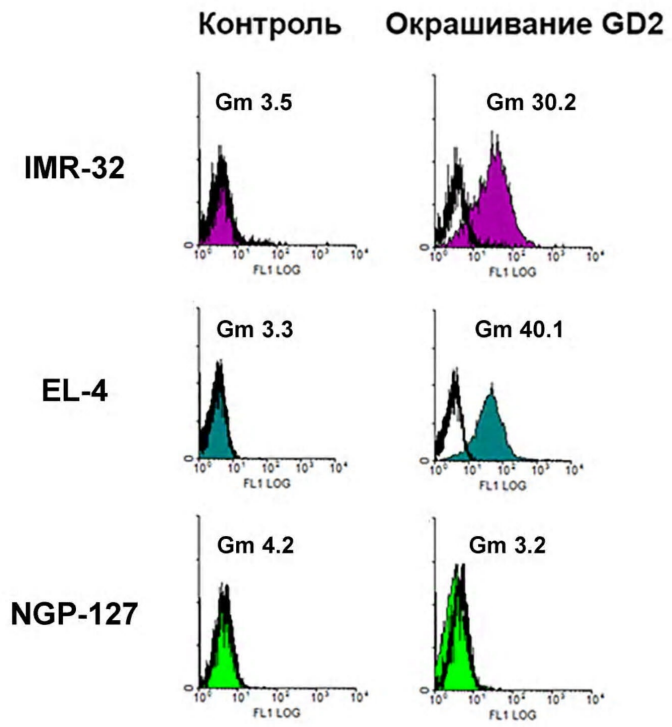
Фиг.2



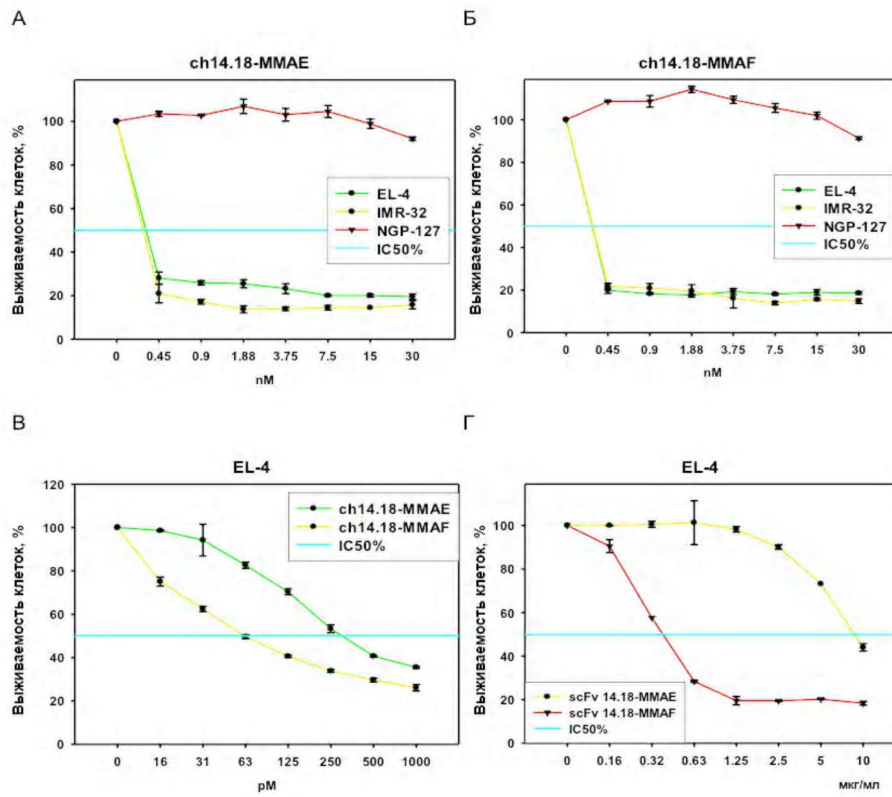
Фиг.3



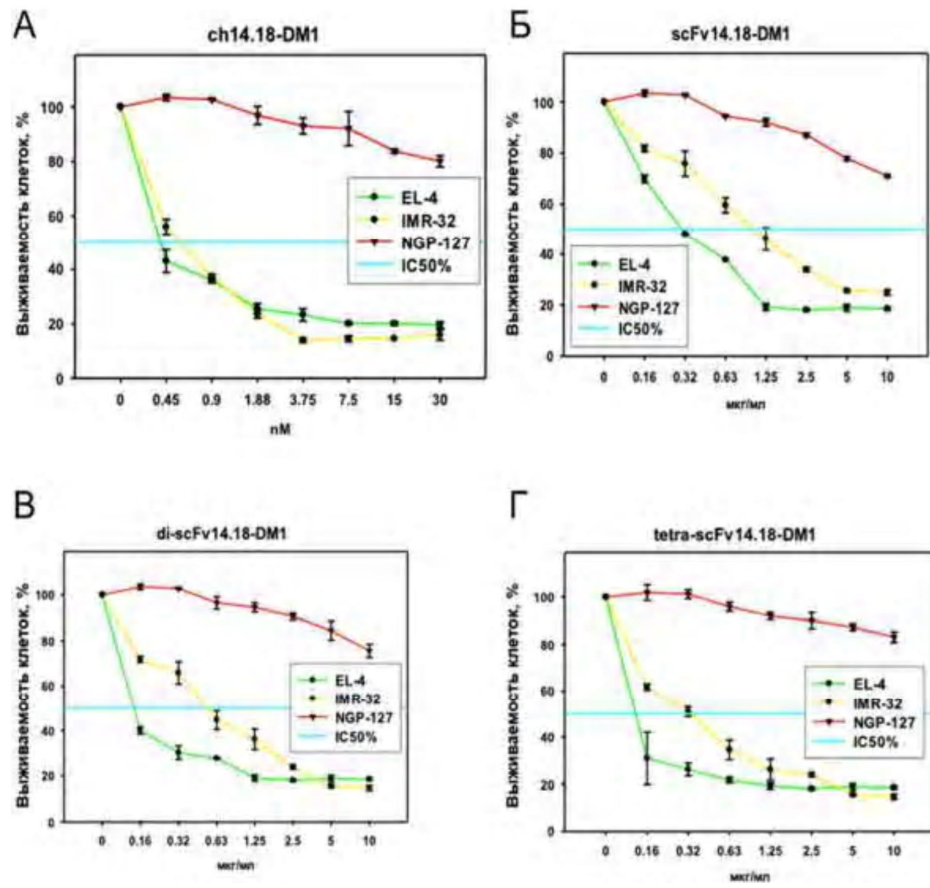
Фиг.4



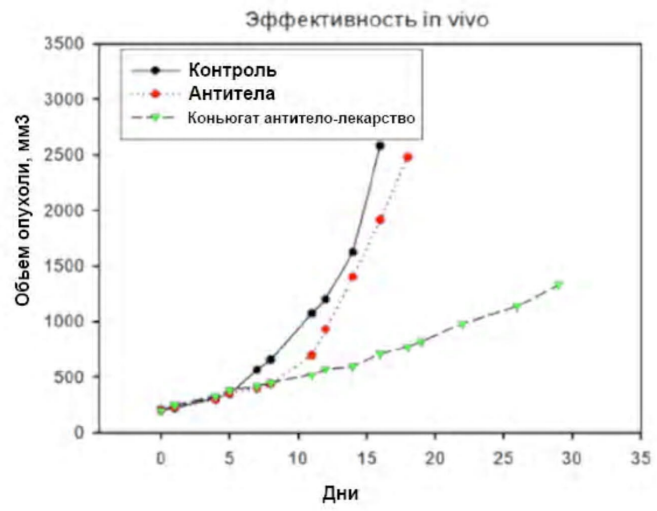
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8