

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 3661562 DAL TITOLO:  
"METODO DI CONIUGAZIONE DI CYS-MAB"

\*\*\* \*\*

DESCRIZIONE

**CAMPO DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione riguarda un metodo per incappucciare, ridurre e ossidare Cys-mAb al fine di fornire materiale omogeneo per successive reazioni di coniugazione.

**STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE**

Le biomolecole coniugate sono una gamma diversificata di sostanze che comprendono molteplici molecole precursori, almeno una delle quali è derivata da un sistema biologico. Nella maggior parte dei casi, il componente/i componenti di origine biologica è/sono prodotto/i usando tecniche di DNA ricombinante. Nell'industria farmaceutica, le biomolecole coniugate sono state studiate come trattamenti per una varietà di condizioni mediche. In questi casi, il coniugato può offrire numerosi benefici terapeutici, combinando le proprietà utili di due o più molecole precursore in una singola entità.

Una classe di bioconiugati farmaceutici particolarmente di successo è quella dei coniugati di anticorpo, detti anche coniugati farmaco-anticorpo. Queste molecole consistono in un anticorpo, tipicamente derivato da colture cellulari di mammifero, e da una molecola sintetica con attività biologica o farmacologica. Diversi coniugati anticorpo-farmaco sono stati approvati come terapie contro il cancro e

molti altri sono in fase di sviluppo clinico e preclinico. Tutti i coniugati anticorpo-farmaco finora approvati vengono prodotti usando una chimica aspecifica che produce una miscela di molecole di coniugati.

I prodotti farmaceutici basati su coniugati di anticorpi sito-specifici, dove una molecola sintetica è attaccata a siti definiti nella molecola dell'anticorpo, possono offrire benefici terapeutici nonché un controllo di qualità e/o una vita a scaffale migliorati. Sono stati quindi intrapresi numerosi sforzi per sviluppare metodi per produrre coniugati di anticorpi sito-specifici. Un approccio comune alla coniugazione sito-specifica è l'uso di un anticorpo con mutazione di cisteina (Cys-mAb o Thiomab), nel quale un nuovo amminoacido di cisteina viene introdotto nella struttura primaria dell'anticorpo. Questa cisteina ingegnerizzata può essere usata come sito per coniugare una molecola sintetica.

Jagath R Junutula et al., "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index", *Nature Biotechnology*, vol. 26, n. 8 (2008), concerne l'ingegnerizzazione di sostituzioni di cisteina in posizioni sulle catene leggere e pesanti di anticorpi che forniscono gruppi tiolo reattivi e non perturbano il ripiegamento e l'assemblaggio delle immunoglobuline, né alterano il legame all'antigene.

Christopher R Behrens et al., "Methods for site-specific drug conjugation to antibodies", *MABS*, vol. 6, n. 1 (2014), riguarda metodi per la coniugazione sito-specifica di farmaci con anticorpi e confronta i risultati in vivo con le loro controparti coniugate in modo aspecifico.

WO 2016/067013 A1 riguarda un metodo in fase solida per la sintesi di coniugati biomolecola-farmaco.

WO 2009/012256 A1 riguarda anticorpi umanizzati e coniugati contro CD79b utili per il trattamento di un tumore emopoietico nei mammiferi.

WO 2005/084390 A2 concerne coniugati proteina-farmaco e metodi per realizzare coniugati proteina-farmaco e coniugati marcati con proteina, nonché proteine aventi punti di coniugazione per ricevere un farmaco o una marcatura.

WO 2018/136440 A1 riguarda metodi per trattare malattie e disturbi metabolici usando una composizione comprendente una proteina legante l'antigene specifica per il polipeptide di GIPR coniugato a un agonista del recettore di GLP-1.

WO 2017/137628 A1 concerne un processo per la riduzione selettiva di anticorpi ingegnerizzati con cisteina. WO 2015/086853 A1 riguarda metodi per ottenere un coniugato di proteina in cui un residuo di cisteina della proteina funge da punto di attacco per la frazione chimica coniugata alla proteina.

WO 2017/055582 A1 concerne coniugati di proteina e, in particolare, coniugati di più di due proteine o polipeptidi.

La coniugazione sito-specifica con una proteina Cys-mAb richiede la catena laterale di cisteina ingegnerizzata nella forma di tiolo ridotto. Tuttavia, quando gli anticorpi vengono isolati da colture cellulari di mammifero, la cisteina ingegnerizzata viene generalmente

"incappucciata" come un disolfuro misto con un tiolo citoplasmatico come il glutatione. Perciò, aggiungere direttamente la molecola sintetica reattiva non produrrà il coniugato, poiché la catena laterale della cisteina ingegnerizzata non è disponibile per la reazione.

Una riduzione selettiva in un unico passaggio per rimuovere il cappuccio sarebbe altamente desiderabile, ma, al momento, non è fattibile a causa della somiglianza chimica tra il disolfuro misto e i disolfuri strutturali nell'anticorpo. Quando un agente riducente viene aggiunto al Cys-mAb per rimuovere i cappucci, anche una porzione degli altri disolfuri nell'anticorpo verrà ridotta, e i tioli risultanti possono reagire per formare coniugati in sedi indesiderate.

Di conseguenza, permane una necessità di modi efficaci e affidabili per produrre coniugati di anticorpi ingegnerizzati con cisteina che offrano un'alta resa e una qualità del prodotto costante.

### **SOMMARIO DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione è definita nelle rivendicazioni allegate.

In un aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo; b) esporre l'anticorpo o il frammento di anticorpo a un agente bloccante la cisteina, in cui l'agente bloccante la cisteina è cisteamina e l'agente bloccante la cisteina forma un disolfuro misto stabile con almeno un residuo di cisteina dell'anticorpo o del frammento di anticorpo; c)

aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3''-trisolfonato

("TPPTS"); d) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; ed e) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c) viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina. In un aspetto, dopo il passaggio c) e prima del passaggio d) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione. In un aspetto, dopo il passaggio e), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un disolfuro misto comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata che comprende un cappuccio di cisteamina; b) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"); c) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e d) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio a) e prima del passaggio b) viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina. In un aspetto, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione. In un

aspetto, dopo il passaggio d), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un disolfuro misto comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata che comprende un cappuccio di cisteamina; b) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"); c) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e d) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio a) e prima del passaggio b) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente. In un aspetto, dopo il passaggio c), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In una forma di realizzazione, il disolfuro misto è un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata. Nel metodo dell'invenzione, l'anticorpo o il frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata comprende un cappuccio, in cui il cappuccio è cisteamina. Nel metodo dell'invenzione, l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"). In una forma di realizzazione, il rapporto tra agente riducente e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-4:1 (moli/moli). In una forma di realizzazione, l'agente ossidante è acido deidroascorbico ("DHAA"). In una forma di realizzazione, il rapporto tra agente ossidante e anticorpo o frammento di anticorpo è 3-6 : 1 (moli/moli)). In una forma di realizzazione, la frazione chimica attivata è un peptide comprendente un alogeno, in cui l'alogeno è selezionato dal gruppo consistente in Br, I e Cl). In una forma di realizzazione, il rapporto tra frazione chimica attivata e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-3:1 (moli/moli).

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento di anticorpo comprende un residuo di cisteina in una posizione selezionata dal gruppo consistente in D70 della catena leggera di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 7; E276 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8; e T363 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8.

### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

Figura 1. Tipico Cys-mAb (IgG1) consistente in quattro catene di polipeptide (due catene leggere, due catene pesanti) tenute insieme da 16 legami disolfuro nativi (mostrati in verde). Le cisteine aggiuntive ingegnerizzate nell'anticorpo recano due disolfuri aggiuntivi (mostrati in arancione). La riduzione selettiva dei disolfuri ingegnerizzati in presenza di altri 16 disolfuri nativi sarebbe altamente desiderabile, ma non è fattibile (in un singolo passaggio).

Figura 2. La riduzione selettiva netta può essere effettuata in due passaggi. (1) Il passaggio di riduzione assicura la completa "rimozione del cappuccio" dei disolfuri ingegnerizzati; vengono anche clivati alcuni legami disolfuro nativi. (2) Il passaggio di ossidazione ripristina la struttura nativa della IgG1. Prima dell'ossidazione è necessaria l'eliminazione mediante UF/DF del tiolo liberato nel passaggio di riduzione (R-SH) per evitare un "nuovo incappucciamento".

B

Figura 3. Un Cys-mAb "con cappuccio rimosso" subisce facilmente la coniugazione sito-selettiva con agenti alchilanti (ad esempio derivati di bromoacetammide di peptide).

Figura 4. Confronto diretto delle prestazioni di riduzione di una coppia abbinata (CA + TCEP) e di una coppia non abbinata (MES + TCEP).

Figura 5. Formazione di Cys-mAb "con cappuccio rimosso" nel tempo. Condizioni di reazione: 10 g/L di Cys-mAb incappucciato con cisteamina nel tampone specificato a pH 5,0, 3,5 equivalenti di fosfina (TPPTS, TPPDS o TCEP), TA. Miscela di reazione monitorata mediante cromatografia a scambio cationico e quantificata a 280 nm. In questa figura è rappresentato graficamente solo un Cys-mAb "con cappuccio rimosso".

Figura 6. Il processo di coniugazione basato sulla cisteamina consente quantità quasi stechiometriche di reagenti per la riduzione, l'ossidazione e l'alchilazione, a procurare un coniugato mAb-peptide con un contenuto uniforme di PAR2 (ad esempio  $\geq 95\%$ ).

### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione fornisce un metodo per incappucciare, ridurre e ossidare Cys-mAb al fine di fornire materiale omogeneo per successive reazioni di coniugazione. Il presente metodo dimostra metodi affidabili per produrre coniugati di anticorpi ingegnerizzati con cisteina che offrono un'alta resa e una qualità del prodotto costante.

Si è scoperto che le "cisteine libere" sono punti di attacco adatti per le coniugazioni di vari gruppi modificatori di proprietà. Nella presente, una cisteina libera si riferisce a un residuo di cisteina che non è impegnato in un normale legame disolfuro tra due cisteine di uno o due polipeptidi. Solitamente, una cisteina libera è una cisteina che è stata introdotta in una sequenza di polipeptide di interesse mediante mutagenesi sito-selettiva, ma alcune proteine possono, in alternativa, includere una cisteina in una posizione adatta. Come descritto in precedenza, una cisteina aggiunta può essere un punto di attacco adatto per un gruppo modificatore di proprietà su una proteina. Introducendo un residuo di cisteina solitamente viene ottenuta una cisteina libera, poiché nella proteina non è presente alcun partner per la formazione di un legame disolfuro.

In un aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo; b) esporre l'anticorpo o il frammento di anticorpo a un agente bloccante la cisteina, in cui l'agente bloccante la cisteina è cisteamina e l'agente bloccante la cisteina forma un disolfuro misto stabile con almeno un residuo di cisteina dell'anticorpo o del frammento di anticorpo; c) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un

B

frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"); d) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; ed e) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c) viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per incrementare l'omogeneità dell'anticorpo e rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina. In un aspetto, dopo il passaggio c) e prima del passaggio d) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere i cappucci (tioli) rilasciati e per rimuovere l'agente riducente. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione. In un aspetto, dopo il passaggio e), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere qualsiasi eccesso della frazione chimica attivata e per incrementare la purezza dell'anticorpo o del coniugato di frammento di anticorpo. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un disolfuro misto comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata che comprende un cappuccio di cisteamina; b) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"); c) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e d) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio a) e prima del passaggio b) viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina. In un aspetto, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere i cappucci e l'eccesso di agente riducente. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è

ultrafiltrazione/diafiltrazione. In un aspetto, dopo il passaggio d), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo, il metodo comprendendo i passaggi di: a) ottenere una composizione comprendente un disolfuro misto comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata che comprende un cappuccio di cisteamina; b) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"); c) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e d) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

In un aspetto, dopo il passaggio a) e prima del passaggio b) viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente. In un aspetto, dopo il passaggio c), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata. In una forma di realizzazione, il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione. In una forma di realizzazione, il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

In una forma di realizzazione, il disolfuro misto è un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata. Nel metodo dell'invenzione, l'anticorpo o il frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata comprende un cappuccio, in cui il cappuccio è cisteamina. Nel metodo dell'invenzione, l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS"). In una forma di realizzazione, il rapporto tra agente riducente e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-4:1 (moli/moli). In una forma di realizzazione, l'agente ossidante è acido deidroascorbico ("DHAA"). In una forma di realizzazione, il rapporto tra agente ossidante e anticorpo o frammento di anticorpo è 3-6:1 (moli/moli). In una forma di realizzazione, la frazione chimica attivata è un peptide comprendente un alogeno, in cui l'alogeno è selezionato dal gruppo consistente in Br, I e Cl). In una forma di realizzazione, il rapporto tra frazione chimica attivata e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-3:1 (moli/moli).

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento di anticorpo comprende un residuo di cisteina in una posizione selezionata dal gruppo consistente in D70 della catena leggera di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 7; E276 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8; e T363 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8.

Un sito di coniugazione "disponibile alla coniugazione" significa che la catena laterale del residuo di amminoacido nel sito di coniugazione selezionato reagirà con la frazione funzionale aggiuntiva di interesse (o con un linker attaccato in modo covalente alla frazione funzionale aggiuntiva), nelle condizioni chimiche definite, risultando in un legame covalente tra la frazione funzionale aggiuntiva (direttamente o tramite il linker) e la catena laterale come prodotto di reazione principale.

I disolfuri sono legami covalenti tra due atomi di zolfo che possono essere presenti in molecole differenti (o nella stessa). Nelle proteine, i residui di cisteina possono essere collegati tramite un legame disolfuro, chiamato anche cistina.

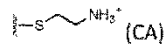
Al fine di essere un bersaglio efficace di una reazione di coniugazione, la cisteina libera deve essere nella forma ridotta. Per lo stesso motivo, una proteina con una cisteina libera può essere difficile da produrre e viene perciò spesso ottenuta come un disolfuro misto includente una piccola frazione organica. I disolfuri misti sono molecole che includono un disolfuro, simile al legame disolfuro tra due residui di

amminoacidi cisteina, ciascuno incluso in una sequenza di polipeptide (che può essere la stessa o meno). La piccola frazione organica è definita Cappuccio nella presente e il disolfuro misto è perciò una molecola proteina-S-S-Cappuccio. Nella presente domanda, il termine "disolfuri misti" viene usato per molecole che comprendono un legame disolfuro che collega due entità differenti che non sono entrambe polipeptidi, sebbene le molecole possano anche includere legami disolfuro "ordinari" in aggiunta al disolfuro misto.

In una forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione include un passaggio di riduzione di una molecola di proteina-S-S-Cappuccio poiché la proteina soggetta a coniugazione viene ottenuta sotto forma di una composizione di molecola di proteina-S-S-Cappuccio.

Come descritto sopra, il Cappuccio è solitamente derivato da una piccola frazione organica, includente almeno un atomo di zolfo che fa parte del legame disolfuro del disolfuro misto. Tali frazioni organiche possono esistere come monomeri nella forma ridotta o come dimeri nella forma ossidata. Nel disolfuro misto, -S-Cappuccio è perciò la forma ossidata del monomero o metà di un dimero. -S-Cappuccio è derivato da cisteamina/cistamina (che è una cistina decarbossilata) e il disolfuro misto è perciò Proteina-S-S-cist, dove cist si riferisce a metà di una cistamina. Il Cappuccio di proteina S-S-Cappuccio è derivato da cisteamina.

Il cappuccio è



Come descritto sopra, l'obiettivo della riduzione è ottenere una molecola con una cisteina ridotta libera (-SH) che sia reattiva in una reazione di coniugazione.

In una forma di realizzazione, il disolfuro misto è una molecola di proteina-S-S-Cappuccio in cui la proteina-S è derivata da una proteina comprendente una cisteina libera.

Al fine di ottenere una proteina con un atomo di zolfo reattivo, un agente riducente viene aggiunto alla composizione di disolfuro misto e la miscela viene incubata per lasciare che si verifichi la riduzione per ottenere una proteina con un atomo di zolfo reattivo, ad esempio una proteina ridotta nel formato: proteina-S-H. I passaggi descritti sono a) ottenere una composizione di un disolfuro misto comprendente la proteina, b) aggiungere un agente riducente a detta composizione di proteina, c) lasciare che si verifichi la riduzione e ottenere una soluzione comprendente una proteina ridotta (P-SH).

In una forma di realizzazione l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3''-trisolfonato di trisodio (TPPTS).

Una volta che il disolfuro misto è stato ridotto si è ottenuta una soluzione comprendente una proteina ridotta (P-SH). Prima della successiva coniugazione, può essere utile rimuovere l'agente riducente e/o la molecola di Cappuccio rilasciata. In una forma di realizzazione, può

B

essere incluso un passaggio facoltativo per rimuovere piccole molecole, come molecole con un peso molecolare al di sotto di 10 kDa, dalla soluzione comprendente la proteina ridotta (P-SH). In una forma di realizzazione, le molecole con un peso molecolare al di sotto di 10 kDa vengono rimosse dalla soluzione comprendente la proteina ridotta mediante diafiltrazione.

In una reazione di coniugazione, una frazione chimica è legata in modo covalente all'atomo di zolfo della cisteina libera della proteina ridotta (proteina-SH). La frazione chimica può essere qualsiasi frazione adatta alla coniugazione con una proteina, come una frazione modificatrice di proprietà. La frazione modificatrice di proprietà può essere una frazione chimica in grado di alterare una o più peculiarità della proteina di interesse. In una forma di realizzazione, la frazione chimica è un gruppo modificatore di proprietà, come una frazione chimica in grado di stabilizzare la proteina, aumentare l'emivita in circolo o aumentare la potenza. In una forma di realizzazione, la frazione chimica è un agente di protrazione. Affinché la coniugazione avvenga in modo efficace, la frazione chimica può essere usata in forma attivata. Nel metodo secondo l'invenzione come descritto sopra nella presente, una frazione chimica attivata viene aggiunta alla soluzione comprendente la proteina ridotta e la coniugazione della frazione chimica alla proteina ridotta risulta nella preparazione di una proteina coniugata. Perciò, il metodo secondo l'invenzione include i seguenti ulteriori passaggi: aggiungere una frazione chimica attivata alla soluzione comprendente la proteina ridotta, lasciare

che si verifichi la reazione di coniugazione e ottenere una preparazione di detta proteina coniugata.

La frazione chimica può essere qualsiasi frazione adatta alla coniugazione con una proteina, come una frazione modificatrice di proprietà. La frazione modificatrice di proprietà può essere una frazione chimica in grado di alterare una o più peculiarità della proteina di interesse. In una forma di realizzazione, la frazione chimica è un peptide e/o un ligando con o senza una sequenza linker. In una forma di realizzazione, la frazione chimica è un gruppo modificatore di proprietà, come una frazione chimica in grado di stabilizzare la proteina, aumentare l'emivita in circolo o aumentare la potenza. In una forma di realizzazione, la frazione chimica è un legante di albumina. Affinché la coniugazione avvenga in modo efficace, la frazione chimica può essere usata in forma attivata. Nel metodo secondo l'invenzione come descritto sopra nella presente, una frazione chimica attivata viene combinata con la proteina ridotta e la coniugazione della frazione chimica alla proteina ridotta risulta nella preparazione di una proteina coniugata tramite un atomo di zolfo.

La frazione chimica è preferibilmente una frazione chimica attivata, il che significa una frazione che è in grado di reagire con la proteina-SH formando una molecola di proteina-S-frazione chimica. Tali frazioni chimiche attivate possono includere reagenti di alchilazione elettrofila soft includenti gruppi maleimide o aloacetile, noti nell'arte.

In una forma di realizzazione, la frazione chimica attivata è una frazione chimica alogenata, come un ligando di peptide alogenato. La frazione chimica alogenata può includere Br, I o Cl.

In una forma di realizzazione, la frazione chimica attivata è un legante di albumina alogenata (AB-alo).

Al fine di avere una riduzione efficace del disolfuro misto viene solitamente applicato un eccesso di agente riducente in concentrazioni molari. Mediante aggiunta dell'agente riducente alla composizione del disolfuro misto viene ottenuta una miscela di riduzione. La quantità di agente riducente può essere espressa in equivalenti della quantità del disolfuro misto, in modo che, nel caso in cui la quantità di agente riducente sia 1 equivalente della quantità di disolfuro misto, le concentrazioni molari del disolfuro misto e dell'agente riducente nella miscela siano uguali.

In una forma di realizzazione, la quantità di agente riducente aggiunta è da circa 2 equivalenti molari a circa 4 equivalenti molari della quantità molare del disolfuro misto.

Al fine di ridurre la quantità di sovra-riduzione dell'anticorpo o del frammento di anticorpo, è vantaggioso ridurre la quantità richiesta, il che, come descritto nella presente, è possibile se i passaggi di processo sono ottimizzati. Una reazione di riduzione efficace che usi quantità inferiori di agente riducente richiede che le condizioni di reazione rimanenti siano attentamente selezionate, come fornito dalla presente invenzione.

La riduzione del disolfuro misto può richiedere minuti o ore, a seconda delle condizioni. Il tecnico del ramo saprà che condizioni differenti risultano in efficacia differente e, perciò, il tempo e le condizioni necessarie per ottenere una riduzione completa o quasi completa del disolfuro misto sono descritti più dettagliatamente negli Esempi di seguito.

L'agente riducente può essere aggiunto come concentrato o semplicemente aggiungendo l'agente come polvere solida alla composizione di disolfuro misto. L'agente riducente viene miscelato con la composizione di disolfuro misto per avviare la riduzione. La miscela può essere definita miscela di riduzione.

Al fine di ottenere un processo sufficientemente efficace, la riduzione deve risultare almeno in una riduzione dell'80%, come almeno in una riduzione del 90%, della quantità totale di disolfuro misto. In tali casi, la riduzione è considerata soddisfacente quando la quantità del disolfuro misto è al massimo il 20%, ad esempio al massimo il 10%, della quantità di disolfuro misto nella miscela di riduzione. In forme di realizzazione preferite, può essere ottenuta una riduzione intorno al 95% del disolfuro misto, lasciando intorno al 5% di disolfuro misto non ridotto nella soluzione comprendente la proteina ridotta. In un'ulteriore forma di realizzazione, un processo efficace lascia al massimo il 2% di disolfuro misto entro un tempo adatto.

La riduzione può verificarsi in un arco di tempo di almeno 15 minuti, come almeno 30 minuti o come almeno 1 ora. In una forma di

B

realizzazione, la miscela di riduzione viene lasciata per 2-10 ore, ad esempio 3-6 ore o circa 3-4 ore, dopo l'aggiunta dell'agente riducente.

In una forma di realizzazione, la riduzione viene eseguita fino a 24 ore, come fino a 12 ore, come fino a 8 ore, come fino a 6 ore, come fino a 4 ore.

La riduzione può, in una forma di realizzazione, aver luogo a 1-50 °C, come a temperatura ambiente, come a 18-25 °C. In forme di realizzazione alternative, la riduzione può essere eseguita a una temperatura più fredda, come al di sotto di 10 °C, come intorno a 4-6 °C.

Prima di procedere con il passaggio di coniugazione, la proteina ridotta può essere separata dalla miscela di riduzione, come dall'eccesso di agente riducente e/o dalla piccola molecola organica del disolfuro misto, ad esempio l'H-S-Cappuccio della proteina con una cisteina libera incappucciata. Questo passaggio facoltativo può essere un passaggio per rimuovere molecole con un basso peso molecolare, come molecole con un peso molecolare al di sotto di 10 kDa.

Il tecnico del ramo è a conoscenza di vari metodi per rimuovere composti a basso peso molecolare, ad esempio mediante filtrazione usando una membrana adatta. In una forma di realizzazione, il metodo comprende un passaggio di scambio di tampone (ultrafiltrazione/diafiltrazione).

L'efficacia di un passaggio di diafiltrazione, ad esempio la quantità di piccole molecole ed eccipienti che vengono rimossi, è correlata al volume di filtrato generato, rispetto al volume di retentato. Si

noti inoltre che, in questo contesto, la parola "rimuovere" deve essere letta come "ridurre la concentrazione di", poiché quantità residue di molecole a basso peso molecolare ed eccipienti saranno solitamente presenti dopo un passaggio di diafiltrazione (o passaggi di processo alternativi) che "rimuovono" le molecole con un basso peso molecolare.

Prima di procedere con il passaggio di coniugazione, la proteina ridotta viene ossidata al fine di diminuire la quantità di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto.

Al fine di avere un'ossidazione efficace dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto, viene solitamente applicato un eccesso dell'agente ossidante in concentrazioni molari. Mediante aggiunta dell'agente ossidante alla composizione dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto viene ottenuta una miscela ossidata. La quantità di agente ossidante può essere espressa in equivalenti della quantità di anticorpo o di frammento di anticorpo sovra-ridotto, in modo che, nel caso in cui la quantità di agente ossidante sia 1 equivalente della quantità di disolfuro misto, le concentrazioni molari del disolfuro misto e dell'agente riducente nella miscela siano uguali.

In una forma di realizzazione, la quantità dell'agente ossidante aggiunta è da circa 3 equivalenti molari a circa 6 equivalenti molari della quantità molare dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto.

A seconda delle condizioni, l'ossidazione dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto può richiedere minuti o ore. Il tecnico del ramo è a conoscenza di condizioni differenti che risulteranno

in efficacia differente e, perciò, il tempo e le condizioni necessari per ottenere un'ossidazione completa o quasi completa dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto sono descritti più dettagliatamente negli Esempi di seguito.

L'agente ossidante può essere aggiunto come concentrato o semplicemente aggiungendo l'agente come polvere solida alla composizione di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto. L'agente ossidante viene miscelato con la composizione di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto per avviare l'ossidazione. La miscela può essere definita miscela di ossidazione.

Al fine di avere un processo sufficientemente efficace, l'ossidazione deve risultare in almeno 80% di ossidazione, come almeno 90% di ossidazione, della quantità totale di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto. In tali casi, l'ossidazione è considerata soddisfacente quando la quantità dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto è al massimo il 20%, come al massimo il 10%, della quantità di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto nella miscela di ossidazione. In forme di realizzazione preferite, può essere ottenuta un'ossidazione intorno al 95% dell'anticorpo o del frammento di anticorpo sovra-ridotto, lasciando circa il 5% di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto nella soluzione comprendente la proteina ossidata. In un'ulteriore forma di realizzazione, un processo efficace lascia al massimo il 2% di anticorpo o frammento di anticorpo sovra-ridotto entro un tempo adatto.

L'ossidazione può verificarsi in un arco di tempo di almeno 15 minuti, come almeno 30 minuti o come almeno 1 ora. In una forma di realizzazione, la miscela di ossidazione viene lasciata per 2-10 ore, ad esempio 3-6 ore o circa 3-4 ore, dopo l'aggiunta dell'agente ossidante.

In una forma di realizzazione, l'ossidazione viene eseguita fino a 24 ore, come fino a 12 ore, come fino a 8 ore, come fino a 6 ore, come fino a 4 ore.

L'ossidazione può, in una forma di realizzazione, aver luogo a 1-50 °C, come a temperatura ambiente, come a 18-25 °C. In forme di realizzazione alternative, la riduzione può essere eseguita a una temperatura più fredda, come al di sotto di 10 °C, come intorno a 2-8 °C. In una forma di realizzazione, l'agente ossidante è acido deidroascorbico.

Come descritto sopra, la coniugazione, secondo il metodo, viene eseguita aggiungendo una frazione chimica attivata alla soluzione comprendente la proteina ridotta.

Se la riduzione precedente non è completa, il rapporto tra proteina ridotta e disolfuro misto può impedire una reazione di coniugazione ad alta resa. Per di più, la presenza di un eccesso di agente riducente e di molecole di Cappuccio rilasciate può interferire con la reazione di coniugazione.

Di nuovo, il rapporto relativo tra i reagenti, ad esempio la proteina ridotta e la frazione chimica attivata, influenza l'efficienza della reazione.

In una forma di realizzazione, la concentrazione molare della frazione chimica attivata è almeno uguale alla, o può essere il doppio

della, concentrazione molare della proteina da coniugare. Ciò può anche essere espresso in equivalenti, ad esempio possono essere usati almeno 10, come 8, come 6, come 4, come 2 o come almeno uno (1), equivalenti della frazione chimica attivata rispetto alla proteina da coniugare. Poiché la frazione chimica attivata può essere una risorsa costosa, è vantaggioso ridurre la quantità richiesta, il che, come descritto nella presente, è possibile se i passaggi precedenti sono ottimizzati. Una reazione di coniugazione efficace che usa quantità ridotte della frazione chimica attivata richiede che le condizioni di reazione rimanenti siano attentamente selezionate, come fornito dalla presente invenzione. In una forma di realizzazione, la quantità di frazione chimica attivata è al massimo 8 equivalenti della proteina, ad esempio al massimo 6, come al massimo 4, come al massimo 3, come al massimo 2,5, come al massimo 2, come al massimo 1,5 equivalenti della proteina da coniugare.

A seconda delle condizioni, la coniugazione della proteina ossidata con la frazione chimica può richiedere minuti o ore. Il tecnico del ramo sa che condizioni differenti risulteranno in efficacia differente e, perciò, il tempo necessario per ottenere una coniugazione completa o quasi completa varierà in base alle condizioni, come verrà descritto più dettagliatamente nella presente di seguito. Secondo il presente metodo, la reazione di coniugazione è considerata soddisfacente quando la quantità del materiale di partenza, ad esempio la proteina ridotta, raggiunge il 10%, come il 5% o preferibilmente il 2% o meno.

La frazione chimica attivata può essere aggiunta come concentrato o semplicemente aggiungendo l'agente come polvere solida alla soluzione contenente la proteina ossidata. In una forma di realizzazione, la frazione chimica attivata viene disciolta in una soluzione adatta prima di aggiungere la frazione chimica attivata alla soluzione comprendente la proteina ossidata. Potrebbe anche darsi che la frazione chimica venga attivata in una soluzione prima della reazione di coniugazione.

Il termine "frazione estendente l'emivita" si riferisce a una frazione, un dominio o un "veicolo" farmaceuticamente accettabile collegata/o in modo covalente o coniugata/o al dominio Fc e/o a una frazione farmaceuticamente attiva che previene o mitiga la degradazione proteolitica in vivo o altre modifiche chimiche che riducono l'attività della frazione farmaceuticamente attiva, aumenta l'emivita o altre proprietà farmacocinetiche come, ma senza limitarsi, aumenta il tasso di assorbimento, riduce la tossicità, migliora la solubilità, aumenta l'attività biologica e/o la selettività per il bersaglio della frazione farmaceuticamente attiva rispetto a un bersaglio di interesse, aumenta la producibilità e/o riduce l'immunogenicità della frazione farmaceuticamente attiva (ad esempio, una frazione peptidica o non peptidica), rispetto a una forma non coniugata della frazione farmaceuticamente attiva. Il polietilenglicole (PEG) è un esempio di una molecola estendente l'emivita utile. Altri esempi della frazione estendente l'emivita, in conformità all'invenzione, includono un copolimero di

etilenglicole, un copolimero di propilenglicole, una carbossimetilcellulosa, un polivinilpirrolidone, un poli-1,3-diossolano, un poli-1,3,6-triossano, un copolimero di etilene e anidride maleica, un poliamminoacido (ad esempio, polilisina), un destrano n-vinilpirrolidone, un poli n-vinilpirrolidone, un omopolimero di propilenglicole, un polimero di ossido di propilene, un polimero di ossido di etilene, un poliolo poliossietilato, un alcol polivinilico, una catena glicosilata lineare o ramificata, un poliacetale, un acido grasso a catena lunga, un gruppo alifatico idrofobico a catena lunga, un dominio F<sub>c</sub> di immunoglobulina (si veda, ad esempio, Feige et al., Modified peptides as therapeutic agents, brevetto statunitense n. 6,660,843), un'albumina (ad esempio, albumina sierica umana; si veda, ad esempio, Rosen et al., Albumin fusion proteins, brevetto statunitense n. 6,926,898 e US 2005/0054051; Bridon et al., Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components, US 6,887,470), una transtiretina (TTR; si veda, ad esempio, Walker et al., Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins, US 2003/0195154 A1; 2003/0191056 A1), o una globulina legante la tiroxina (TBG).

Altre forme di realizzazione della frazione estendente l'emivita utile, in conformità all'invenzione, includono ligandi peptidici o ligandi a piccola molecola (organica non peptidica) che hanno affinità di legame per una proteina sierica a lunga emivita in condizioni fisiologiche di temperatura, pH e forza ionica. Esempi includono un peptide legante

l'albumina o un ligando a piccola molecola, un peptide legante la transtiretina o un ligando a piccola molecola, un peptide legante la tiroxina o un ligando a piccola molecola, un peptide legante anticorpo o un ligando a piccola molecola, o un altro peptide o un ligando a piccola molecola che ha un'affinità per una proteina sierica a lunga emivita. (Si vedano, ad esempio, Blaney et al., Method and compositions for increasing the serum half-life of pharmacologically active agents by binding to transthyretin-selective ligands, brevetto statunitense n. 5,714,142; Sato et al., Serum albumin binding moieties, US 2003/0069395 A1; Jones et al., Pharmaceutical active conjugates, brevetto statunitense n. 6,342,225). Una "proteina sierica a emivita lunga" è una delle centinaia di differenti proteine disciolte nel plasma sanguigno dei mammiferi, incluse le cosiddette "proteine trasportatrici" (come albumina, transferrina e aptoglobina), fibrinogeno e altri fattori della coagulazione sanguigna, componenti del complemento, immunoglobuline, inibitori enzimatici, precursori di sostanze come angiotensina e bradichinina e molti altri tipi di proteine. L'invenzione racchiude l'uso di qualsiasi singola specie di frazione estendente l'emivita farmaceuticamente accettabile, come, ma senza limitarsi, quelle descritte nella presente, o l'uso di una combinazione di due o più differenti frazioni estendenti l'emivita.

I metodi con polipeptidi e acidi nucleici ricombinanti usati nella presente, inclusi gli esempi, sono generalmente quelli esposti in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 1989) o Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., curatori, Green Publishers Inc. e Wiley and Sons 1994).

Le intestazioni di sezione usate nella presente sono soltanto a scopo organizzativo e non devono essere interpretate come limitanti l'argomento in oggetto descritto.

Se non diversamente definito nella presente, i termini scientifici e tecnici usati in relazione alla presente domanda avranno i significati comunemente compresi dai comuni tecnici del ramo. Inoltre, salvo diversamente richiesto dal contesto, i termini singolari includeranno pluralità e i termini plurali includeranno il singolare.

In generale, le nomenclature usate in connessione con, e le tecniche di, coltura di cellule e tessuti, biologia molecolare, immunologia, microbiologia, genetica e chimica e ibridazione di proteine e acidi nucleici descritte nella presente sono quelle ben note e comunemente usate nell'arte. I metodi e le tecniche della presente domanda sono generalmente eseguiti secondo metodi convenzionali ben noti nell'arte e come descritto in vari riferimenti generali e più specifici che sono menzionati e discussi nella presente descrizione, salvo indicato diversamente. Si veda, ad esempio, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow e Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Le reazioni enzimatiche e le tecniche di

purificazione vengono eseguite secondo le indicazioni del produttore, come comunemente realizzato nell'arte o come descritto nella presente. La terminologia usata in connessione con, e le procedure e le tecniche di, laboratorio di chimica analitica, chimica organica sintetica e chimica medicinale e farmaceutica descritte nella presente è quella ben nota e comunemente usata nell'arte. Per le sintesi chimiche, le analisi chimiche, la preparazione, formulazione ed erogazione farmaceutica, e il trattamento dei pazienti è possibile usare tecniche standard.

Salvo quanto riportato negli esempi operativi, o laddove diversamente indicato, tutti i numeri che esprimono quantitativi di ingredienti o condizioni di reazione usati nella presente devono essere intesi come modificati in tutti i casi dal termine "circa". Il termine "circa", quando usato in relazione alle percentuali, può significare  $\pm 1\%$ .

Per convenzione, secondo l'uso fattone nella presente, "un/una/un'/uno" significano "uno/a o più", salvo diversa indicazione specifica.

Secondo l'uso fattone nella presente, i termini "amminoacido" e "residuo" sono intercambiabili e, quando usati nel contesto di un peptide o di un polipeptide, si riferiscono ad amminoacidi sia presenti in natura sia sintetici, nonché ad analoghi degli amminoacidi, mimetici degli amminoacidi e amminoacidi non presenti in natura che sono chimicamente simili agli amminoacidi presenti in natura.

Un "amminoacido naturale" è un amminoacido che è codificato dal codice genetico, così come quegli amminoacidi che sono codificati

dal codice genetico che sono modificati dopo la sintesi, ad esempio idrossiprolina,  $\gamma$ -carbossiglutamato e O-fosfoserina. Un analogo di amminoacido è un composto che ha la stessa struttura chimica di base di un amminoacido naturale, ossia un carbonio  $\alpha$  che è legato a un idrogeno, un gruppo carbossile, un gruppo ammino e un gruppo R, ad esempio omoserina, norleucina, metionina solfossido, metionina metil solfonio. Tali analoghi possono avere gruppi R modificati (ad esempio, norleucina) o scheletri peptidici modificati, ma manterranno la stessa struttura chimica di base di un amminoacido presente in natura.

Un "mimetico di amminoacido" è un composto chimico che ha una struttura che è differente dalla struttura chimica generale di un amminoacido, ma che funziona in modo simile a un amminoacido presente in natura. Esempi includono un derivato di metacrilato o acrilato di un'amide,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -amminoacidi (come acido piperidin-4-carbossilico) e simili.

Un "amminoacido non presente in natura" è un composto che ha la stessa struttura chimica di base di un amminoacido presente in natura, ma non è incorporato in una catena polipeptidica in crescita dal complesso di traduzione. "Amminoacido non presente in natura" include anche, ma senza limitarsi, amminoacidi che si verificano mediante modifica (ad esempio, modifiche post-traduzionali) di un amminoacido codificato naturalmente (inclusi, ma senza limitarsi, i 20 amminoacidi comuni) ma che non sono essi stessi incorporati naturalmente in una catena di polipeptide in crescita dal complesso di traduzione. Un elenco

non limitativo di esempi di amminoacidi non presenti in natura che possono essere inseriti in una sequenza di polipeptide o sostituiti con un residuo di tipo selvatico in una sequenza di polipeptide include  $\beta$ -amminoacidi, omoamminoacidi, amminoacidi ciclici e amminoacidi con catene laterali derivatizzate. Esempi includono (nella forma L o D; abbreviati come tra parentesi): citrullina (Cit), omocitrullina (hCit),  $N\alpha$ -metilcitrullina (NMeCit),  $N\alpha$ -metilomocitrullina ( $N\alpha$ -MeHoCit), ornitina (Orn),  $N\alpha$ -metilornitina ( $N\alpha$ -MeOrn o NMeOrn), sarcosina (Sar), omolisina (hLys o hK), omoarginina (hArg o hR), omoglutammina (hQ),  $N\alpha$ -metilarginina (NMeR),  $N\alpha$ -metilleucina ( $N\alpha$ -MeL o NMeL),  $N$ -metilomolisina (NMeHoK),  $N\alpha$ -metilglutammina (NMeQ), norleucina (Nle), norvalina (Nva), 1,2,3,4-tetraidroisochinolina (Tic), acido ottaidroindolo-2-carbossilico (Oic), 3-(1-naftil)alanina (1-Nal), 3-(2-naftil)alanina (2-Nal), 1,2,3,4-tetraidroisochinolina (Tic), 2-indanilglicina (Igl), para-iodofenilalanina (pI-Phe), para-amminofenilalanina (4AmP o 4-Ammino-Phe), 4-guanidino fenilalanina (Guf), glicillisina (abbreviato "K(N $\epsilon$ -glicile)" o "K(glicile)" o "K(gly)"), nitrofenilalanina (nitrofe), amminofenilalanina (amminofe o Ammino-Phe), benzilfenilalanina (benzilfe), acido  $\gamma$ -carbossigliutammico ( $\gamma$ -carbossiglu), idrossiprolina (idrossipro), p-carbossil-fenilalanina (Cpa), acido  $\alpha$ -amminoadipico (Aad),  $N\alpha$ -metil valina (NMeVal),  $N$ - $\alpha$ -metil leucina (NMeLeu),  $N\alpha$ -metilnorleucina (NMeNle), ciclopentilglicina (Cpg), cicloesilglicina (Chg), acetilarginina (acetilarg), acido  $\alpha$ ,  $\beta$ -diamminopropionico (Dpr), acido  $\alpha$ ,  $\gamma$ -diamminobutirrico (Dab), acido diamminopropionico (Dap),

B

cicloesilalanina (Cha), 4-metil-fenilalanina (MePhe),  $\beta$ ,  $\beta$ -difenil-alanina (BiPhA), acido amminobutirrico (Abu), 4-fenil-fenilalanina (o bifenilalanina; 4Bip), acido  $\alpha$ -ammino-isobutirrico (Aib), beta-alanina, acido beta-amminopropionico, acido piperidinico, acido amminocaprioico, acido aminoeptanoico, acido amminopimelico, desmosina, acido diamminopimelico, N-etilglicina, N-etilaspargina, idrossilisina, allo-idrossilisina, isodesmosina, alloisoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, 4-idrossiprolina (Hyp),  $\gamma$ -carbossilglutammato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetillisina,  $\epsilon$ -N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilistidina, 5-idrossilisina,  $\omega$ -metilarginina, acido 4-ammino-O-ftalico (4APA), e altri aminoacidi simili, e forme derivatizzate di qualsiasi di quelli specificatamente elencati.

Il termine "molecola di acido nucleico isolato" si riferisce a un polimero a singolo o doppio filamento di basi deossiribonucleotidiche o ribonucleotidiche lette dall'estremità 5' a quella 3', o un suo analogo, che è stato separato da almeno circa il 50 per cento di polipeptidi, peptidi, lipidi, carboidrati, polinucleotidi o altri materiali con cui l'acido nucleico si trova naturalmente quando l'acido nucleico totale viene isolato dalle cellule di origine. Preferibilmente, una molecola di acido nucleico isolato è sostanzialmente priva di qualsiasi altra molecola di acido nucleico contaminante o di altre molecole che si trovano nell'ambiente naturale dell'acido nucleico che potrebbero interferire con il suo uso nella

produzione di polipeptidi o con il suo uso terapeutico, diagnostico, profilattico o di ricerca.

Il termine "polipeptide isolato" si riferisce a un polipeptide che è stato separato da almeno il 50 per cento circa di polipeptidi, peptidi, lipidi, carboidrati, polinucleotidi o altri materiali con cui il polipeptide si trova naturalmente quando isolato da una cellula di origine. Preferibilmente, il polipeptide isolato è sostanzialmente privo di qualsiasi altro polipeptide contaminante o di altri contaminanti che si trovano nel suo ambiente naturale che potrebbero interferire con il suo uso terapeutico, diagnostico, profilattico o di ricerca.

Una composizione della presente invenzione che include un farmaco o un peptide collegato, attaccato o legato, direttamente o indirettamente tramite una frazione linker, a un altro anticorpo o frammento di anticorpo è un "coniugato" o una molecola "coniugata".

Il termine "codificante" si riferisce a una sequenza polinucleotidica codificante uno o più amminoacidi. Il termine non richiede un codone di avvio o di arresto.

I termini "identico/a" e percentuale di "identità", nel contesto di due o più acidi nucleici o sequenze di polipeptide, si riferiscono a due o più sequenze o sotto-sequenze che sono le stesse sequenze. Per "percentuale di identità" significa la percentuale di residui identici tra gli amminoacidi o i nucleotidi nelle molecole confrontate e viene calcolata in base alla dimensione della più piccola delle molecole confrontate. Per questi calcoli, eventuali gap negli allineamenti (se presenti) possono

essere affrontati mediante un particolare modello matematico o programma per computer (ossia un "algoritmo"). I metodi che possono essere usati per calcolare l'identità degli acidi nucleici o dei polipeptidi allineati includono quelli descritti in Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), (1988) New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, (Griffin, A. M., e Griffin, H. G., curatori), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., (1987) Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. e Devereux, J., curatori), 1991, New York: M. Stockton Press; e Carillo et al., (1988) SIAM J. Applied Math. 48:1073.

Nel calcolo dell'identità percentuale, le sequenze confrontate vengono allineate in un modo che dà la massima corrispondenza tra le sequenze. Il programma per computer usato per determinare la percentuale di identità è il pacchetto di programmi GCG, che include GAP (Devereux et al., (1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). L'algoritmo per computer GAP viene usato per allineare i due polipeptidi o polinucleotidi per i quali la percentuale di identità di sequenza deve essere determinata. Le sequenze vengono allineate per la corrispondenza ottimale del loro rispettivo amminoacido o nucleotide (la "copertura corrispondente", come determinato dall'algoritmo). Una penalità di apertura di gap (che viene calcolata come 3 volte la diagonale media, in cui la "diagonale media" è

la media della diagonale della matrice di confronto usata; la "diagonale" è il punteggio o il numero assegnato a ogni corrispondenza perfetta di amminoacidi dalla particolare matrice di confronto) e una penalità di estensione di gap (che solitamente è 1/10 volte la penalità di apertura di gap), nonché una matrice di confronto come PAM 250 o BLOSUM 62 vengono usate unitamente all'algoritmo. In alcune forme di realizzazione, anche una matrice di confronto standard (si veda, Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 per la matrice di confronto PAM 250; Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 per la matrice di confronto BLOSUM 62) viene usata dall'algoritmo.

I parametri consigliati per determinare la percentuale di identità per polipeptidi o sequenze di nucleotidi usando il programma GAP sono i seguenti:

Algorithm: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Matrice di confronto: BLOSUM 62 di Henikoff et al., 1992, sopra;

Penalità gap: 12 (ma senza penalità per gap finali)

Penalità per la lunghezza dei gap: 4

Soglia di similarità: 0

Certi schemi di allineamento per allineare due sequenze di amminoacidi possono risultare in corrispondenza solo di una piccola regione delle due sequenze, e questa piccola regione allineata può avere un'identità di sequenza molto alta, anche se non vi è alcuna relazione significativa tra le due sequenze a lunghezza intera. Di conseguenza, il

metodo di allineamento selezionato (ad esempio, il programma GAP) può essere regolato, se lo si desidera, per risultare in un allineamento che copra almeno 50 amminoacidi contigui del polipeptide bersaglio.

Secondo l'uso fattone nella presente, "proteina legante l'antigene" significa qualsiasi proteina che si lega specificamente a un antigene bersaglio specificato. Il termine racchiude anticorpi intatti che comprendono almeno due catene pesanti intere a lunghezza intera e due catene leggere a lunghezza intera, nonché loro derivati, varianti, frammenti e mutazioni. Esempi di frammenti di anticorpi includono frammenti Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, e Fv. Una proteina legante l'antigene include anche anticorpi di dominio quali Nanobody e scFv, come descritto ulteriormente più avanti.

In generale, si dice che una proteina legante l'antigene "si lega specificamente" al suo antigene bersaglio quando la proteina legante l'antigene esibisce essenzialmente un legame di fondo con molecole non bersaglio. Tuttavia, una proteina legante l'antigene che si lega specificamente a un bersaglio può reagire in modo crociato con antigeni bersaglio di specie differenti. Tipicamente, una proteina legante l'antigene si lega specificamente a un bersaglio quando la costante di dissociazione (KD) è  $\leq 10^{-7}$  M, misurata tramite una tecnica di risonanza plasmonica di superficie (ad esempio, BIACore, GE-Healthcare Uppsala, Svezia) o Kinetic Exclusion Assay (KinExA, Sapidyne, Boise, Idaho). Una proteina legante l'antigene si lega specificamente a un bersaglio con "alta

affinità" quando la  $KD$  è  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M, e con "affinità molto alta" quando la  $KD$  è  $\leq 5 \times 10^{-10}$  M, misurata usando i metodi descritti.

"Regione legante l'antigene" significa una proteina, o una porzione di una proteina, che si lega specificamente a un antigene specifico. Ad esempio, a quella porzione di una proteina legante l'antigene che contiene i residui di amminoacidi che interagiscono con un antigene e conferiscono alla proteina legante l'antigene la sua specificità e affinità per l'antigene si fa riferimento come "regione legante l'antigene". Una regione legante l'antigene include tipicamente una o più "regioni di legame complementari" ("CDR") di un'immunoglobulina, di un'immunoglobulina a catena singola, o di un anticorpo di camelide. Certe regioni leganti l'antigene includono anche una o più regioni "cornice". Una "CDR" è una sequenza di amminoacidi che contribuisce alla specificità e all'affinità di legame all'antigene. Le regioni "cornice" sono di ausilio nel mantenere la corretta conformazione delle CDR per promuovere il legame tra la regione legante l'antigene e un antigene.

Una "proteina ricombinante" è una proteina realizzata usando tecniche ricombinanti, ossia attraverso l'espressione di un acido nucleico ricombinante come descritto nella presente. Metodi e tecniche per la produzione di proteine ricombinanti sono ben noti nell'arte.

Il termine "anticorpo" si riferisce a un'immunoglobulina intatta di qualsiasi isotipo, o a un suo frammento che può competere con l'anticorpo intatto per il legame specifico all'antigene bersaglio, e include, ad esempio, anticorpi chimerici, umanizzati, completamente umani e

bispecifici. Un "anticorpo", di fatto, è una specie di una proteina legante l'antigene. Un anticorpo intatto sarà generalmente composto da almeno due catene pesanti a lunghezza intera e due catene leggere a lunghezza intera. Gli anticorpi possono essere derivati esclusivamente da un'unica fonte oppure possono essere "chimerici", vale a dire che differenti porzioni dell'anticorpo possono essere derivate da due anticorpi differenti, come descritto ulteriormente più avanti. Le proteine leganti l'antigene, gli anticorpi o i frammenti di legame possono essere prodotti in ibridomi, mediante tecniche di DNA ricombinante, o mediante clivaggio enzimatico o chimico di anticorpi intatti.

Il termine "catena leggera", secondo l'uso fattone in relazione a un anticorpo o a suoi frammenti, include una catena leggera a lunghezza intera e suoi frammenti aventi una sequenza di regione variabile sufficiente a conferire specificità di legame. Una catena leggera a lunghezza intera include un dominio di regione variabile, VL, e un dominio di regione costante, CL. Il dominio di regione variabile della catena leggera è all'ammino-terminale del polipeptide. Le catene leggere includono le catene kappa e le catene lambda.

Il termine "catena pesante", secondo l'uso fattone in relazione a un anticorpo o a un suo frammento, include una catena pesante a lunghezza intera e suoi frammenti aventi una sequenza di regione variabile sufficiente a conferire specificità di legame. Una catena pesante a lunghezza intera include un dominio di regione variabile, VH, e tre domini di regione costante, CH1, CH2 e CH3. Il dominio VH è all'ammino-

terminale del polipeptide, e i domini CH sono al carbossi-terminale, con il dominio CH3 più vicino al carbossi-terminale del polipeptide. Le catene pesanti possono essere di qualsiasi isotipo, incluse IgG (inclusi i sottotipi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (inclusi i sottotipi IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

Il termine "frammento immunologicamente funzionale" (o semplicemente "frammento") di un anticorpo o di una catena di immunoglobulina (catena pesante o leggera), secondo l'uso fattone nella presente, è una proteina legante l'antigene comprendente una porzione (indipendentemente da come quella porzione sia ottenuta o sintetizzata) di un anticorpo che manca di almeno alcuni degli amminoacidi presenti in una catena a lunghezza intera ma che è in grado di legarsi specificamente a un antigene. Tali frammenti sono biologicamente attivi in quanto si legano specificamente all'antigene bersaglio e possono competere con altre proteine leganti l'antigene, inclusi anticorpi intatti, per il legame specifico a un dato epitopo.

Questi frammenti biologicamente attivi possono essere prodotti mediante tecniche di DNA ricombinante oppure possono essere prodotti mediante clivaggio enzimatico o chimico di proteine leganti l'antigene, inclusi anticorpi intatti. I frammenti di immunoglobulina immunologicamente funzionali includono, ma senza limitarvisi, i frammenti Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>.

In un'altra forma di realizzazione, Fv, anticorpi di dominio e scFv possono essere derivati da un anticorpo della presente invenzione.

È contemplato inoltre che una frazione delle proteine leganti l'antigene divulgate nella presente, ad esempio una o più CDR, possa essere legata in modo covalente a una seconda proteina o a una piccola molecola per creare un agente terapeutico diretto a un bersaglio particolare nel corpo, possedente proprietà terapeutiche bifunzionali o avente un'emivita sierica prolungata.

Un "frammento Fab" è composto da una catena leggera e dalle regioni CH1 e variabili di una catena pesante. La catena pesante di una molecola Fab non può formare un legame disolfuro con un'altra molecola di catena pesante.

Una regione "Fc" contiene due frammenti di catena pesante comprendenti i domini CH2 e CH3 di un anticorpo. I due frammenti di catena pesante sono tenuti insieme da due o più legami disolfuro e da interazioni idrofobe dei domini CH3.

Un "frammento Fab'" contiene una catena leggera e una porzione di una catena pesante che contiene il dominio VH e il dominio CH1 e anche la regione tra i domini CH1 e CH2, in modo tale che un legame disolfuro intercatena possa essere formato tra le due catene pesanti di due frammenti Fab' per formare una molecola  $F(ab')_2$ .

Un "frammento  $F(ab')_2$ " contiene due catene leggere e due catene pesanti contenenti una porzione della regione costante tra i domini CH1 e CH2, in modo tale che un legame disolfuro intercatena sia formato tra le due catene pesanti. Un frammento  $F(ab')_2$  è perciò

composto da due frammenti Fab' che sono tenuti insieme da un legame disolfuro tra le due catene pesanti.

La "regione Fv" comprende le regioni variabili delle catene pesanti e leggere, ma manca delle regioni costanti.

Gli "anticorpi a catena singola" o "scFv" sono molecole di Fv in cui le regioni variabili di catena pesante e leggera sono state connesse mediante un linker flessibile per formare una singola catena di polipeptide, che forma una regione legante l'antigene. Gli scFv sono discussi in dettaglio nella pubblicazione della domanda di brevetto internazionale n. WO 88/01649 e nei brevetti statunitensi n. 4,946,778 e n. 5,260,203.

Un "anticorpo di dominio" o "immunoglobulina a catena singola" è un frammento di immunoglobulina immunologicamente funzionale contenente solo la regione variabile di una catena pesante o la regione variabile di una catena leggera. Esempi di anticorpi di dominio includono i Nanobodies®. In alcune esemplificazioni, due o più regioni VH vengono unite in modo covalente con un linker peptidico per creare un anticorpo di dominio bivalente. Le due regioni VH di un anticorpo di dominio bivalente possono avere come bersaglio lo stesso antigene o antigeni differenti.

Una "proteina legante l'antigene bivalente" o "anticorpo bivalente" è composta da due regioni leganti l'antigene. In alcune esemplificazioni, le due regioni di legame hanno le stesse specificità per

l'antigene. Proteine leganti l'antigene bivalenti e anticorpi bivalenti possono essere bispecifici, si veda sotto.

Una "proteina legante l'antigene multispecifica" o un "anticorpo multispecifico" è una/o che ha come bersaglio più di un antigene o epitopo.

Una proteina legante l'antigene o un anticorpo "bispecifica/o", "a doppia specificità" o "bifunzionale" è una proteina legante l'antigene o un anticorpo ibrida/o, rispettivamente, avente due differenti siti leganti l'antigene. Proteine leganti l'antigene e anticorpi bispecifiche/bispecifici sono una specie di proteina legante l'antigene multispecifica o di anticorpo multispecifico e possono essere prodotti mediante una varietà di metodi, inclusi, ma senza limitarsi, la fusione di ibridomi o il collegamento di frammenti Fab'. Si veda, ad esempio, Songvilai e Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. I due siti di legame di una proteina legante l'antigene o di un anticorpo bispecifica/o si legheranno a due epitopi differenti, che possono risiedere su bersagli di proteina uguali o differenti.

Il termine "competere", quando usato nel contesto di proteine leganti l'antigene (ad esempio anticorpi), significa che la competizione tra le proteine leganti l'antigene è determinata mediante un saggio in cui la proteina legante l'antigene (ad esempio anticorpo o suo frammento immunologicamente funzionale) sottoposta al test impedisce o inibisce il legame specifico di una proteina legante l'antigene di riferimento a un antigene comune. Possono essere usati numerosi tipi di saggi di legame

competitivo, ad esempio: saggio radioimmunologico (RIA) diretto o indiretto in fase solida, saggio immunoenzimatico (EIA) diretto o indiretto in fase solida, saggio di competizione sandwich (si veda, ad esempio, Stahl et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA biotina-avidina diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), saggio con marcatura diretto in fase solida, saggio sandwich con marcatura diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Harlow e Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA con marcatura diretto in fase solida usando la marcatura I-125 (si veda, ad esempio, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA biotina-avidina diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); e RIA con marcatura diretto (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Tipicamente, un tale saggio comporta l'uso di un antigene purificato legato a una superficie solida o cellule che portano uno di questi, una proteina legante l'antigene del test non marcata e una proteina legante l'antigene di riferimento marcata. L'inibizione competitiva viene misurata determinando la quantità di marcatura legata alla superficie solida o alle cellule in presenza della proteina legante l'antigene del test. Solitamente, la proteina legante l'antigene del test è presente in eccesso. Dettagli aggiuntivi sui metodi per determinare il legame competitivo sono forniti negli esempi nella presente. Solitamente, quando una proteina legante l'antigene in competizione è presente in eccesso, essa inibisce il legame specifico di una proteina legante un antigene di riferimento a un antigene

comune di almeno 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. In alcune esemplificazioni, il legame è inibito almeno di 80%, 85%, 90%, 95% o 97% o più.

Il termine "antigene" si riferisce a una molecola o a una porzione di una molecola in grado di essere legata da un agente di legame selettivo, come una proteina legante l'antigene (incluso, ad esempio, un anticorpo), e, in aggiunta, in grado di essere usata in un animale per produrre anticorpi in grado di legarsi a quell'antigene. Un antigene può possedere uno o più epitopi che sono in grado di interagire con differenti proteine leganti l'antigene, ad esempio anticorpi.

Il termine "epitopo" è la porzione di una molecola che è legata da una proteina legante l'antigene (ad esempio, un anticorpo). Il termine include qualsiasi determinante in grado di legarsi specificamente a una proteina legante l'antigene, come un anticorpo. Un epitopo può essere contiguo o non contiguo (discontinuo) (ad esempio, in un polipeptide, i residui di amminoacidi che non sono contigui tra loro nella sequenza di polipeptide ma che nel contesto della molecola sono legati dalla proteina legante l'antigene). Un epitopo conformazionale è un epitopo che esiste all'interno della conformazione di una proteina attiva ma che non è presente in una proteina denaturata. In certe forme di realizzazione, gli epitopi possono essere mimetici in quanto comprendono una struttura tridimensionale che è simile a un epitopo usato per generare la proteina legante l'antigene, ma non comprendono nessuno, o solo alcuni, dei residui di amminoacidi trovati in quell'epitopo usato per generare la

proteina legante l'antigene. Più spesso, gli epitopi risiedono nelle proteine, ma, in alcune esemplificazioni, possono risiedere anche in altri tipi di molecole, come gli acidi nucleici. I determinanti dell'epitopo possono includere raggruppamenti superficiali chimicamente attivi di molecole quali amminoacidi, catene laterali di zuccheri, gruppi fosforile o solfonile, e possono avere caratteristiche strutturali tridimensionali specifiche, e/o caratteristiche di carica specifiche. Generalmente, le proteine leganti l'antigene specifiche per un particolare antigene bersaglio riconosceranno in modo preferenziale un epitopo sull'antigene bersaglio in una miscela complessa di proteine e/o macromolecole.

Secondo l'uso fattone nella presente, "sostanzialmente puro" significa che la specie di molecola descritta è la specie predominante presente, vale a dire che, su base molare, è più abbondante di qualsiasi altra specie individuale nella stessa miscela. In certe forme di realizzazione, una molecola sostanzialmente pura è una composizione in cui la specie in oggetto comprende almeno il 50% (su base molare) di tutte le specie macromolecolari presenti. In altre forme di realizzazione, una composizione sostanzialmente pura comprenderà almeno 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% di tutte le specie macromolecolari presenti nella composizione. In altre forme di realizzazione, la specie in oggetto viene purificata fino a un'omogeneità essenziale, in cui specie contaminanti non possono essere rilevate nella composizione mediante metodi di rilevamento convenzionali e, perciò, la composizione consiste in una singola specie macromolecolare rilevabile.

Il termine "polinucleotide" o "acido nucleico" include sia polimeri di nucleotidi a filamento singolo che a doppio filamento. I nucleotidi che costituiscono il polinucleotide possono essere ribonucleotidi o deossiribonucleotidi oppure una forma modificata di uno dei due tipi di nucleotide. Le modifiche includono modifiche della base come derivati di bromouridina e inosina, modifiche del ribosio come 2',3'-dideossiribosio e modifiche del legame internucleotidico come fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforanilotioato, fosforaniladato e fosforamidato.

Il termine "oligonucleotide" significa un polinucleotide comprendente 200 nucleotidi o meno. In alcune forme di realizzazione, gli oligonucleotidi hanno una lunghezza da 10 a 60 basi. In altre forme di realizzazione, gli oligonucleotidi hanno una lunghezza di 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o da 20 a 40 nucleotidi. Gli oligonucleotidi possono essere a singolo filamento o a doppio filamento, ad esempio per uso nella costruzione di un gene mutante. Gli oligonucleotidi possono essere senso o antisenso. Un oligonucleotide può includere una marcatura, incluse una radiomarcatura, una marcatura fluorescente, un aptene o una marcatura antigenica, per saggi di rilevamento. Gli oligonucleotidi possono essere usati, ad esempio, come primer per PCR, primer di clonaggio o sonde di ibridazione.

"Molecola di acido nucleico isolato" significa un DNA o RNA con origine genomica, da mRNA, da cDNA o sintetica, o una combinazione di questi, che non è associato a tutto, o a una porzione di, un

polinucleotide in cui il polinucleotide isolato si trova in natura, oppure è collegato a un polinucleotide al quale non è collegato in natura. Ai fini di questa divulgazione, resta inteso che "una molecola di acido nucleico comprendente" una particolare sequenza di nucleotidi non racchiude cromosomi intatti. Molecole di acido nucleico isolato "comprendenti" sequenze di acido nucleico specificate possono includere, in aggiunta alle sequenze specificate, sequenze codificanti per un massimo di dieci o anche fino a venti altre proteine, o loro porzioni, oppure possono includere sequenze regolatrici collegate funzionalmente che controllano l'espressione della regione codificante delle sequenze di acido nucleico enumerate, e/o possono includere sequenze di vettore.

Salvo diversamente specificato, l'estremità sinistra di qualsiasi sequenza polinucleotidica a singolo filamento discussa nella presente è l'estremità 5'; alla direzione sinistra delle sequenze polinucleotidiche a doppio filamento si fa riferimento come direzione 5'. Alla direzione dell'aggiunta da 5' a 3' di trascritti di RNA nascenti si fa riferimento come direzione di trascrizione; a regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi la stessa sequenza del trascritto di RNA che sono 5' rispetto all'estremità 5' del trascritto di RNA si fa riferimento come "sequenze a monte"; a regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi la stessa sequenza del trascritto di RNA che sono 3' rispetto all'estremità 3' del trascritto di RNA si fa riferimento come "sequenze a valle".

Il termine "sequenza di controllo" si riferisce a una sequenza polinucleotidica che può influenzare l'espressione e l'elaborazione di

sequenze codificanti a cui è legata. La natura di tali sequenze di controllo può dipendere dall'organismo ospite. In particolari forme di realizzazione, le sequenze di controllo per i procarioti possono includere un promotore, un sito di legame al ribosoma, e una sequenza di terminazione della trascrizione. Ad esempio, le sequenze di controllo per gli eucarioti possono includere promotori comprendenti uno o una pluralità di siti di riconoscimento per fattori di trascrizione, sequenze di potenziatori della trascrizione, e sequenze di terminazione della trascrizione. Le "sequenze di controllo" possono includere sequenze leader e/o sequenze di partner di fusione.

Il termine "vettore" significa qualsiasi molecola o entità (ad esempio acido nucleico, plasmide, batteriofago o virus) usata per trasferire informazioni codificanti proteine in una cellula ospite.

Il termine "vettore di espressione" o "costrutto di espressione" si riferisce a un vettore che è adatto alla trasformazione di una cellula ospite e che contiene sequenze di acido nucleico che dirigono e/o controllano (unitamente alla cellula ospite) l'espressione di una o più regioni codificanti eterologhe collegate funzionalmente ad esse. Un costrutto di espressione può includere, ma senza limitarsi, sequenze che influenzano o controllano la trascrizione, la traduzione e, se sono presenti introni, influenzano lo splicing dell'RNA di una regione codificante collegata funzionalmente ad essa.

Secondo l'uso fattone nella presente, "collegato funzionalmente" significa che i componenti a cui è applicato il termine sono in una

relazione che consente loro di effettuare le loro funzioni intrinseche in condizioni adatte. Ad esempio, una sequenza di controllo in un vettore che è "collegata funzionalmente" a una sequenza codificante proteine viene legata a quest'ultima in modo che l'espressione della sequenza codificante proteine venga conseguita in condizioni compatibili con l'attività trascrizionale delle sequenze di controllo.

Il termine "cellula ospite" significa una cellula che è stata trasformata con una sequenza di acido nucleico e che quindi esprime un gene di interesse. Il termine include la progenie della cellula parentale, che la progenie sia o non sia identica per morfologia o per costituzione genetica alla cellula parentale originaria, purché il gene di interesse sia presente.

Nella presente, i termini "polipeptide" o "proteina" sono usati in modo intercambiabile per riferirsi a un polimero di residui di amminoacidi. I termini si applicano anche a polimeri di amminoacidi in cui uno o più residui di amminoacidi sono un analogo o mimetico di un corrispondente amminoacido presente in natura, nonché a polimeri amminoacidici presenti in natura. I termini possono anche racchiudere polimeri di amminoacidi che sono stati modificati, ad esempio mediante l'aggiunta di residui di carboidrati per formare glicoproteine, o fosforilati. Polipeptidi e proteine possono essere prodotti da una cellula presente in natura e non ricombinante; oppure possono essere prodotti da una cellula geneticamente ingegnerizzata o ricombinante, e comprendono molecole aventi la sequenza di amminoacidi della proteina nativa, o molecole

aventi delezioni, aggiunte e/o sostituzioni di uno o più amminoacidi della sequenza nativa. I termini "polipeptide" e "proteina" racchiudono specificamente proteine leganti l'antigene, anticorpi, o sequenze che hanno delezioni, aggiunte e/o sostituzioni di uno o più amminoacidi di una proteina legante l'antigene. Il termine " frammento di polipeptide" si riferisce a un polipeptide che ha una delezione ammino-terminale, una delezione carbossi-terminale e/o una delezione interna rispetto alla proteina a lunghezza intera. Tali frammenti possono anche contenere amminoacidi modificati rispetto alla proteina a lunghezza intera. In certe forme di realizzazione, i frammenti sono lunghi da cinque a 500 amminoacidi. Ad esempio, i frammenti possono essere lunghi almeno 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 amminoacidi. Frammenti di polipeptide utili includono frammenti di anticorpi immunologicamente funzionali, inclusi domini di legame.

Il termine "proteina isolata" significa che una proteina in questione (1) è priva di almeno alcune altre proteine con cui si troverebbe normalmente, (2) è essenzialmente priva di altre proteine della stessa fonte, ad esempio della stessa specie, (3) è espressa da una cellula di una specie differente, (4) è stata separata da almeno circa il 50 per cento di polinucleotidi, lipidi, carboidrati o altri materiali con cui è associata in natura, (5) è associata funzionalmente (mediante interazione covalente o non covalente) a un polipeptide con cui non è associata in natura, o (6) non è presente in natura. Tipicamente, una "proteina isolata" costituisce almeno circa il 5%, almeno circa il 10%, almeno circa il 25% o almeno

circa il 50% di un dato campione. DNA genomico, cDNA, mRNA o altro RNA, di origine sintetica, o qualsiasi loro combinazione, possono codificare una tale proteina isolata. Preferibilmente, la proteina isolata è sostanzialmente priva di proteine o polipeptidi o altri contaminanti che si trovano nel suo ambiente naturale che potrebbero interferire con il suo uso terapeutico, diagnostico, profilattico, di ricerca, o di altro tipo.

Una "variante" di un polipeptide (ad esempio, una proteina legante l'antigene come un anticorpo) comprende una sequenza di amminoacidi in cui uno o più residui di amminoacidi vengono inseriti nella, deleti dalla, e/o sostituiti nella, sequenza di amminoacidi rispetto a un'altra sequenza di polipeptide. Le varianti includono le proteine di fusione.

Un "derivato" di un polipeptide è un polipeptide (ad esempio, una proteina legante l'antigene come un anticorpo) che è stato modificato chimicamente in un modo diverso dalle varianti di inserzione, delezione o sostituzione, ad esempio tramite coniugazione a un'altra frazione chimica.

Il termine "presente in natura", secondo l'uso fattone in tutta la descrizione in relazione a materiali biologici quali polipeptidi, acidi nucleici, cellule ospiti, e simili, si riferisce a materiali che si trovano in natura.

Secondo l'uso fattone nella presente, "soggetto" o "paziente" può essere qualsiasi mammifero. In una tipica forma di realizzazione, il soggetto o il paziente è un essere umano.

Una "sostituzione di amminoacido conservativa" può comportare una sostituzione di un residuo di amminoacido nativo (ossia un residuo trovato in una data posizione della sequenza di polipeptide di tipo selvatico) con un residuo non nativo (ossia un residuo che non si trova in una data posizione della sequenza di polipeptide di tipo selvatico) in modo che vi sia poco o nessun effetto sulla polarità o sulla carica del residuo di amminoacido in quella posizione. Sostituzioni di amminoacidi conservative racchiudono anche residui di amminoacidi non presenti in natura che sono tipicamente incorporati mediante sintesi chimica di peptidi piuttosto che mediante sintesi in sistemi biologici. Queste includono peptidomimetici e altre forme invertite o rovesciate di frazioni amminoacido.

I residui presenti in natura possono essere suddivisi in classi in base alle proprietà comuni della catena laterale:

- (1) idrofobi: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) idrofili neutri: Cys, Ser, Thr;
- (3) acidi: Asp, Glu;
- (4) basici: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) residui che influenzano l'orientamento di catena: Gly, Pro; e
- (6) aromatici: Trp, Tyr, Phe.

Gruppi aggiuntivi di amminoacidi possono anche essere formulati usando i principi descritti, ad esempio, in Creighton (1984) *PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (2a ed. 1993), W.H. Freeman and Company. In alcune esemplificazioni, può

essere utile caratterizzare ulteriormente le sostituzioni in base a due o più di tali peculiarità (ad esempio, la sostituzione con un residuo "piccolo polare", come un residuo di Thr, può rappresentare una sostituzione altamente conservativa in un contesto appropriato).

Le sostituzioni conservative possono comportare lo scambio di un membro di una di queste classi con un altro membro della stessa classe. Le sostituzioni non conservative possono comportare lo scambio di un membro di una di queste classi con un membro di un'altra classe.

I residui di amminoacidi sintetici, rari, o modificati che hanno proprietà fisico-chimiche note simili a quelle di un raggruppamento sopra descritto possono essere usati come sostituti "conservativi" per un particolare residuo di amminoacidi in una sequenza. Ad esempio, un residuo di D-Arg può fungere da sostituto per un tipico residuo di L-Arg. Può anche accadere che una particolare sostituzione possa essere descritta in termini di due o più delle classi sopra descritte (ad esempio, una sostituzione con un residuo piccolo e idrofobo significa sostituire un amminoacido con uno o più residui che si trovano in entrambe le classi sopra descritte o altri residui sintetici, rari, o modificati che sono noti nell'arte per avere proprietà fisico-chimiche simili a tali residui che soddisfano entrambe le definizioni).

Un "vettore" si riferisce a un veicolo di erogazione che (a) promuove l'espressione di una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide; (b) promuove la produzione del polipeptide da esso; (c) promuove la trasfezione/trasformazione di cellule bersaglio con esso; (d)

promuove la replicazione della sequenza di acido nucleico; (e) promuove la stabilità dell'acido nucleico; (f) promuove il rilevamento dell'acido nucleico e/o delle cellule trasformate/trasfettate; e/o (g) conferisce altrimenti una funzione biologica e/o fisico-chimica vantaggiosa all'acido nucleico codificante un polipeptide. Un vettore può essere qualsiasi vettore adatto, inclusi vettori di acido nucleico cromosomici, non cromosomici e sintetici (una sequenza di acido nucleico comprendente un insieme adatto di elementi di controllo dell'espressione). Esempi di tali vettori includono derivati di SV40, plasmidi batterici, DNA fagico, baculovirus, plasmidi di lievito, vettori derivati da combinazioni di plasmidi e DNA fagico e vettori di acido nucleico virale (RNA o DNA).

Un vettore di espressione ricombinante può essere progettato per l'espressione di una proteina in cellule procariotiche (ad esempio, *E. coli*) o eucariotiche (ad esempio, cellule di insetti, usando vettori di espressione di baculovirus, cellule di lievito, o cellule di mammifero). In una forma di realizzazione, la cellula ospite è una cellula ospite di mammifero non umana. Cellule ospiti rappresentative includono quegli ospiti tipicamente usati per il clonaggio e l'espressione, inclusi ceppi di *Escherichia coli* TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) e BL21 (DE3)pLysS, BLUESCRIPT (Stratagene), linee cellulari di mammifero CHO, CHO-K1, HEK293, vettori 293-EBNA pIN (Van Heeke e Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509 (1989); vettori pET (Novagen, Madison Wis.). In alternativa, il vettore di espressione ricombinante può essere trascritto e tradotto in vitro, ad esempio usando

sequenze regolatrici di promotore T7 e la polimerasi T7 e un sistema di traduzione in vitro. Preferibilmente, il vettore contiene un promotore a monte del sito di clonaggio contenente la sequenza di acido nucleico codificante il polipeptide. Esempi di promotori che possono essere attivati e disattivati sono il promotore lac, il promotore T7, il promotore trc, il promotore tac e il promotore trp.

In varie forme di realizzazione, i vettori comprendono una sequenza di nucleotidi collegata funzionalmente che regola l'espressione di un polipeptide bersaglio. Un vettore può comprendere, o essere associato a, qualsiasi promotore, potenziatore e altri elementi che facilitano l'espressione. Esempi di tali elementi includono promotori di espressione forti (ad esempio, un promotore/potenziatore CMV IE di essere umano, un promotore RSV, un promotore SV40, un promotore SL3-3, un promotore MMTV o un promotore LTR di HIV, un promotore EF1alfa, un promotore CAG), sequenze di terminazione di poli(A) efficaci, un'origine di replicazione per il prodotto plasmidico in E. coli, un gene di resistenza agli antibiotici come marcatore selezionabile, e/o un sito di clonaggio conveniente (ad esempio, un poli-linker). I vettori possono anche comprendere un promotore inducibile anziché un promotore costitutivo come CMV IE. In un aspetto, viene fornito un acido nucleico comprendente una sequenza codificante un polipeptide bersaglio che è collegato funzionalmente a un promotore tessuto-specifico che promuove l'espressione della sequenza in un tessuto metabolicamente rilevante, come tessuto epatico o pancreatico.

B

In un altro aspetto della presente divulgazione, vengono fornite cellule ospiti comprendenti gli acidi nucleici e i vettori divulgati nella presente. In varie forme di realizzazione, il vettore o l'acido nucleico è integrato nel genoma della cellula ospite, mentre, in altre forme di realizzazione, il vettore o l'acido nucleico è extracromosomico.

Sono fornite cellule ricombinanti, quali cellule di lievito, batteriche (ad esempio, E. coli) e di mammifero (ad esempio, cellule di mammifero immortalizzate) comprendenti tale acido nucleico, vettore, o combinazioni di uno di essi o entrambi. In varie forme di realizzazione, vengono fornite cellule comprendenti un acido nucleico non integrato, come un plasmide, un cosmide, un fagemide, o un elemento di espressione lineare, che comprende una sequenza codificante l'espressione di un polipeptide bersaglio.

Un vettore comprendente una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide bersaglio fornito nella presente può essere introdotto in una cellula ospite mediante trasformazione o mediante trasfezione. Sono ben noti metodi per trasformare una cellula con un vettore di espressione.

Un acido nucleico codificante bersaglio può essere posizionato in, e/o erogato a, una cellula ospite o a un animale ospite tramite un vettore virale. A tale scopo può essere usato qualsiasi vettore virale adatto. Un vettore virale può comprendere un numero qualsiasi di polinucleotidi virali, da soli o in combinazione con una o più proteine virali, che facilitano l'erogazione, la replicazione e/o l'espressione dell'acido

B

nucleico dell'invenzione in una cellula ospite desiderata. Il vettore virale può essere un polinucleotide comprendente tutto, o parte di, un genoma virale, un coniugato proteina virale/acido nucleico, una particella simile a virus (VLP), o una particella di virus intatta comprendente acidi nucleici virali e un acido nucleico codificante un polipeptide. Un vettore virale di particella virale può comprendere una particella virale di tipo selvatico o una particella virale modificata. Il vettore virale può essere un vettore che richiede la presenza di un altro vettore o di un virus di tipo selvatico per la replicazione e/o l'espressione (ad esempio, un vettore virale può essere un virus dipendente da ausiliario), come un amplicone di vettore adenovirale. Tipicamente, tali vettori virali consistono in una particella virale di tipo selvatico, o una particella virale modificata nel suo contenuto di proteine e/o acidi nucleici per aumentare la capacità di transgene o essere di ausilio nella trasfezione e/o nell'espressione dell'acido nucleico (esempi di tali vettori includono gli ampliconi di herpesvirus/AAV). Tipicamente, un vettore virale è simile a, e/o è derivato da, un virus che normalmente infetta gli esseri umani. Particelle di vettori virali adatte a questo riguardo includono, ad esempio, particelle di vettori adenovirali (incluso qualsiasi virus degli, o derivato da un virus degli, adenoviridae), particelle di vettori virali adeno-associati (particelle di vettori di AAV) o altri parvovirus e particelle di vettori parvovirali, particelle di vettori papillomavirali, vettori flavivirali, vettori alfavirali, vettori herpesvirali, vettori di poxvirus, vettori retrovirali, inclusi vettori lentivirali.

Un polipeptide bersaglio espresso come descritto nella presente può essere isolato usando metodi standard di purificazione delle proteine. Un polipeptide bersaglio può essere isolato da una cellula in cui è naturalmente espresso oppure può essere isolato da una cellula che è stata ingegnerizzata per esprimere un polipeptide bersaglio, ad esempio una cellula che non esprime naturalmente un polipeptide bersaglio.

Nell'arte sono noti metodi di purificazione delle proteine che possono essere impiegati per isolare un polipeptide bersaglio, nonché materiali e reagenti associati. Metodi di purificazione aggiuntivi che possono essere utili per isolare un polipeptide bersaglio possono essere trovati in riferimenti quali Bootcov MR, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11514-9, Fairlie WD, 2000, Gene 254: 67-76.

Le proteine leganti l'antigene fornite sono polipeptidi in cui sono incorporate e/o unite una o più regioni determinanti la complementarità (CDR), come descritto nella presente. In alcune proteine leganti l'antigene, le CDR sono incorporate in una regione "cornice" che orienta la/e CDR in modo che vengano conseguite le corrette proprietà di legame all'antigene della/e CDR. Certe proteine leganti l'antigene descritte nella presente sono anticorpi o sono derivate da anticorpi. In altre proteine leganti l'antigene, le sequenze CDR sono incorporate in un differente tipo di impalcatura proteica.

In generale, le proteine leganti l'antigene fornite comprendono tipicamente una o più CDR come descritto nella presente (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). In alcune esemplificazioni, la proteina legante l'antigene

comprende (a) una struttura di polipeptide e (b) una o più CDR che vengono inserite nella, e/o unite alla, struttura di polipeptide. La struttura di polipeptide può assumere una varietà di forme differenti. Ad esempio, può essere, o comprendere, la cornice di un anticorpo presente in natura, o un/una suo/a frammento o variante, oppure può essere di natura completamente sintetica. Di seguito vengono descritti ulteriormente esempi di varie strutture di polipeptide.

In certe forme di realizzazione, la struttura di polipeptide delle proteine leganti l'antigene è un anticorpo o è derivata da un anticorpo. Di conseguenza, esempi di certe proteine leganti l'antigene che vengono fornite includono, ma senza limitarsi, anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi di dominio come i Nanobodies<sup>®</sup>, anticorpi sintetici (a cui nella presente si fa riferimento talvolta come "mimetici di anticorpi"), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, anticorpi umani, fusioni di anticorpo, e porzioni o frammenti di ciascuno, rispettivamente. In alcune esemplificazioni, la proteina legante l'antigene è un frammento immunologico di un anticorpo completo (ad esempio, un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub>). In altre esemplificazioni, la proteina legante l'antigene è un scFv che usa CDR di un anticorpo della presente invenzione.

In un altro aspetto, viene fornita una proteina legante l'antigene avente un'emivita di almeno un giorno in vitro o in vivo (ad esempio, quando somministrata a un soggetto umano). In una forma di realizzazione, la proteina legante l'antigene ha un'emivita di almeno tre giorni. In varie altre forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene

ha un'emivita di 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 giorni o più. In un'altra forma di realizzazione, la proteina legante l'antigene viene derivatizzata o modificata in modo che abbia un'emivita più lunga rispetto all'anticorpo non derivatizzato o non modificato. In un'altra forma di realizzazione, la proteina legante l'antigene contiene mutazioni puntiformi per aumentare l'emivita sierica. Ulteriori dettagli riguardanti tali forme mutanti e derivatizzate sono forniti di seguito.

Alcune delle proteine leganti l'antigene che sono fornite hanno la struttura tipicamente associata ad anticorpi naturali. Le unità strutturali di questi anticorpi comprendono tipicamente uno o più tetrameri, ciascuno composto da due pariglie identiche di catene polipeptidiche, sebbene alcune specie di mammiferi producano anche anticorpi che hanno una singola catena pesante. In un tipico anticorpo, ciascuna coppia o pariglia include una catena "leggera" a lunghezza intera (in certe forme di realizzazione, circa 25 kDa) e una catena "pesante" a lunghezza intera (in certe forme di realizzazione, circa 50-70 kDa). Ciascuna catena di immunoglobulina individuale è composta da svariati "domini di immunoglobulina", ciascuno consistendo all'incirca in 90-110 amminoacidi ed esprimendo un caratteristico schema di ripiegamento. Questi domini sono le unità di base di cui sono composti i polipeptidi di anticorpo. La porzione ammino-terminale di ciascuna catena include tipicamente un dominio variabile che è responsabile del riconoscimento dell'antigene. La porzione carbossi-terminale è più conservata evolutivamente rispetto all'altra estremità della catena e vi si fa

riferimento come "regione costante" o "regione C". Le catene leggere umane sono generalmente classificate come catene leggere kappa e lambda, e ciascuna di queste contiene un dominio variabile e un dominio costante. Le catene pesanti sono tipicamente classificate come catene mu, delta, gamma, alfa o epsilon, e queste definiscono l'isotipo dell'anticorpo come IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, rispettivamente. Una IgG ha svariati sottotipi, inclusi, ma senza limitarsi, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. I sottotipi di IgM includono IgM e IgM2. I sottotipi di IgA includono IgA1 e IgA2. Nell'essere umano, gli isotipi IgA e IgD contengono quattro catene pesanti e quattro catene leggere; gli isotipi IgG e IgE contengono due catene pesanti e due catene leggere; e l'isotipo IgM contiene cinque catene pesanti e cinque catene leggere. La regione C della catena pesante comprende tipicamente uno o più domini che possono essere responsabili della funzione effettrice. Il numero di domini di regione costante di catena pesante dipenderà dall'isotipo. Ad esempio, le catene pesanti di IgG contengono ciascuna tre domini di regione C, noti come CH1, CH2 e CH3. Gli anticorpi che sono forniti possono avere uno qualsiasi di questi isotipi e sottotipi. In certe forme di realizzazione, l'anticorpo è del sottotipo IgG1, IgG2 o IgG4.

Nelle catene leggere e pesanti a lunghezza intera, le regioni variabili e costanti sono unite da una regione "J" di circa dodici o più amminoacidi, la catena pesante includendo anche una regione "D" di circa altri dieci amminoacidi. Si veda, ad esempio, *Fundamental Immunology*, 2a ed., cap. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press.

Le regioni variabili di ciascuna coppia catena leggera/pesante formano tipicamente il sito legante l'antigene.

Per gli anticorpi forniti nella presente, le regioni variabili di catene di immunoglobulina esibiscono generalmente la stessa struttura complessiva, comprendente regioni cornice (FR) relativamente conservate unite da tre regioni ipervariabili, più spesso chiamate "regioni determinanti la complementarità" o CDR. Le CDR delle due catene di ciascuna coppia catena pesante/catena leggera sopra menzionata sono tipicamente allineate dalle regioni cornice per formare una struttura che si lega specificamente a uno specifico epitopo sull'antigene. Da N-terminale a C-terminale, le regioni variabili di catena leggera e pesante presenti in natura sono tipicamente conformi al seguente ordine di questi elementi: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. È stato ideato un sistema di numerazione per assegnare numeri agli amminoacidi che occupano posizioni in ciascuno di questi domini. Questo sistema di numerazione è definito in Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 e 1991, NIH, Bethesda, Md.), o Chothia e Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883.

La presente invenzione riguarda una composizione comprendente una proteina legante l'antigene avente almeno un sito di coniugazione interno. Il sito di coniugazione deve essere idoneo alla coniugazione di una frazione funzionale aggiuntiva (ad esempio un farmaco, un ligando o un peptide) mediante una chimica di coniugazione definita attraverso la catena laterale di un residuo di amminoacido nel

sito di coniugazione. Conseguire una coniugazione altamente selettiva e sito-specifica alla proteina legante l'antigene, in conformità alla presente invenzione, richiede prendere in considerazione una vasta gamma di criteri di progettazione. Innanzitutto, deve essere definita o predeterminata una chimica di coniugazione o di accoppiamento preferita. Le frazioni funzionali possono essere coniugate o accoppiate al sito di coniugazione selezionato della proteina legante l'antigene attraverso una serie di differenti tecniche di coniugazione note nell'arte. Ad esempio, un partner di coniugazione attivato da maleimide avente come bersaglio un tiolo di cisteina accessibile sulla proteina legante l'antigene è una forma di realizzazione, ma numerose chimiche di coniugazione o accoppiamento aventi come bersaglio le catene laterali di amminoacidi canonici o non canonici, ad esempio non naturali, nella sequenza della proteina legante l'antigene, possono essere impiegate in conformità alla presente invenzione.

Chimiche per la coniugazione chemoselettiva includono: cicloaddizioni dipolari azoturo-alchino catalizzate da rame(I) [3+2], legatura di Staudinger, altri processi di trasferimento di acile (S→N; X→N), ossimazioni, formazione di legami idrazonici e altre reazioni chimiche organiche adatte come accoppiamenti incrociati usando catalizzatori di palladio solubili in acqua. (Ad esempio Bong et al., Chemoselective Pd(0)-catalyzed peptide coupling in water, Organic Letters 3(16):2509-11 (2001); Dibowski et al., Bioconjugation of peptides by palladium-catalyzed C-C cross-coupling in water, Angew. Chem. Int.

Ed. 37(4):476-78 (1998); DeVasher et al., Aqueous-phase, palladium-catalyzed cross-coupling of aryl bromides under mild conditions, using water-soluble, sterically demanding alkylphosphines, J. Org. Chem. 69:7919-27 (2004); Shaugnessy et al., J.Org. Chem, 2003, 68, 6767-6774; Prescher, JA e Bertozzi CR, Chemistry in living system, Nature Chemical Biology 1(1); 13-21 (2005)).

Come menzionato sopra, la coniugazione (o legame covalente) alla proteina legante l'antigene avviene attraverso la catena laterale di un residuo di amminoacido nel sito di coniugazione, ad esempio, ma senza limitarsi, un residuo di cisteinile. Il residuo di amminoacido, ad esempio un residuo di cisteinile nel sito di coniugazione interno che è selezionato, può essere uno che occupa la stessa posizione del residuo di amminoacido in una sequenza nativa di dominio Fc, oppure il residuo di amminoacido può essere ingegnerizzato nella sequenza di dominio Fc mediante sostituzione o inserzione.

Un altro aspetto importante della selezione di un sito di coniugazione interno in conformità alla presente invenzione è la selezione del posizionamento del sito di coniugazione nella proteina legante l'antigene complessiva. Qualsiasi dei residui di amminoacidi esposti sulla proteina legante l'antigene può essere un sito di coniugazione potenzialmente utile e può essere mutato in cisteina o in qualche altro amminoacido reattivo per l'accoppiamento sito-selettivo, se non sono già presente nel sito di coniugazione selezionato della sequenza della proteina legante l'antigene. Tuttavia, questo approccio

B

non tiene conto dei potenziali vincoli sterici che potrebbero perturbare l'attività del partner coniugato o limitare la reattività della mutazione ingegnerizzata.

In una forma di realizzazione, la proteina legante l'antigene è un anticorpo o un suo frammento funzionale. In una forma di realizzazione, l'anticorpo, o suo frammento funzionale, comprende una sostituzione di cisteina o di un amminoacido non canonico in uno o più siti di coniugazione selezionati dal gruppo consistente in D70 della catena leggera di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 7; E276 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8; e T363 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8. Per chiarezza, "D70 della catena leggera di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 7" è lo stesso sito di sostituzione della posizione AHo D88 della catena leggera dell'anticorpo 5G12.006 e della posizione Kabat D70 della catena leggera dell'anticorpo 5G12.006; "E276 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO:

8" è lo stesso sito di sostituzione della posizione E384 di AHo della catena pesante dell'anticorpo 5G12.006 e della posizione E285 di Kabat della catena pesante dell'anticorpo 5G12.006; e "T363 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8" è lo stesso sito di sostituzione della posizione AHo T487 della catena pesante dell'anticorpo 5G12.006 e della posizione Kabat T382 della catena pesante di anticorpo 5G12.006.

B

Tabella 1. SEQ ID NO. amminoacidi.

Identificatore	Costrutto	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:336067	5G12.006	3	4	7	8	12	13	14	18	19	20

Tabella 2. SEQ ID NO. acido nucleico.

Identificatore	Costrutto	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:336067	5G12.006	1	2	5	6	9	10	11	15	16	17

Tabella 3. Regioni leggere variabili e pesanti variabili: sequenze di acido nucleico (“NA”) e di amminoacidi (“AA”).

iPS n.	Ab	Tipo	VL	VH
iPS:336067	5G12.006	NA	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCC	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGG
			ATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG	GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA
			AGACAGAGTCACTATCACTTGCC	GGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAG
			GGGCAAGTCAGACCATTAGCAGG	CGTCTGGATTACCTTCAGTAGCT
TTTTTAAATTGGTATCAGCAGAA	ATGGCATACTGGTCCGCCAG			
ACCTGGGAAAGCCCCTGAGCTCC	GCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTG			
TGATCTATGTTGCATCCAGTTTGC	GGTGGCAGTTATATGGTATGATG			
AAAGTGGGGTCCCATCAAGATTC	GAAGTAATAAGTTCCATGCAGAC			
AGTGGCAGTGGTCTGGGACAGA	TCCGTGAAGGGCCGATTACCAT			
TTTCACTCTCACCATCAGCAGTCT	CTCCAGAGACAATTCCAAGAACA			
GCAACCTGAAGATTTTGCAACTT	CGCTGTATCTGCAAATGAACAGC			
ACTACTGTCAACAGAGTTACAGT	CTGAGAGCCGAGGACTCGGCTAT			
ACCCTGATCAGTTTTGGCCAGGG	GTACTTCTGTGCGAGAGGAAAAG			
GACCAAGCTGGAGATCACACGA	TGGCTGGTATGCCTGAAGCTTTTG			
			AAATCTGGGGCCAAGGGACAAAG	
			GTCACCGTCTCTTCA	
			SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
		AA	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRAS	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCTA
			QTISRFLNWWYQQKPKAPELLIYV	SGFTFSSYGIHWVRQAPGKLEWV
			ASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTIS	AVIWDGSKNFHADSVMKGRFTISR
			SLQPEDFATYYCQSYSTLISFGQG	DNSKNTLYLQMNSLRAEDSAMYP
			TKLEITR	CARGKVAGMPEAFEIHWGQGTKVT
				VSS
			SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Tabella 4A. Sequenze di acido nucleico (“NA”) e di amminoacidi (“AA”) di CDRL1, CDRL2 e CDRL3.

iPS n.	Ab	Tipo	CDRL1	CDRL2	CDRL3
iPS:336067	5G12.006	NA	CGGGCAAGTCAGAC	GTTGCATCCAGTTTG	CAACAGAGTTACAG
			CATTAGCAGGTTTTT	CAAAGT	TACCCTGATCAGT
			AAAT		
			SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
	AA	RASQTISRFLN	VASSLQS	QQSYSTLIS	
		SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	

B

Tabella 4B. Sequenze di acido nucleico e di amminoacidi di CDRH1, CDRH2 e CDRH3.

IPS n.	Ab	Tipo	CDRH1	CDRH2	CDRH3
iPS:336067	5G12.006	NA	AGCTATGGCATACA C	GTTATATGGTATGAT GGAAGTAATAAGTTC CATGCAGACTCCGTG AAGGGC	GGAAAAGTGGCTGG TATGCCTGAAGCTTT TGAAATC
			SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
		AA	SYGIH	VIWYDGSNKFHADSV KG	GKVAGMPEAFEI
			SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

Tabella 5. Sequenze di acido nucleico (“NA”) e amminoacidi (“AA”) di catena leggera e pesante.

iPS n.	Ab	Tipo	LC	HC
IPS:336067	5G12.006	NA	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCC ATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACTATCACTTGC CGGGCAAGTCAGACCATTAGCA GGTTTTTAAATTGGTATCAGCAG AAACCTGGGAAAGCCCCTGAGCT CCTGATCTATGTTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGAT TCAGTGGCAGTGGTCTGGGACA GATTTCACTCTACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA CTTACTACTGTCAACAGAGTTAC AGTACCCTGATCAGTTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCACA CGAACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTTCATTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACAAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGCTGCCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCTGTAC AGCGTCTGGATTACCTTCAGTA GCTATGGCATACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATATGGTAT GATGGAAGTAATAAGTTCATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACTC GGCTATGTA TCTGTGCGAGAG GAAAAGTGGCTGGTATGCCTGA AGCTTTTGAAATCTGGGGCCAAG GGACAAAGGTCACCGTCTCTTCA GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTCCCCCTGGCACCCCTCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGCGCCCT GACCAGCGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAATC ACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC

B

			AGTCTTCCTCTTCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAAGCCGT GTGAGGAGCAGTACGGCAGCAC GTACCGTTGTGTCAGCGTCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
		SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
AA	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQTISRFLNWWYQKPGKAPELLIY VASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTLISFG QGTKLEITRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCT ASGFTFSSYGIIHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKFHADSVMKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDSA MYFCARGKVAGMPEAFEIHWQQG TKVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW	

	STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8

Le regioni determinanti la complementarità (CDR) e le regioni cornice (FR) di un dato anticorpo possono essere identificate usando il sistema descritto da Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, pubblicazione NIH n. 91-3242, 1991. Certi anticorpi che sono divulgati nella presente comprendono una o più sequenze di amminoacidi che sono identiche o che hanno un'identità di sequenza sostanziale alle sequenze di amminoacidi di una o più delle CDR presentate nelle TABELLE 4A e 4B. Queste CDR usano il sistema descritto da Kabat et al. come sopra indicato.

La struttura e le proprietà delle CDR all'interno di un anticorpo naturale sono state descritte sopra. In breve, in un anticorpo tradizionale, le CDR sono incorporate all'interno di una cornice nella regione variabile di catena pesante e leggera dove costituiscono le regioni responsabili del legame e del riconoscimento dell'antigene. Una regione variabile comprende almeno tre CDR di catena pesante o leggera, *si veda* sopra

(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; *si veda* anche Chothia e Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883), all'interno di una regione cornice (regioni cornice 1-4 designate, FR1, FR2, FR3 e FR4, da Kabat *et al.*, 1991, sopra, *si veda* anche Chothia e Lesk, 1987, *supra*). Tuttavia, le CDR fornite nella presente possono non solo essere usate per definire il dominio legante l'antigene di una struttura di anticorpale tradizionale, ma possono essere incorporate in una varietà di altre strutture di polipeptide, come descritto nella presente.

Le proteine leganti l'antigene che sono fornite includono anticorpi monoclonali. Gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti usando qualsiasi tecnica nota nell'arte, ad esempio rendendo immortali cellule della milza raccolte dall'animale transgenico dopo il completamento del programma di immunizzazione. Le cellule della milza possono essere rese immortali usando qualsiasi tecnica nota nell'arte, ad esempio fondendole con cellule di mieloma per produrre ibridomi. Le cellule di mieloma per uso nelle procedure di fusione per la produzione di ibridomi preferibilmente non producono anticorpi, hanno un'alta efficienza di fusione e carenze enzimatiche che le rendono incapaci di crescere in certi terreni selettivi che supportano la crescita solo delle cellule fuse desiderate (ibridomi). Esempi di linee cellulari adatte per uso nelle fusioni di topi includono Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 e S194/5XXO

Bul; esempi di linee cellulari usate nelle fusioni di ratto includono R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F e 4B210. Altre linee cellulari utili per le fusioni cellulari sono U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 e UC729-6.

In alcune esemplificazioni, una linea cellulare di ibridoma viene prodotta immunizzando un animale (ad esempio, un animale transgenico avente sequenze di immunoglobulina umane) con un immunogeno; prelevando cellule della milza dall'animale immunizzato; fondendo le cellule della milza prelevate con una linea cellulare di mieloma, generando così cellule di ibridoma; consolidando linee cellulari di ibridoma dalle cellule di ibridoma, e identificando una linea cellulare di ibridoma che produce un anticorpo che si lega a un polipeptide bersaglio. Tali linee cellulari di ibridoma, e gli anticorpi monoclonali da esse prodotti sono aspetti della presente domanda.

Gli anticorpi monoclonali secreti da una linea cellulare di ibridoma possono essere purificati usando qualsiasi tecnica nota nell'arte. Gli ibridomi o i mAb possono essere ulteriormente sottoposti a screening per identificare mAb con proprietà particolari.

Vengono inoltre forniti anticorpi chimerici e umanizzati basati sulle sequenze di cui sopra. Gli anticorpi monoclonali per uso come agenti terapeutici possono essere modificati in vari modi prima dell'uso. Un esempio è un anticorpo chimerico, che è un anticorpo composto da segmenti di proteina di anticorpi differenti uniti in modo covalente per produrre catene leggere o pesanti di immunoglobulina funzionali o loro

porzioni immunologicamente funzionali. Generalmente, una porzione della catena pesante e/o della catena leggera è identica o omologa a una sequenza corrispondente in anticorpi derivati da una particolare specie o appartenenti a una particolare classe o sottoclasse di anticorpi, mentre il resto della/e catena/e è identico o omologo a una sequenza corrispondente in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti a un'altra classe o sottoclasse di anticorpi. Per i metodi relativi agli anticorpi chimerici, *si veda*, ad esempio, il brevetto statunitense n. 4,816,567; e Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. L'innesto di CDR è descritto, ad esempio, nei brevetti statunitensi n. 6,180,370, n. 5,693,762, n. 5,693,761, n. 5,585,089, e n. 5,530,101.

Generalmente, l'obiettivo del realizzare un anticorpo chimerico è creare una chimera in cui il numero di amminoacidi della specie del paziente interessato sia massimizzato. Un esempio è l'anticorpo "con innesto di CDR", in cui l'anticorpo comprende una o più regioni determinanti la complementarità (CDR) di una specie particolare o appartenenti a una classe o sottoclasse di anticorpi particolare, mentre il resto della/e catena/e dell'anticorpo è identico o omologo a una sequenza corrispondente in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti a un'altra classe o sottoclasse di anticorpi. Per l'uso negli esseri umani, la regione variabile o le CDR selezionate di un anticorpo di roditore vengono spesso innestate in un anticorpo umano, sostituendo le regioni variabili o le CDR presenti in natura dell'anticorpo umano.

Un tipo utile di anticorpo chimerico è un anticorpo "umanizzato". Generalmente, un anticorpo umanizzato viene prodotto da un anticorpo monoclonale inizialmente sviluppato in un animale non umano. Certi residui di amminoacidi in questo anticorpo monoclonale, tipicamente da porzioni dell'anticorpo che non riconoscono l'antigene, vengono modificati per essere omologhi a residui corrispondenti in un anticorpo umano dell'isotipo corrispondente. L'umanizzazione può essere eseguita, ad esempio, usando vari metodi sostituendo almeno una porzione di una regione variabile di roditore con le regioni corrispondenti di un anticorpo umano (*si vedano*, ad esempio, i brevetti statunitensi n. 5,585,089, e n. 5,693,762; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536).

In un aspetto, le CDR delle regioni variabili di catena leggera e pesante degli anticorpi forniti nella presente vengono innestate in regioni cornice (FR) di anticorpi della stessa specie filogenetica o di una differente. Ad esempio, le CDR delle regioni variabili di catena pesante e leggera  $V_H1$ ,  $V_H2$ ,  $V_H3$ ,  $V_H4$ ,  $V_H5$ ,  $V_H6$ ,  $V_H7$ ,  $V_H8$ ,  $V_H9$ ,  $V_H10$ ,  $V_H11$ ,  $V_H12$  e/o  $V_L1$ , e  $V_L2$  possono essere innestate su FR umana consenso. Per creare FR umane consenso, FR da svariate sequenze di amminoacidi di catena pesante o catena leggera umane possono essere allineate per identificare una sequenza di amminoacidi consenso. In altre forme di realizzazione, gli FR di una catena pesante o di una catena leggera divulgata nella presente vengono sostituiti con gli FR di una catena

pesante o di una catena leggera differente. In un aspetto, amminoacidi rari negli FR delle catene pesanti e leggere di anticorpi non vengono sostituiti, mentre il resto degli amminoacidi di FR viene sostituito. Un "amminoacido raro" è un amminoacido specifico che è in una posizione in cui questo particolare amminoacido non viene solitamente trovato in un FR. In alternativa, le regioni variabili innestate dall'una catena pesante o leggera possono essere usate con una regione costante che è differente rispetto alla regione costante di quella particolare catena pesante o leggera, come divulgato nella presente. In altre forme di realizzazione, le regioni variabili innestate fanno parte di un anticorpo Fv a catena singola.

In alcune forme di realizzazione, regioni costanti di specie diverse dall'essere umano possono essere usate insieme alla/e regione/i variabile/i umana/e per produrre anticorpi ibridi.

Vengono forniti anche anticorpi completamente umani. Sono disponibili metodi per realizzare anticorpi completamente umani specifici per un dato antigene senza esporre esseri umani all'antigene ("anticorpi completamente umani"). Un mezzo specifico fornito per implementare la produzione di anticorpi completamente umani è l'"umanizzazione" del sistema immunitario umorale di topo. L'introduzione di loci di immunoglobulina (Ig) umani nei topi in cui i geni Ig endogeni sono stati inattivati è un mezzo per produrre anticorpi monoclonali (mAb) completamente umani nel topo, un animale che può essere immunizzato con qualsiasi antigene desiderabile. Usare anticorpi completamente

umani può ridurre al minimo le risposte immunogene e allergiche che possono talvolta essere causate dalla somministrazione di mAb di topo o derivati da topo agli esseri umani come agenti terapeutici.

Anticorpi completamente umani possono essere prodotti immunizzando animali transgenici (solitamente topi) che sono in grado di produrre un repertorio di anticorpi umani in assenza di produzione di immunoglobuline endogene. Gli antigeni per questo scopo hanno tipicamente sei o più amminoacidi contigui e, facoltativamente, sono coniugati a un trasportatore, come un aptene. *Si veda*, ad esempio, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; e Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. In un esempio di tale metodo, animali transgenici vengono prodotti inabilitando i loci di immunoglobulina di topo endogeni codificanti le catene di immunoglobulina pesanti e leggere di topo in essi presenti, e inserendo nel genoma di topo grandi frammenti di DNA di genoma umano contenenti loci che codificano le proteine di catena pesante e leggera umane. Animali parzialmente modificati, che hanno meno della gamma completa di loci di immunoglobulina umani, vengono poi incrociati per ottenere un animale avente tutte le modifiche desiderate del sistema immunitario. Quando viene somministrato un immunogeno, questi animali transgenici producono anticorpi immunospecifici per l'immunogeno, ma hanno sequenze di amminoacidi umane anziché di topo, incluse le regioni variabili. Per ulteriori dettagli su tali metodi, *si veda*, ad esempio, WO96/33735 e WO94/02602. Metodi aggiuntivi

relativi ai topi transgenici per realizzare anticorpi umani sono descritti nei brevetti statunitensi n. 5,545,807; n. 6,713,610; n. 6,673,986; n. 6,162,963; n. 5,545,807; n. 6,300,129; n. 6,255,458; n. 5,877,397; n. 5,874,299 e n. 5,545,806; nelle pubblicazioni PCT WO91/10741, WO90/04036, e in EP 546073B1 e EP 546073A1.

I topi transgenici descritti sopra, cui nella presente si fa riferimento come topi "HuMab", contengono un minilocus di gene di immunoglobulina umano che codifica sequenze di immunoglobuline di catena pesante ( $[\mu]$  e  $[\gamma]$ ) e leggera  $[\kappa]$  umane non riarrangiate, insieme a mutazioni mirate che inattivano i loci di catena  $[\mu]$  e  $[\kappa]$  endogeni (Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859). Di conseguenza, i topi esibiscono un'espressione ridotta di IgM o  $[\kappa]$  di topo e in risposta all'immunizzazione, e i transgeni di catena pesante e leggera umane introdotti subiscono un cambio di classe e una mutazione somatica per generare anticorpi monoclonali IgG  $[\kappa]$  umani ad alta affinità (Lonberg *et al.*, sopra; Lonberg e Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; Harding e Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536-546). La preparazione di topi HuMab è descritta in dettaglio in Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al., 1993, International Immunology 5:647-656; Tuaille et al., 1994, J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor et al., 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg e Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding e Lonberg, 1995, Ann. N.Y

Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845-851. *Si vedano* inoltre i brevetti statunitensi n. 5,545,806; n. 5,569,825; n. 5,625,126; n. 5,633,425; n. 5,789,650; n. 5,877,397; n. 5,661,016; n. 5,814,318; n. 5,874,299; e n. 5,770,429; nonché il brevetto statunitense n. 5,545,807; le domande internazionali n. WO 93/1227; WO 92/22646; e WO 92/03918. Le tecnologie utilizzate per produrre anticorpi umani in questi topi transgenici sono divulgate anche in WO 98/24893 e Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15: 146-156. Ad esempio, i ceppi di topi transgenici HCo7 e HCo12 possono essere usati per generare anticorpi monoclonali umani contro un antigene bersaglio. Di seguito vengono forniti ulteriori dettagli riguardanti la produzione di anticorpi umani usando topi transgenici.

Usando la tecnologia degli ibridomi, mAb umani specifici per l'antigene con la specificità desiderata possono essere prodotti e selezionati dai topi transgenici come quelli descritti sopra. Tali anticorpi possono essere clonati ed espressi usando un vettore e una cellula ospite adatti, oppure gli anticorpi possono essere raccolti da cellule di ibridoma coltivate.

Anticorpi completamente umani possono anche essere derivati da librerie di esposizione su fagi (come descritto in Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; e Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Le tecniche di esposizione su fagi imitano la selezione immunitaria attraverso l'esposizione di repertori di anticorpi sulla superficie di un batteriofago filamentoso, e la successiva selezione di un fago mediante

il suo legame con un antigene di scelta. Una di queste tecniche è descritta nella pubblicazione PCT n. WO 99/10494.

Vengono inoltre forniti derivati delle proteine leganti l'antigene che sono descritte nella presente. Le proteine leganti l'antigene derivatizzate possono comprendere qualsiasi molecola o sostanza che conferisca una proprietà desiderata all'anticorpo o al frammento, come, ad esempio, un'emivita aumentata in un uso particolare. La proteina legante l'antigene derivatizzata può comprendere, ad esempio, una frazione rilevabile (o di marcatura) (ad esempio una molecola radioattiva, colorimetrica, antigenica o enzimatica, una biglia rilevabile (come una biglia magnetica o elettrondensa (ad esempio d'oro)), o una molecola che si lega ad un'altra molecola (ad esempio biotina o streptavidina)), una frazione terapeutica o diagnostica (ad esempio una frazione radioattiva, citotossica o farmaceuticamente attiva), o una molecola che aumenta l'idoneità della proteina legante l'antigene per un uso particolare (ad esempio somministrazione a un soggetto, come un soggetto umano, o altri usi *in vivo* o *in vitro*). Esempi di molecole che possono essere usate per derivatizzare una proteina legante l'antigene includono albumina (ad esempio albumina sierica umana) e polietilenglicole (PEG). Derivati collegati ad albumina e PEGilati di proteine leganti l'antigene possono essere preparati usando tecniche ben note nell'arte. Certe proteine leganti l'antigene includono un polipeptide a catena singola PEGilato come descritto nella presente. In una forma di realizzazione, la proteina legante l'antigene è coniugata o altrimenti collegata a transtiretina (TTR)

o a una variante di TTR. La TTR o la variante di TTR può essere modificata chimicamente, ad esempio, con una sostanza chimica selezionata dal gruppo consistente in destrano, poli(n-vinilpirrolidone), glicoli di polietilene, omopolimeri di propilenglicole, copolimeri di ossido di polipropilene/ossido di etilene, polioli poliossietilati e alcoli polivinilici.

Altri derivati includono coniugati covalenti o aggregativi di proteine leganti l'antigene con altre proteine o polipeptidi, come mediante l'espressione di proteine di fusione ricombinanti comprendenti polipeptidi eterologhi fusi all'N-terminale o al C-terminale di una proteina legante l'antigene. Ad esempio, il peptide coniugato può essere un polipeptide segnale (o leader) eterologo, ad esempio il leader di fattore alfa di lievito o un peptide come un tag epitopico. Proteine di fusione contenenti proteine leganti l'antigene possono comprendere peptidi aggiunti per facilitare la purificazione o l'identificazione della proteina legante l'antigene (ad esempio poli-His). Una proteina legante l'antigene può anche essere collegata al peptide FLAG come descritto in Hopp et al., 1988, *Bio/Technology* 6: 1204; e nel brevetto statunitense n. 5,011,912. Il peptide FLAG è altamente antigenico e fornisce un epitopo legato in modo reversibile da uno specifico anticorpo monoclonale (mAb), consentendo un rapido saggio e una facile purificazione della proteina ricombinante espressa. Reagenti utili per la preparazione di proteine di fusione in cui il peptide FLAG è fuso a un dato polipeptide sono disponibili in commercio (Sigma, St. Louis, MO).

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende una o più marcature. Il termine "gruppo di marcatura" o "marcatura" significa qualsiasi marcatura rilevabile. Esempi di gruppi di marcatura adatti includono, ma senza limitarsi, quanto segue: radioisotopi o radionuclidi (ad esempio  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), gruppi fluorescenti (ad esempio FITC, rodamina, fosfori lantanidi), gruppi enzimatici (ad esempio perossidasi di rafano,  $\beta$ -galattosidasi, luciferasi, fosfatasi alcalina), gruppi chemiluminescenti, gruppi biotinile, o epitopi di polipeptidi predeterminati riconosciuti da un reporter secondario (ad esempio sequenze di coppie di cerniera di leucine, siti di legame per anticorpi secondari, domini di legame a metalli, tag epitopici). In alcune realizzazioni, il gruppo di marcatura è accoppiato alla proteina legante l'antigene tramite bracci di distanziatore di varie lunghezze per ridurre il potenziale ingombro sterico. Nell'arte sono noti vari metodi per marcare le proteine che possono essere usati a seconda delle esigenze.

Il termine "gruppo effetore" significa qualsiasi gruppo accoppiato a una proteina legante l'antigene che agisce come agente citotossico. Esempi di gruppi effettori adatti sono radioisotopi o radionuclidi (ad esempio  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ). Altri gruppi adatti includono tossine, gruppi terapeutici, o gruppi chemioterapici. Esempi di gruppi adatti includono calicheamicina, auristatine, geldanamicina e maitansina. In alcune forme di realizzazione, il gruppo effetore è

accoppiato alla proteina legante l'antigene tramite bracci di distanziatore di varie lunghezze per ridurre il potenziale ingombro sterico.

In generale, le marcature rientrano in una varietà di classi, a seconda del saggio in cui devono essere rilevate: a) marcature isotopiche, che possono essere isotopi radioattivi o pesanti; b) marcature magnetiche (ad esempio particelle magnetiche); c) frazioni redox attive; d) coloranti ottici; gruppi enzimatici (ad esempio perossidasi di rafano,  $\beta$ -galattosidasi, luciferasi, fosfatasi alcalina); e) gruppi biotinilati; e f) epitopi di polipeptidi predeterminati riconosciuti da un reporter secondario (ad esempio sequenze di coppie di cerniera di leucine, siti di legame per anticorpi secondari, domini di legame a metalli, tag epitopici, eccetera). In alcune realizzazioni, il gruppo di marcatura è accoppiato alla proteina legante l'antigene tramite bracci di distanziatore di varie lunghezze per ridurre il potenziale ingombro sterico. Nell'arte sono noti vari metodi per la marcatura delle proteine.

Marcature specifiche includono coloranti ottici, inclusi, ma senza limitarsi, cromofori, fosfori e fluorofori, questi ultimi essendo specifici in molte esemplificazioni. I fluorofori possono essere fluori "a piccola molecola" o fluori proteici.

Per "marcatura fluorescente" si intende qualsiasi molecola che può essere rilevata tramite le sue proprietà fluorescenti intrinseche. Marcature fluorescenti adatte includono, ma senza limitarsi, fluoresceina, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarine, pirene, verde malachite, stilbene, giallo Lucifero,

Cascade BlueJ, rosso Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregon, i coloranti Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), blu Cascade, giallo Cascade e R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, rodamina, e Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Coloranti ottici adatti, inclusi fluorofori, sono descritti in Molecular Probes Handbook di Richard P. Haugland.

Marcature fluorescente proteiche adatte includono anche, ma senza limitarsi, proteine fluorescenti verdi, inclusa una specie di GFP di *Renilla*, *Ptilosarcus* o *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., numero di accesso Genbank U55762), proteina fluorescente blu (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6: 178-182), proteina fluorescente gialla potenziata (EYFP, Clontech Labs., Inc.), luciferasi (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417),  $\beta$ -galattosidasi (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) e *Renilla* (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, brevetti statunitensi n. 5292658, n. 5418155, n. 5683888, n. 5741668, n. 5777079, n. 5804387, n. 5874304, n. 5876995, n. 5925558).

Sono inoltre forniti acidi nucleici che codificano le proteine leganti l'antigene descritte nella presente, o loro porzioni, inclusi acidi nucleici

codificanti una o entrambe le catene di un anticorpo, o un/una suo/a frammento, derivato, muteina o variante, polinucleotidi codificanti regioni variabili di catena pesante o solo CDR, polinucleotidi sufficienti per l'uso come sonde di ibridazione, primer per PCR o primer di sequenziamento per identificare, analizzare, mutare o amplificare un polinucleotide codificante un polipeptide, acidi nucleici antisenso per inibire l'espressione di un polinucleotide, e sequenze complementari di quanto sopra. Gli acidi nucleici possono avere qualsiasi lunghezza. Possono avere, ad esempio, una lunghezza di 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500, 3.000, 5.000 o più nucleotidi e/o possono comprendere una o più sequenze aggiuntive, ad esempio sequenze regolatrici, e/o far parte di un acido nucleico più grande, ad esempio un vettore. Gli acidi nucleici possono essere a singolo filamento o a doppio filamento e possono comprendere nucleotidi di RNA e/o DNA e loro varianti artificiali (ad esempio, acidi peptidonucleici). Qualsiasi regione variabile fornita nella presente può essere attaccata a queste regioni costanti per formare sequenze di catene pesanti e leggere complete. Tuttavia, resta inteso che queste sequenze di regioni costanti sono fornite solo come esempi specifici. In alcune forme di realizzazione, le sequenze di regione variabile vengono unite ad altre sequenze di regione costante che sono note nell'arte.

Acidi nucleici codificanti certe proteine leganti l'antigene, o loro porzioni (ad esempio anticorpo a lunghezza intera, catena pesante o

leggera, dominio variabile, o CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3), possono essere isolati da cellule B di topi che sono stati immunizzati con antigene. L'acido nucleico può essere isolato mediante procedure convenzionali come la reazione a catena della polimerasi (PCR). L'esposizione su fagi è un altro esempio di tecnica nota con cui possono essere preparati derivati di anticorpi e altre proteine leganti l'antigene. In un approccio, polipeptidi che sono componenti di una proteina legante l'antigene di interesse vengono espressi in qualsiasi sistema di espressione ricombinante adatto, e ai polipeptidi espressi viene consentito di assemblarsi per formare proteine leganti l'antigene.

Un ulteriore aspetto fornisce acidi nucleici che si ibridano con altri acidi nucleici in particolari condizioni di ibridazione. Metodi per l'ibridazione di acidi nucleici sono ben noti nell'arte. *Si veda*, ad esempio, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Come definito nella presente, una condizione di ibridazione moderatamente stringente usa una soluzione di prelavaggio contenente 5x cloruro di sodio/citrato di sodio (SSC), 0,5% di SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampone di ibridazione di circa il 50% di formammide, 6x SSC, e una temperatura di ibridazione di 55 °C (o altre soluzioni di ibridazione simili, come una contenente circa il 50% di formammide, con una temperatura di ibridazione di 42 °C) e condizioni di lavaggio di 60 °C, in 0,5x SSC, 0,1% di SDS. Una condizione di ibridazione stringente ibrida in 6x SSC a 45 °C, cui fanno seguito uno o più lavaggi in 0,1x SSC, 0,2% di SDS a 68 °C. Per di più, un tecnico del ramo può manipolare le

condizioni di ibridazione e/o lavaggio per aumentare o diminuire la stringenza di ibridazione in modo che gli acidi nucleici comprendenti sequenze di nucleotidi che sono almeno al 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% identiche tra loro rimangano tipicamente ibridati tra loro.

I parametri di base che influenzano la scelta delle condizioni di ibridazione e le linee guida per l'elaborazione di condizioni adatte sono esposti, ad esempio, da Sambrook, Fritsch e Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., sopra; e *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., curatori, John Wiley & Sons, Inc., sezioni 2.10 e 6.3-6.4), e possono essere facilmente determinati dai tecnici del ramo di ordinarie competenze in base, ad esempio, alla lunghezza e/o alla composizione in basi dell'acido nucleico.

Cambiamenti possono essere introdotti tramite mutazione in un acido nucleico, portando così a cambiamenti nella sequenza di amminoacidi di un polipeptide (ad esempio un anticorpo o un derivato di anticorpo) che codifica. Le mutazioni possono essere introdotte usando qualsiasi tecnica nota nell'arte. In una forma di realizzazione, uno o più residui di amminoacidi particolari vengono cambiati usando, ad esempio, un protocollo di mutagenesi sito-diretta. In un'altra forma di realizzazione, uno o più residui selezionati casualmente vengono cambiati usando, ad esempio, un protocollo di mutagenesi casuale. Comunque venga

realizzato, un polipeptide mutante può essere espresso e sottoposto a screening per una proprietà desiderata.

Le mutazioni possono essere introdotte in un acido nucleico senza alterare significativamente l'attività biologica del polipeptide che codifica. Ad esempio, è possibile realizzare sostituzioni di nucleotidi che portano a sostituzioni di amminoacidi in residui di amminoacidi non essenziali. In alternativa, in un acido nucleico possono essere introdotte una o più mutazioni che cambiano selettivamente l'attività biologica di un polipeptide che codifica. Ad esempio, la mutazione può cambiare quantitativamente o qualitativamente l'attività biologica. Esempi di cambiamenti quantitativi includono aumentare, ridurre o eliminare l'attività. Esempi di cambiamenti qualitativi includono cambiare la specificità per l'antigene di un anticorpo. In una forma di realizzazione, un acido nucleico codificante qualsiasi proteina legante l'antigene descritta nella presente può essere mutato per alterare la sequenza di amminoacidi usando tecniche di biologia molecolare ben consolidate nell'arte.

Un altro aspetto fornisce molecole di acido nucleico che sono adatte per l'uso come primer o sonde di ibridazione per il rilevamento di sequenze di acido nucleico. Una molecola di acido nucleico può comprendere solo una porzione di una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide a lunghezza intera, ad esempio un frammento che può essere usato come sonda o primer oppure un frammento codificante una porzione attiva di un polipeptide.

Le sonde basate sulla sequenza di un acido nucleico possono essere usate per rilevare l'acido nucleico o acidi nucleici simili, ad esempio trascritti codificanti un polipeptide. La sonda può comprendere un gruppo di marcatura, ad esempio un radioisotopo, un composto fluorescente, un enzima, o un cofattore enzimatico. Tali sonde possono essere usate per identificare una cellula che esprime il polipeptide.

Un altro aspetto fornisce vettori comprendenti un acido nucleico codificante un polipeptide o una sua porzione (ad esempio un frammento contenente una o più CDR o uno o più domini di regione variabile). Esempi di vettori includono, ma senza limitarsi, plasmidi, vettori virali, vettori di mammifero non episomali e vettori di espressione, ad esempio vettori di espressione ricombinante. I vettori di espressione ricombinante possono comprendere un acido nucleico in una forma adatta all'espressione dell'acido nucleico in una cellula ospite. I vettori di espressione ricombinante includono una o più sequenze regolatrici, selezionate sulla base delle cellule ospiti da usare per l'espressione, che sono collegate funzionalmente alla sequenza di acido nucleico da esprimere. Le sequenze regolatrici includono quelle che dirigono l'espressione costitutiva di una sequenza di nucleotidi in molti tipi di cellule ospiti (ad esempio il potenziatore del gene precoce SV40, il promotore di virus del sarcoma di Rous e il promotore di citomegalovirus), quelli che dirigono l'espressione della sequenza di nucleotidi solo in certe cellule ospiti (ad esempio sequenze regolatrici tessuto-specifiche, *si veda* Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci.

11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236: 1237) e quelle che dirigono l'espressione inducibile di una sequenza di nucleotidi in risposta a un trattamento o a una condizione particolare (ad esempio il promotore di metallotioneina in cellule di mammifero e il promotore che risponde a tet e/o che risponde alla streptomina in sistemi sia procariotici che eucariotici (*si veda, id.*). I tecnici del ramo comprenderanno che la progettazione del vettore di espressione può dipendere da fattori quali la scelta della cellula ospite da trasformare, il livello di espressione della proteina desiderata, eccetera. I vettori di espressione possono essere introdotti nelle cellule ospiti per produrre in tal modo proteine o peptidi, incluse proteine di fusione o peptidi, codificati da acidi nucleici come descritto nella presente.

Un altro aspetto fornisce cellule ospiti nelle quali è stato introdotto un vettore di espressione ricombinante. Una cellula ospite può essere qualsiasi cellula procariotica (ad esempio, *E. coli*) o cellula eucariotica (ad esempio, cellule di lievito, di insetto o di mammifero (ad esempio cellule CHO)). DNA vettoriale può essere introdotto in cellule procariotiche o eucariotiche tramite tecniche convenzionali di trasformazione o trasfezione. Per la trasfezione stabile di cellule di mammifero, è noto che, a seconda del vettore di espressione e della tecnica di trasfezione usati, solo una piccola quota di cellule può integrare il DNA estraneo nel proprio genoma. Al fine di identificare e selezionare questi integranti, un gene che codifica un marcatore selezionabile (ad esempio per la resistenza agli antibiotici) viene generalmente introdotto

nelle cellule ospiti insieme al gene di interesse. Marcatori selezionabili preferiti includono quelli che conferiscono resistenza ai farmaci, come G418, igromicina e metotrexato. Le cellule trasfettate stabilmente con l'acido nucleico introdotto possono essere identificate mediante la selezione con farmaci (ad esempio le cellule che hanno incorporato il gene di marcatore selezionabile sopravviveranno, mentre le altre cellule muoiono), tra gli altri metodi.

Nella presente vengono inoltre forniti sistemi e costrutti di espressione sotto forma di plasmidi, vettori di espressione, cassette di trascrizione o espressione che comprendono almeno un polinucleotide come descritto sopra, nonché cellule ospiti comprendenti tali sistemi o costrutti di espressione.

Le proteine leganti l'antigene fornite nella presente possono essere preparate mediante qualsiasi di numerose tecniche convenzionali. Ad esempio, proteine leganti l'antigene possono essere prodotte mediante sistemi di espressione ricombinante, usando qualsiasi tecnica nota nell'arte. *Si veda*, ad esempio, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (curatore) Plenum Press, New York (1980); e *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow e Lane (curatore), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Le proteine leganti l'antigene possono essere espresse in linee cellulari di ibridoma (ad esempio, in particolare, gli anticorpi possono essere espressi in ibridomi) o in linee cellulari diverse dagli ibridomi. I

costrutti di espressione codificanti gli anticorpi possono essere usati per trasformare una cellula ospite di mammifero, insetto o microbo. La trasformazione può essere eseguita usando qualsiasi metodo noto per introdurre polinucleotidi in una cellula ospite, incluso, ad esempio, l'impacchettamento del polinucleotide in un virus o in un batteriofago e la trasduzione di una cellula ospite con il costrutto mediante procedure di trasfezione note nell'arte, come esemplificato dai brevetti statunitensi n. 4,399,216; n. 4,912,040; n. 4,740,461; n. 4,959,455. La procedura di trasformazione ottimale usata dipenderà dal tipo di cellula ospite che si sta trasformando. I metodi per l'introduzione di polinucleotidi eterologhi in cellule di mammifero sono ben noti nell'arte e includono, ma senza limitarsi, la trasfezione mediata da destrano, la precipitazione con fosfato di calcio, la trasfezione mediata da polibrene, la fusione di protoplasti, l'elettroporazione, l'incapsulamento del/dei polinucleotide/i in liposomi, la miscelazione di acido nucleico con lipidi caricati positivamente, e la microiniezione diretta del DNA nei nuclei.

I costrutti di espressione ricombinante comprendono tipicamente una molecola di acido nucleico codificante un polipeptide comprendente uno o più dei seguenti: una o più CDR fornite nella presente; una regione costante di catena leggera; una regione variabile di catena leggera; una regione costante di catena pesante (ad esempio C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> e/o C<sub>H3</sub>); e/o un'altra porzione di impalcatura di una proteina legante l'antigene. Queste sequenze di acido nucleico vengono inserite in un vettore di espressione appropriato usando tecniche di ligazione standard. In una

forma di realizzazione, la regione costante di catena pesante o leggera viene apposta al C-terminale della regione variabile di catena pesante o leggera e viene legata in un vettore di espressione. Il vettore viene tipicamente selezionato per essere funzionale nella particolare cellula ospite impiegata (ossia il vettore è compatibile con il macchinario della cellula ospite, permettendo il verificarsi dell'amplificazione e/o dell'espressione del gene). In alcune forme di realizzazione, vengono usati vettori che impiegano saggi di complementazione proteina-frammento usando proteine reporter, come la diidrofollato reduttasi (*si veda*, ad esempio, il brevetto statunitense n. 6,270,964). Vettori di espressione adatti possono essere acquistati, ad esempio, da Invitrogen Life Technologies o BD Biosciences (in precedenza "Clontech"). Altri vettori utili per il clonaggio e l'espressione di anticorpi e frammenti includono quelli descritti in Bianchi e McGrew, 2003, *Biotech. Biotechnol. Bioeng.* 84:439-44. Altri vettori di espressione adatti sono discussi, ad esempio, in *Methods Enzymol.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

Tipicamente, i vettori di espressione usati in qualsiasi delle cellule ospiti conterranno sequenze per il mantenimento del plasmide e per il clonaggio e l'espressione di sequenze di nucleotidi esogene. Tali sequenze, cui si fa riferimento collettivamente come "sequenze fiancheggianti" in certe forme di realizzazione, includeranno tipicamente una o più delle seguenti sequenze di nucleotidi: un promotore, una o più sequenze di potenziatore, un'origine di replicazione, una sequenza di

terminazione trascrizionale, una sequenza intronica completa contenente un sito di splicing donatore e accettore, una sequenza codificante una sequenza leader per la secrezione di polipeptidi, un sito di legame al ribosoma, una sequenza di poliadenilazione, una regione poli-linker per l'inserimento dell'acido nucleico codificante il polipeptide da esprimere, e un elemento marcatore selezionabile. Di seguito viene discussa ciascuna di queste sequenze.

Facoltativamente, il vettore può contenere una sequenza codificante un "tag", ossia una molecola oligonucleotidica situata all'estremità 5' o 3' della sequenza codificante la proteina legante l'antigene; la sequenza oligonucleotidica codifica poli-His (come esa-His) o un altro "tag" come FLAG<sup>®</sup>, HA (emoagglutinina di virus influenzale) o myc, per il quale esistono anticorpi disponibili in commercio. Questo tag viene tipicamente fuso al polipeptide in seguito all'espressione del polipeptide e può servire come mezzo per la purificazione per affinità o il rilevamento della proteina legante l'antigene dalla cellula ospite. La purificazione per affinità può essere assoluta, ad esempio, mediante cromatografia su colonna usando anticorpi contro il tag come matrice di affinità. Facoltativamente, il tag può essere successivamente rimosso dalla proteina legante l'antigene purificata mediante vari mezzi, ad esempio usando certe peptidasi per il clivaggio.

Le sequenze fiancheggianti possono essere omologhe (ossia della/o stessa/o specie e/o ceppo della cellula ospite), eterologhe (ossia da una specie diversa dalla specie o dal ceppo della cellula ospite), ibride

(ossia una combinazione di sequenze fiancheggianti da più di una fonte), sintetiche o native. Di fatto, la fonte di una sequenza fiancheggianta può essere qualsiasi organismo procariotico o eucariotico, qualsiasi organismo vertebrato o invertebrato, oppure qualsiasi pianta, a condizione che la sequenza fiancheggianta sia funzionale nel, e possa essere attivata dal, macchinario della cellula ospite.

Sequenze fiancheggianti utili nei vettori possono essere ottenute mediante qualsiasi di svariati metodi ben noti nell'arte. Tipicamente, sequenze fiancheggianti utili nella presente saranno state precedentemente identificate mediante mappatura e/o digestione con endonucleasi di restrizione e potranno perciò essere isolate dalla fonte tessutale appropriata usando le endonucleasi di restrizione appropriate. In alcuni casi, può essere nota la sequenza di nucleotidi completa di una sequenza fiancheggianta. Qui, la sequenza fiancheggianta può essere sintetizzata usando i metodi descritti nella presente per la sintesi o il clonaggio di acidi nucleici.

Che sia nota tutta o solo una porzione della sequenza fiancheggianta, essa può essere ottenuta mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e/o mediante lo screening di una libreria genomica con una sonda adatta, come un oligonucleotide e/o un frammento di sequenza fiancheggianta della stessa specie o di un'altra. Quando la sequenza fiancheggianta non è nota, un frammento di DNA contenente una sequenza fiancheggianta può essere isolato da un pezzo di DNA più grande che può contenere, ad esempio, una sequenza

codificante o persino un altro gene o altri geni. L'isolamento può essere assolto mediante digestione con endonucleasi di restrizione per produrre il frammento di DNA corretto, cui fa seguito isolamento usando la purificazione su gel di agarosio, la cromatografia su colonna Qiagen® (Chatsworth, CA) o altri metodi noti al tecnico del ramo. La selezione di enzimi adatti per assolvere questo scopo sarà immediatamente evidente a un tecnico del ramo.

Un'origine di replicazione è tipicamente una parte di quei vettori di espressione procariotici acquistati in commercio e l'origine è di ausilio nell'amplificazione del vettore in una cellula ospite. Se il vettore scelto non contiene un sito di origine di replicazione, è possibile sintetizzarne uno chimicamente sulla base di una sequenza nota e legarlo al vettore. Ad esempio, l'origine di replicazione del plasmide pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) è adatta alla maggior parte dei batteri Gram-negativi e varie origini virali (ad esempio, SV40, polyoma, adenovirus, virus della stomatite vescicolare (VSV) o papillomavirus come HPV o BPV) sono utili per il clonaggio di vettori nelle cellule di mammifero. Generalmente, il componente di origine di replicazione non è necessario per i vettori di espressione di mammifero (ad esempio, l'origine di SV40 è spesso usata solo perché contiene anche il promotore precoce del virus).

Una sequenza di terminazione della trascrizione è tipicamente situata 3' rispetto all'estremità di una regione codificante polipeptide e serve per terminare la trascrizione. Solitamente, una sequenza di

terminazione della trascrizione nelle cellule procariotiche è un frammento ricco di G-C seguito da una sequenza di poli-T. Sebbene la sequenza possa essere facilmente clonata da una libreria o addirittura acquistata in commercio come parte di un vettore, può anche essere prontamente sintetizzata usando metodi per la sintesi di acidi nucleici come quelli descritti nella presente.

Un gene di marcatore selezionabile codifica una proteina necessaria per la sopravvivenza e la crescita di una cellula ospite fatta crescere in un terreno di coltura selettivo. I geni di marcatori di selezione tipici codificano proteine che (a) conferiscono resistenza ad antibiotici o ad altre tossine, ad esempio ampicillina, tetraciclina o kanamicina per le cellule ospiti procariotiche; (b) sopperiscono alle carenze auxotrofiche della cellula; o (c) forniscono nutrienti critici non disponibili in terreni complessi o definiti. I marcatori selezionabili specifici sono il gene di resistenza alla kanamicina, il gene di resistenza all'ampicillina e il gene di resistenza alla tetraciclina. Vantaggiosamente, un gene di resistenza alla neomicina può anche essere usato per la selezione sia in cellule ospiti procariotiche che eucariotiche.

Altri geni selezionabili possono essere usati per amplificare il gene che verrà espresso. L'amplificazione è il processo in cui i geni necessari per la produzione di una proteina critica per la crescita o la sopravvivenza cellulare vengono ripetuti in tandem all'interno dei cromosomi di generazioni successive di cellule ricombinanti. Esempi di marcatori selezionabili adatti per le cellule di mammifero includono i geni

della diidrofolato reduttasi (DHFR) e della timidina chinasi senza promotore. I trasformanti delle cellule di mammifero vengono sottoposti a pressione di selezione in cui solo i trasformanti sono adattati in modo univoco a sopravvivere in virtù del gene selezionabile presente nel vettore. La pressione di selezione viene imposta coltivando le cellule trasformate in condizioni in cui la concentrazione dell'agente di selezione nel terreno viene aumentata progressivamente, portando così all'amplificazione sia del gene selezionabile sia del DNA che codifica un altro gene, come una proteina legante l'antigene che si lega al polipeptide bersaglio. Conseguentemente, dal DNA amplificato vengono sintetizzati quantitativi maggiori di un polipeptide, come una proteina legante l'antigene.

Un sito di legame al ribosoma è solitamente necessario per l'inizio della traduzione dell'mRNA ed è caratterizzato da una sequenza di Shine-Dalgarno (procarioti) o una sequenza di Kozak (eucarioti). L'elemento è tipicamente situato 3' rispetto al promotore e 5' rispetto alla sequenza codificante del polipeptide da esprimere.

In alcuni casi, come quando si desidera la glicosilazione in un sistema di espressione di cellule ospiti eucariotiche, si possono manipolare le varie pre- o pro-sequenze per migliorare la glicosilazione o la resa. Ad esempio, si può alterare il sito di clivaggio della peptidasi di un particolare peptide segnale, o aggiungere pro-sequenze, che possono anche influenzare la glicosilazione. Il prodotto proteico finale può avere, nella posizione -1 (relativamente al primo amminoacido della proteina

matura), uno o più amminoacidi aggiuntivi incidenti sull'espressione, che potrebbero non essere stati completamente rimossi. Ad esempio, il prodotto proteico finale può avere uno o due residui amminoacidici trovati nel sito di clivaggio della peptidasi, attaccati all'ammino-terminale. In alternativa, l'uso di alcuni siti di clivaggio enzimatico può risultare in una forma leggermente tronca del polipeptide desiderato, se l'enzima taglia in tale area all'interno del polipeptide maturo.

L'espressione e il clonaggio conterranno tipicamente un promotore che è riconosciuto dall'organismo ospite e collegato funzionalmente alla molecola codificante la proteina legante l'antigene. I promotori sono sequenze non trascritte situate a monte (ossia 5') del codone di avvio di un gene strutturale (generalmente entro circa 100-1000 bp) che controlla la trascrizione del gene strutturale. I promotori sono convenzionalmente raggruppati in una delle due classi: promotori inducibili e promotori costitutivi. I promotori inducibili avviano livelli aumentati di trascrizione dal DNA sotto il loro controllo in risposta a qualche cambiamento nelle condizioni di coltura, come la presenza o l'assenza di un nutriente o un cambiamento di temperatura. I promotori costitutivi, d'altra parte, trascrivono uniformemente un gene a cui sono collegati funzionalmente, vale a dire con poco o nessun controllo sull'espressione genica. Un gran numero di promotori, riconosciuti da una varietà di potenziali cellule ospiti, è ben noto. Un promotore adatto viene collegato funzionalmente al DNA codificante la catena pesante o la catena leggera comprendente una proteina legante l'antigene

rimuovendo il promotore dal DNA sorgente mediante digestione con enzimi di restrizione e inserendo la sequenza di promotore desiderata nel vettore.

Promotori adatti per l'uso con ospiti di lievito sono anche ben noti nell'arte. I potenziatori di lievito sono vantaggiosamente usati con promotori di lievito. Promotori adatti per l'uso con cellule ospiti di mammifero sono ben noti e includono, ma senza limitarsi, quelli ottenuti dai genomi di virus come polyomavirus, virus del vaiolo aviario, adenovirus (come Adenovirus 2), papillomavirus bovino, virus del sarcoma aviario, citomegalovirus, retrovirus, virus dell'epatite B, e virus delle scimmie 40 (SV40). Altri promotori di mammifero adatti includono promotori di mammifero eterologhi, ad esempio promotori di shock termico e promotore di actina.

Una sequenza di potenziatore può essere inserita nel vettore per aumentare la trascrizione di DNA codificante la catena leggera o la catena pesante comprendente una proteina legante l'antigene da parte di eucarioti superiori. I potenziatori sono elementi agenti in cis del DNA, solitamente lunghi circa 10-300 bp, che agiscono sul promotore per aumentare la trascrizione. I potenziatori sono relativamente indipendenti dall'orientamento e dalla posizione, essendo stati trovati sia in posizione 5' che 3' rispetto all'unità di trascrizione. Sono note svariate sequenze di potenziatore disponibili da geni di mammifero (ad esempio globina, elastasi, albumina, alfa-feto-proteina e insulina). Tipicamente, tuttavia, viene usato un potenziatore da un virus. Il potenziatore di SV40, il

potenziatore del promotore precoce di citomegalovirus, il potenziatore di polyoma e i potenziatori di adenovirus noti nell'arte sono elementi potenziatori esemplificativi per l'attivazione dei promotori eucariotici. Sebbene un potenziatore possa essere posizionato nel vettore 5' o 3' rispetto ad una sequenza codificante, tipicamente è posizionato in un sito 5' dal promotore. Una sequenza codificante una sequenza segnale nativa o eterologa appropriata (sequenza leader o peptide segnale) può essere incorporata in un vettore di espressione per promuovere la secrezione extracellulare dell'anticorpo. La scelta del peptide segnale o del leader dipende dal tipo di cellule ospiti in cui l'anticorpo deve essere prodotto; e una sequenza segnale eterologa può sostituire la sequenza segnale nativa. Esempi di peptidi segnale che sono funzionali in cellule ospiti di mammifero includono quanto segue: la sequenza segnale per l'interleuchina-7 (IL-7) descritta nel brevetto statunitense n. 4,965,195; la sequenza segnale per il recettore dell'interleuchina-2 descritta in Cosman et al., 1984, Nature 312:768; il peptide segnale del recettore dell'interleuchina-4 descritto nel brevetto EP n. 0367 566; il peptide segnale del recettore dell'interleuchina-1 di tipo I descritto nel brevetto statunitense n. 4,968,607; il peptide segnale del recettore dell'interleuchina-1 di tipo II descritto nel brevetto EP n. 0 460 846.

In una forma di realizzazione la sequenza leader comprende SEQ ID NO: 21 (MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC) che è codificata da SEQ ID NO: 22 (atggacatga gagtgcctgc acagctgctg ggctgctgc tgctgtggct gagaggcc agatgc). In un'altra forma di realizzazione, la sequenza

leader comprende SEQ ID NO: 23 (MAWALLLLTL LTQGTGSWA) che è codificata da SEQ ID NO: 24 (atggcctggg ctctgctgct cctcacccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggcc).

I vettori di espressione che sono forniti possono essere costruiti da un vettore di partenza, ad esempio un vettore disponibile in commercio. Tali vettori possono contenere o meno tutte le sequenze fiancheggiatrici desiderate. Qualora una o più sequenze fiancheggiatrici descritte nella presente non siano già presenti nel vettore, possono essere ottenute individualmente e legate al vettore. I metodi usati per ottenere ciascuna delle sequenze fiancheggiatrici sono ben noti a un tecnico del ramo.

Dopo che il vettore è stato costruito e una molecola di acido nucleico codificante una catena leggera, una catena pesante, o una catena leggera e una catena pesante comprendenti una sequenza legante l'antigene è stata inserita nel sito corretto del vettore, il vettore completato può essere inserito in una cellula ospite adatta per l'amplificazione e/o l'espressione del polipeptide. La trasformazione di un vettore di espressione per una proteina legante l'antigene in una cellula ospite selezionata può essere assolta mediante metodi noti, tra cui trasfezione, infezione, co-precipitazione con fosfato di calcio, elettroporazione, microiniezione, lipofezione, trasfezione mediata da DEAE-destrano, o altre tecniche note. Il metodo selezionato sarà in parte una funzione del tipo di cellula ospite da usare. Questi metodi e altri

metodi adatti sono ben noti al tecnico del ramo e sono esposti, ad esempio, in Sambrook *et al.*, 2001, sopra.

Una cellula ospite, quando coltivata in condizioni appropriate, sintetizza una proteina legante l'antigene che può essere successivamente raccolta dal terreno di coltura (se la cellula ospite la secerne nel terreno) o direttamente dalla cellula ospite che la produce (se non viene secreta). La selezione di una cellula ospite appropriata dipenderà da vari fattori, come i livelli di espressione desiderati, le modifiche polipeptidiche desiderabili o necessarie per l'attività (come glicosilazione o fosforilazione) e la facilità di ripiegamento in una molecola biologicamente attiva.

Le linee cellulari di mammifero disponibili come ospiti per l'espressione sono ben note nell'arte e includono, ma senza limitarvisi, linee cellulari immortalizzate disponibili dall'American Type Culture Collection (ATCC), incluse, ma senza limitarvisi, cellule ovariche di criceto cinese (CHO), cellule HeLa, cellule renali di criceto neonato (BHK), cellule renali di scimmia (COS), cellule di carcinoma epatocellulare umano (ad esempio Hep G2) e numerose altre linee cellulari. In un'altra forma di realizzazione, può essere selezionata una linea cellulare del lignaggio delle cellule B che non produce il proprio anticorpo ma che ha la capacità di produrre e secernere un anticorpo eterologo.

Una "frazione linker", secondo l'uso fattone nella presente, si riferisce a un gruppo organico peptidile o non peptidile biologicamente

accettabile che è legato in modo covalente a un residuo di amminoacido di un analogo di peptide di tossina o altra catena di polipeptide (ad esempio, un dominio HC o LC di immunoglobulina o uno Fc di immunoglobulina) contenuto nella composizione dell'invenzione, la quale frazione linker unisce o coniuga in modo covalente l'analogo di peptide di tossina o l'altra catena di polipeptide a un'altra catena di peptide o polipeptide nella composizione, o a una frazione estendente l'emivita. In alcune forme di realizzazione della composizione, una frazione estendente l'emivita, come descritto nella presente, è coniugata, ossia legata in modo covalente, direttamente a un residuo di amminoacido dell'analogo di peptide di tossina stesso, o, facoltativamente, a una frazione linker peptidilico o non peptidilico (inclusi, ma senza limitarsi, linker aromatici o arilici) che è legata in modo covalente a un residuo di amminoacido dell'analogo di peptide di tossina. La presenza di qualsiasi frazione linker è facoltativa. Quando presente, la sua struttura chimica non è critica, poiché serve principalmente come distanziatore per posizionare, unire, connettere, o ottimizzare la presentazione o la posizione di una frazione funzionale in relazione a una o più altre frazioni funzionali di una molecola della composizione dell'invenzione. La presenza di una frazione linker può essere utile per ottimizzare l'attività farmacologica di alcune forme di realizzazione della composizione dell'invenzione. Il linker, se presente, può essere costituito da amminoacidi collegati tra loro mediante legami peptidici. La frazione linker, se presente, può essere indipendentemente uguale a, o differente

da, qualsiasi altro linker, o più linker, che può essere presente nella composizione dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il linker può essere un linker multivalente che facilita l'esposizione multivalente di analoghi di peptide di tossina della presente invenzione; l'esposizione multivalente di tali composti biologicamente attivi può aumentare l'affinità di legame e/o la potenza attraverso l'avidità. Le proprietà in vivo di un agente terapeutico possono essere modificate (ossia, bersagliamento specifico, estensione dell'emivita, profilo di distribuzione, eccetera) attraverso la coniugazione a un polimero o a una proteina.

Linker peptidilici. Come dichiarato in precedenza, la frazione linker, se presente (che sia all'interno della sequenza di amminoacidi primaria dell'analogo di peptide di tossina o come linker per l'attacco di una frazione estendente l'emivita all'analogo di peptide di tossina), può essere "peptidilica" per natura (ossia costituita da amminoacidi collegati tra loro mediante legami peptidici) e costituita con una lunghezza, preferibilmente, da 1 fino a circa 40 residui di amminoacidi, più preferibilmente da 1 fino a circa 20 residui di amminoacidi, e, in modo massimamente preferito, da 1 fino a circa 10 residui di amminoacidi. Preferibilmente, ma non necessariamente, i residui di amminoacidi nel linker sono tra i venti amminoacidi canonici, più preferibilmente cisteina, glicina, alanina, prolina, asparagina, glutammina, e/o serina. Ancora più preferibilmente, un linker peptidilico è costituito dalla maggior parte di amminoacidi stericamente non ostacolati, come glicina, serina e alanina collegati mediante un legame peptidico. È anche desiderabile che, se

presente, venga selezionato un linker peptidico che eviti un rapido turnover proteolitico nella circolazione. *in vivo*. Alcuni di questi amminoacidi possono essere glicosilati, come è ben noto nell'arte. Ad esempio, una sequenza linker utile che costituisce un sito di sialilazione è  $X_1X_2NX_4X_5G$  (SEQ ID NO: 25), in cui  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$  e  $X_5$  sono, ciascuno indipendentemente, un qualsiasi residuo di amminoacido.

In altre forme di realizzazione, gli amminoacidi da 1 a 40 della frazione linker peptidilico sono selezionati tra glicina, alanina, prolina, asparagina, glutammina e lisina. Preferibilmente, un linker è costituito per la maggior parte da amminoacidi stericamente non ostacolati, come glicina e alanina. Perciò, linker preferiti includono poliglicine, poliserine, e polialanine, o combinazioni di qualsiasi di questi. Alcuni esempi di linker peptidilici sono poli(Gly)<sub>1-8</sub>, particolarmente (Gly)<sub>3</sub>, (Gly)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:26), (Gly)<sub>5</sub> (SEQ ID NO:27) e (Gly)<sub>7</sub> (SEQ ID NO:28), nonché GlySer e poli(Gly)<sub>4</sub>Ser, come "L15" (GGGGSGGGGSGGGGS; SEQ ID NO:29), poli(Gly-Ala)<sub>2-4</sub> e poli(Ala)<sub>1-8</sub>. Altri esempi specifici di linker peptidilici includono (Gly)<sub>5</sub>Lys (SEQ ID NO:30), e (Gly)<sub>5</sub>LysArg (SEQ ID NO:31). Altri esempi di linker peptidilico utili sono: Altri esempi di linker peptidilico utili sono:

(Gly)<sub>3</sub>Lys(Gly)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:32);

(Gly)<sub>3</sub>AsnGlySer(Gly)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:33);

(Gly)<sub>3</sub>Cys(Gly)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:34); e

GlyProAsnGlyGly (SEQ ID NO:35).

Per spiegare la nomenclatura di cui sopra, ad esempio, (Gly)<sub>3</sub>Lys(Gly)<sub>4</sub> significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:36). Sono utili anche altre combinazioni di Gly e Ala.

Altri linker preferiti sono quelli identificati nella presente come "L5" (GGGGS; o "G<sub>4</sub>S"; SEQ ID NO:37), "L10" (GGGGSGGGGS; SEQ ID NO:38); "L20" (GGGGSGGGSGGGSGGGGS; SEQ ID NO:39); "L25" (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS; SEQ ID NO:40) e qualsiasi linker usato negli esempi di lavoro di seguito.

In alcune forme di realizzazione delle composizioni di questa invenzione, che comprendono una frazione linker peptidico, i residui acidi, ad esempio residui di glutammato o aspartato, sono posti nella sequenza di amminoacidi della frazione linker. Esempi includono le seguenti sequenze di linker peptidico:

GGEGGG (SEQ ID NO:41);

GGEEEGGG (SEQ ID NO:42);

GEEEG (SEQ ID NO:43);

GEEE (SEQ ID NO:44);

GGDGGG (SEQ ID NO:45);

GGDDDGG (SEQ ID NO:46);

GDDDG (SEQ ID NO:47);

GDDD (SEQ ID NO:48);

GGGGSDDSDGSDGEDGGGGS (SEQ ID NO:49);

WEWEW (SEQ ID NO:50);

FEFEF (SEQ ID NO:51);

B

EEEWWW (SEQ ID NO:52);  
EEEEFF (SEQ ID NO:53);  
WEEEEWW (SEQ ID NO:54); o  
FFEEFF (SEQ ID NO:55).

In altre forme di realizzazione, il linker costituisce un sito di fosforilazione, ad esempio  $X_1X_2YX_4X_5G$  (SEQ ID NO:56), in cui  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ , e  $X_5$  sono, ciascuno indipendentemente, qualsiasi residuo di amminoacido;  $X_1X_2SX_4X_5G$  (SEQ ID NO:57), in cui  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$  e  $X_5$  sono, ciascuno indipendentemente, qualsiasi residuo di amminoacido; o  $X_1X_2TX_4X_5G$  (SEQ ID NO:58), in cui  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$  e  $X_5$  sono, ciascuno indipendentemente, qualsiasi residuo di amminoacido.

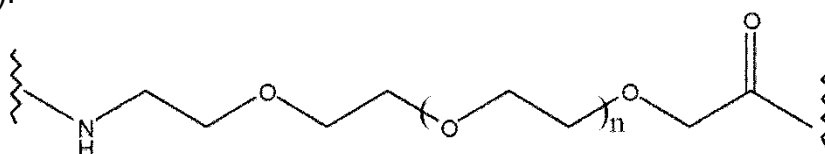
I linker qui mostrati sono esemplificativi; linker peptidilici rientranti nella portata di questa invenzione possono essere molto più lunghi e possono includere altri residui. Un linker peptidilico può contenere, ad esempio, una cisteina, un altro tiolo o nucleofilo per la coniugazione con una frazione estendente l'emivita. In un'altra forma di realizzazione, il linker contiene un residuo di cisteina o omocisteina, o un'altra frazione 2-ammino-etantiolo o 3-ammino-propantiolo per la coniugazione a una frazione estendente l'emivita funzionalizzata con maleimide, iodoacetammide o tioestere.

Un altro linker peptidilico utile è un linker grande flessibile comprendente una sequenza Gly/Ser/Thr casuale, ad esempio: GSGSATGGSGSTASSGSGSATH (SEQ ID NO:59) o HGSGSATGGSGSTASSGSGSAT (SEQ ID NO:60) che si stima abbia

B

all'incirca le dimensioni di una molecola di PEG da 1 kDa. In alternativa, un linker peptidilico utile può essere costituito da sequenze di amminoacidi note nell'arte in quanto formano strutture elicoidali rigide (ad esempio, linker rigido: -AEAAAKEAAAKEAAAKAGG-// SEQ ID NO:61). In aggiunta, un linker peptidilico può anche comprendere un segmento non peptidilico come una molecola alifatica a 6 atomi di carbonio della formula  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ . I linker peptidilici possono essere alterati per formare derivati come descritto nella presente.

Linker non peptidilici. Facoltativamente, una frazione linker non peptidilico è utile anche per coniugare la frazione estendente l'emivita alla porzione peptidica dell'analogo di peptide di tossina coniugata alla frazione estendente l'emivita. Ad esempio, possono essere usati linker alchile come  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$ , in cui  $s = 2-20$ . Questi linker alchile possono ulteriormente essere sostituiti da qualsiasi gruppo non stericamente ostacolato come alchile inferiore (ad esempio,  $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) acile inferiore, alogeno (ad esempio, Cl, Br), CN,  $\text{NH}_2$ , fenile, eccetera. Linker non peptidilici esemplificativi sono linker PEG (ad esempio, mostrati di seguito):



dove  $n$  è tale che il linker ha un peso molecolare da circa 100 a circa 5000 Dalton (Da), preferibilmente da circa 100 a circa 500 Da.

In una forma di realizzazione, il linker non peptidilico è arile. I linker possono essere alterati per formare derivati alla stessa maniera

descritta nella presente. "Arile" è fenile o fenile fuso in prossimità con un ponte carbonio a 3, 4 o 5 elementi saturo, parzialmente saturo o insaturo, il fenile o il ponte essendo sostituito da 0, 1, 2 o 3 sostituenti selezionati tra C<sub>1-8</sub> alchile, C<sub>1-4</sub> aloalchile o alo. "Eteroarile" è un anello monociclico a 5, 6 o 7 elementi insaturo o biciclico a 6, 7, 8, 9, 10 o 11 elementi parzialmente saturo o insaturo, in cui almeno un anello è insaturo, gli anelli monociclici e biciclici contengono 1, 2, 3 o 4 atomi selezionati tra N, O e S, in cui l'anello è sostituito da 0, 1, 2 o 3 sostituenti selezionati tra C<sub>1-8</sub> alchile, C<sub>1-4</sub> aloalchile e alo.

Le porzioni non peptidiche della composizione di sostanze dell'invenzione, quali linker non peptidilici o le frazioni estendenti l'emivita non peptidiche, possono essere sintetizzate mediante reazioni di chimica organica convenzionali.

Altre forme di realizzazione del linker multivalente comprendono un nucleo polieterociclico rigido di lunghezza controllata. I linker sono differenziati chimicamente su entrambe su una o l'altra estremità per adattarsi alle chimiche di accoppiamento ortogonale (ad esempio "click" di azoturo, accoppiamento amidico, formazione di tioetere mediante alchilazione con maleimide o aloacetammide, formazione di ossima, amminazione riduttiva, eccetera).

Quanto sopra è meramente illustrativo e non un trattamento esaustivo dei tipi di linker che possono essere facoltativamente impiegati in conformità alla presente invenzione.

### **Esempio 1**

### **Generazione di coniugati di peptidi anti-GIPR/GLP-1**

L'anticorpo anti-GIPR 2G10\_LC1.003 è stato ingegnerizzato per avere una mutazione E70C in SEQ ID NO: 151 (catena leggera) o per avere una mutazione E275C in SEQ ID NO: 152 (catena pesante). Un Cys-mAb anti-GIPR con cappuccio di bis-cisteamina (3-12 mg/ml di IgG1 in acetato di sodio 20 mM, pH 5,0) è stato parzialmente ridotto usando 2-4 equivalenti di trifenilfosfina-3,3',3''-trisolfonato a temperatura ambiente. Per monitorare l'andamento della reazione (tipicamente completata in 1-2 ore) è stata usata la cromatografia a scambio cationico (CEX). La cisteamina liberata è stata eliminata dalla IgG1 parzialmente sovra-ridotta mediante scambio di tampone in acetato di sodio 20 mM, pH 5,0. Il Cys-mAb risultante, parzialmente sovra-ridotto e privo di cisteamina (3-12 mg/ml), è stato ri-ossidato mediante l'aggiunta di 4-7 equiv. di acido deidroascorbico 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> acq. 0,5 M a pH 7,0-7,5, cui ha fatto seguito incubazione a 2-8 °C. Il progresso della ri-ossidazione è stato monitorato mediante HPLC a fase inversa. Non appena la IgG1 si è completamente riformata (tipicamente 1-3 ore), sono stato aggiunti 2-3 equivalenti di peptide bromoacetil-GLP-1 (SEQ ID NO: 129) con linker C-terminale (SEQ ID NO: 29) e la miscela di reazione è stata ulteriormente incubata a 2-8 °C. Il progresso della reazione di alchilazione è stato monitorato tramite LC/MS e/o CEX fino ad ottenere il profilo del rapporto peptide-anticorpo (PAR) bersaglio (ad esempio ≥95% PART, <5% PAR0+PAR1). La miscela di reazione è stata sottoposta a quenching regolando il pH a 5,0 usando acido acetico. Il coniugato anti-GIPR/GLP-

1 PART desiderato è stato purificato usando la cromatografia a interazione idrofobica (HIC), cui hanno fatto seguito UF/DF e formulazione in acetato di sodio al 10%, saccarosio al 9%, pH 5,2.

Tabella 6. SEQ ID NO. amminoacidi.

Identificatore	Costrutto	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:361172	2G10_LC1 .003	147	148	151	152	156	157	158	162	163	164

Tabella 7. SEQ ID NO. acido nucleico.

Identificatore	Costrutto	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:361172	2G10_LC1 .003	145	146	149	150	153	154	155	159	160	161

Tabella 8. Regioni leggere variabili e pesanti variabili: sequenze di acido nucleico (“NA”) e amminoacidi (“AA”).

iPS n.	Ab	Tipo	VL	VH
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCC AGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG CAACTTAGCCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCAGCCACCAG GGCCACTGGTATCCCAGCCAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCACCATCAGCAG CCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTCAGCAGTATAATA ACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGGAGATCAAAC GA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCATCTGGATTACCTTCAGTAAC TATGGCATGCACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGCGAGGGGCTGGAGT GGGTGGCAGCTATATGGTTTGAT GCAAGTGATAAAATACTATGCAGA CGCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAACTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGAGATCAG GCGATTTTGGAGTGGTCCCCGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTGG TCACCGTCTCTCA
			SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 146
		AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GAATRATGIPARFSGSGTEFTLI SSLQSEDFAVVYQCQYNNWPLTFG GGTKVEIKR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMHWVRQAPGEGLEW VAAIWFDASDKYYADAVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDQAIFGVVPDYWGQGLVT VSS
			SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 148

Tabella 9A. Sequenze di acido nucleico (“NA”) e amminoacidi (“AA”) di CDRL1, CDRL2 e CDRL3.

iPS n.	Ab	Tipo	CDRL1	CDRL2	CDRL3
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	AGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTA GCC	GGTGCAGCCACCA GGGCCACT	CAGCAGTATAATAAC TGGCCTCTCACT
			SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155
		AA	RASQSVSSNLA	GAATRAT	QQYNNWPLT
			SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 158

B

Tabella 9B. Sequenze di acido nucleico e amminoacidi di CDRH1, CDRH2 e CDRH3.

iPS n.	Ab	Tipo	CDRH1	CDRH2	CDRH3
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	AACTATGGCATGCAC	GCTATATGGTTTG ATGCAAGTGATAA ATACTATGCAGAC GCCGTGAAGGGC	GATCAGGCGATTTT GGAGTGGTCCCGAC TAC
			SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161
		AA	NYGMH	AIWFDASDKYYAD AVKG	DQAIFGVVPDY
			SEQ ID NO: 162	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 164

Tabella 10. Sequenze di acido nucleico ("NA") e amminoacidi ("AA") di catena leggera e pesante.

iPS n.	Ab	Tipo	LC	HC
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG
			CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC	GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
			AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC	GTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGC
			TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA	ATCTGGATTACACCTTCAGTAACTA
			GCAGCAACTTAGCCTGGTACCA	TGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
			GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC	TCCAGGCGAGGGCTGGAGTGGG
			AGGCTCCTCATCTATGGTGAG	TGGCAGCTATATGGTTTGATGCAA
			CCACCAGGGCCACTGGTATCCC	GTGATAAATACTATGCAGACGCCG
			AGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGG	TGAAGGGCCGATTACCATCTCCA

B

TCTGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGA AGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTATAATAACTGGCCTCT CACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGAACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGT	GAGACAACTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC TGTGCGAGAGATCAGGCGATTTT GGAGTGGTCCCCGACTACTGGGGC CAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCC TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC CAGCGCGTGCACACCTTCCCAGC TGTCTACAGTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTT GTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GTGTGAGGAGCAGTACGGCAGCA CGTACCGTTGTGTCAGCGTCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCCTGCCCCATC
--	--

B

			CCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGATAA
		SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150
	AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGAATRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNN WPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FINRGEC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMHWVRQAPGEGLEW VAAIWFDAADSKYYADAVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDQAIFGVVDPYWGQGLTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
		SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 152

Un "agonista del recettore di GLP-1" o "peptide di GLP-1" si riferisce a composti che hanno attività di recettore di GLP-1. Tali composti esemplificativi includono exendine, analoghi di exendina, agonisti di exendina, GLP-1(7-37), analoghi di GLP-1(7-37), agonisti di GLP-1(7-37), e simili. I composti agonisti del recettore di GLP-1 possono essere

B

facoltativamente ammidati. I termini "agonista del recettore di GLP-1" e "composto agonista del recettore di GLP-1" hanno lo stesso significato.

Tabella 1. Esempi di sequenze di agonisti del recettore di GLP-1

SE Q ID NO:	Sequenza
62	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
63	HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
64	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
65	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNGGPSSGAPPPS
66	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKNGGPSSGAPPPS
67	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG
68	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGG
69	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNGG
70	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKNGG
71	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN
72	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKN
73	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN
74	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKN
75	HGEGTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEFLKQGGPSSGAPPPS
76	HGEGTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEWLKQGGPSSGAPPPS

B

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
77	HGEGTFTSDLSKQ(octylG)EEEEAVRLFIEWLKQGGPSSGAPPPS
78	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSS(octylG)APPPS
79	HGEFTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS
80	HGEFTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEWLKQGGPSSGAPPPS
81	HGEGTFTSDLVKILEAEAVRKFIEFLKNGGPSSGAPPPS
82	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
83	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG
84	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR
85	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAFLVR(Aib)R
86	HXaa <sub>8</sub> EGTFTSDVSSYLEXaa <sub>22</sub> Xaa <sub>23</sub> AAKEFI
	Xaa <sub>30</sub> WLXaa <sub>33</sub> Xaa <sub>34</sub> GXaa <sub>36</sub> Xaa <sub>37</sub>
	in cui Xaa <sub>8</sub> è A, V o G
	Xaa <sub>22</sub> è G, K, o E
	Xaa <sub>23</sub> è Q o K
	Xaa <sub>30</sub> è A o E
	Xaa <sub>33</sub> è V o K
	Xaa <sub>34</sub> è K, N, o R
	Xaa <sub>36</sub> è R o G

B

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
	e Xaa <sub>37</sub> è G, H, P, o assente
87	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG
88	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRG
89	HAEGTFTSDVSSYLEKQAAKEFIAWLKGRG
90	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGG
91	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGG
92	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGG
93	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGG
94	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGP
95	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGP
96	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGP
97	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGP
98	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGG
99	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGG
100	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVNGG
101	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVNGG
102	HXaa <sub>8</sub> EGTFTSDVS
	SYLEXaa <sub>22</sub> QAAKEFIAWLXaa <sub>33</sub> KGGPSSGAPPPC <sub>45</sub> C <sub>46</sub> -Z, in cui

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
	Xaa <sub>8</sub> è: D-Ala, G, V, L, I, S o T
	Xaa <sub>22</sub> è G, E, D o K
	Xaa <sub>33</sub> è: V o I
	e Z è OH o NH <sub>2</sub> , e, facoltativamente, in cui (i) una frazione polietilenglicole è attaccata in modo covalente a C <sub>45</sub> , (ii) una frazione polietilenglicole è attaccata in modo covalente a C <sub>46</sub> , o (iii) una frazione polietilenglicole è attaccata a C <sub>45</sub> e una frazione polietilenglicole è attaccata a C <sub>46</sub> .
103	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLIKGGPSSGAPPPC <sub>45</sub> C <sub>46</sub> -NH <sub>2</sub> e, facoltativamente, in cui (i) una frazione polietilenglicole è attaccata in modo covalente a C <sub>4</sub> , (ii) una frazione polietilenglicole è attaccata in modo covalente a C <sub>46</sub> , o (iii) una frazione polietilenglicole è attaccata a C <sub>45</sub> e una frazione polietilenglicole è attaccata a C <sub>46</sub> .
104	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
105	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPKSGAPPPS
106	GEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
107	HGEGTFTSDLSRQNorLeEEEAVRLFIEWLRNGGPKSGAPPPS
108	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

B

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
109	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
110	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
111	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
112	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
113	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
114	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
115	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
116	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
117	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
118	AEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVKGRG
119	AEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVKGRG
120	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGRGK
121	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGRGK
122	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKNGG[Aeea] [Aeea]K{CONH2}
123	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKGGG
124	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEGEEAKKFIWLKGGG

B

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
125	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGK{CONH2}
126	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]EAVRLFIEWLKNGGPSSGAP PPS
127	{H2}HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
128	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
129	{H2}H[Aib]EGTFTSDYSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
130	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEEAVRLFIEWLKNGGG
131	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEEAALFIEWLKNGGG
132	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEEAALFIEWLVKGGG
133	{H2}H[Aib]IGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
134	{H2}H[Aib]EGTFTSEVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
135	{H2}H[Aib]AGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
136	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFAAWLVKGG
137	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGG
138	{H2}H[Aib]TGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGGG
139	{H2}H[Aib]EGTFTSEVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGGG
140	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGGG

SE	Sequenza
Q ID	
NO:	
141	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPP S
142	{H2}H[Aib]EGTFTSDYSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKGGG
143	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKGGG{CONH 2}
144	{Dmia}SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNT
165	{H2}HGEFTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
<p>AEEA si riferisce ad acido [2-(2-ammino)etossi]acetico</p> <p>EDA si riferisce ad etilendiammina.</p> <p>MPA si riferisce ad acido maleimidopropionico.</p>	

### **Risultati e discussione**

Il successo della coniugazione sito-specifica con la proteina Cys-mAb (IgG1) dipende in modo critico dalla capacità di ridurre selettivamente ("rimuovere il cappuccio") i residui di cisteina che sono stati ingegnerizzati nell'impalcatura di IgG1 con ponte disolfuro. Questo processo impegnativo nella pratica mira a ridurre solo i legami disolfuro delle

**due** cisteine ingegnerizzate in presenza di **almeno sedici** legami disolfuro nativi che tengono insieme il tetramero di IgG1. Un singolo

passaggio di **Riduzione selettiva** sarebbe altamente desiderabile, ma al momento non è fattibile (Figura 1). È stata sviluppata invece una **Riduzione non selettiva** in due passaggi (Figura 2):

*Passaggio di riduzione:* un Cys-mAb viene lasciato reagire con un agente riducente (tipicamente una fosfina) per ottenere una riduzione completa ("rimozione del cappuccio") dei residui di cisteina ingegnerizzati. Anche alcuni legami disolfuro nativi vengono ridotti. Il grado di questa reazione collaterale indesiderata dipende in larga misura dai parametri di reazione, tra cui le modifiche post-traduzionali (ad esempio l'identità dei "cappucci") e le condizioni di reazione (ad esempio la temperatura, il tipo e la quantità di agente riducente, il tampone di reazione). Il risultato è un Cys-mAb "con cappuccio rimosso" e sovra-ridotto.

*Passaggio di ossidazione:* i "cappucci" di tiolo liberati nel Passaggio di riduzione devono essere eliminati prima di procedere, per evitare un "nuovo incappucciamento" indesiderato del Cys-mAb. I legami disolfuro nativi vengono poi ripristinati in presenza di un ossidante (tipicamente acido deidroascorbico).

Questo protocollo in due passaggi genera una proteina Cys-mAb "con cappuccio rimosso" pronta per la coniugazione sito-specifica tramite reazione di S-alchilazione (Figura 3).

Al fine di conseguire un coniugato Cys-mAb praticamente omogeneo (PART; rapporto peptide-anticorpo pari a 2) è fondamentale mantenere la sovra-riduzione al minimo, poiché il ripristino dei legami

disolfuro nativi tramite ossidazione non è perfetto. D'altro canto, la sotto-riduzione è altrettanto indesiderabile poiché porta a impurezze sotto-alchilate (PAR1, PAR0). Il profilo di riduzione ottimale, che consiste nella completa rimozione del cappuccio con una sovra-riduzione minima, richiede la combinazione corretta di diversi parametri.

Il "cappuccio" di cisteina con carica positiva (ad esempio cisteamina, CA) deve essere abbinato a un agente riducente con carica negativa. Si è scoperto che trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato (TPPTS) è particolarmente efficace. Altre fosfine anioniche, ad esempio TCEP, TPPDS, erano funzionali, ma le loro prestazioni erano inferiori a quelle di TPPTS (Figura). Coppie non abbinate, ad esempio mercaptoetansolfonato (MES, "cappuccio" con carica negativa) e tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP, agente riducente con carica negativa) hanno portato a reazioni lente, non selettive e/o incomplete (Figura 4).

I tamponi di reazione devono avere una bassa forza ionica (ad esempio acetato di sodio 20 mM) per massimizzare le interazioni coulombiane attrattive tra partner di reazione con carica opposta (ad esempio IgG1 con carica positiva e cappuccio di cisteamina e TPPTS con carica negativa). L'aumento della forza ionica del mezzo di reazione rende la riduzione lenta e non selettiva (Figura).

Il pH della reazione deve essere sufficientemente basso (ad esempio pH 5) per impedire ai tioli liberati ("cappucci") di subire reazioni secondarie collaterali, ad esempio lo scambio di disolfuro con i disolfuri nativi di una IgG1.

B

La corretta combinazione delle variabili di cui sopra consente la completa rimozione del cappuccio usando solo un piccolo eccesso dell'agente riducente (ad esempio 1,5 equiv. in eccesso, 3,5 equiv. per Cys-mAb totale), portando di conseguenza a una sovra-riduzione minima. Tale grado minimo di sovra-riduzione viene facilmente corretto nel successivo passaggio di ossidazione usando acido deidroascorbico (DHAA, ad esempio 4-6 equiv.) come ossidante leggero. Il risultante Cys-mAb "con cappuccio rimosso" praticamente omogeneo può essere alchilato senza difficoltà usando solo un piccolo eccesso (ad esempio 0,2 equiv. in eccesso, 2,2 equiv. per Cys-mAb totale) di bromoacetammidi (ad esempio derivati di bromoacetammide di peptidi sintetici) a procurare  $\geq 95\%$  di coniugato PAR2 (Figura).

B

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpi, il metodo comprendendo i passaggi di:

a) ottenere una composizione comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo;

b) esporre l'anticorpo o il frammento di anticorpo a un agente bloccante la cisteina, in cui l'agente bloccante la cisteina è cisteamina e l'agente bloccante la cisteina forma un disolfuro misto stabile con almeno un residuo di cisteina dell'anticorpo o del frammento di anticorpo;

c) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS");

d) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e

e) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il disolfuro misto è un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c), viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il rapporto tra agente riducente e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-4:1 (moli/moli).

5. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui, dopo il passaggio c) e prima del passaggio d), viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente.

6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione.

7. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'agente ossidante è acido deidroascorbico ("DHAA").

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui il rapporto tra agente ossidante e anticorpo o frammento di anticorpo è 3-6:1 (moli/moli).

9. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la frazione chimica attivata è un peptide comprendente un alogeno, in cui l'alogeno è selezionato dal gruppo consistente in Br, I e Cl.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui il rapporto tra frazione chimica attivata e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-3:1 (moli/moli).

11. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui, dopo il passaggio e), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata.

12. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

13. Metodo per preparare un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpi, il metodo comprendendo i passaggi di:

a) ottenere una composizione comprendente un disolfuro misto comprendente un anticorpo o un frammento di anticorpo con una cisteina libera incappucciata che comprende un cappuccio di cisteamina;

b) aggiungere un agente riducente alla composizione per formare una miscela di riduzione e lasciare che si verifichi una reazione di riduzione in modo che la miscela di riduzione comprenda un anticorpo ridotto o un frammento di anticorpo ridotto, in cui l'agente riducente è trifenilfosfina-3,3',3"-trisolfonato ("TPPTS");

c) aggiungere un agente ossidante alla miscela di riduzione per formare una miscela ossidata e lasciare che si verifichi una reazione di ossidazione in modo che la miscela di ossidazione comprenda un anticorpo ossidato o un frammento di anticorpo ossidato; e

d) aggiungere una frazione chimica attivata alla miscela ossidata per formare una miscela di coniugazione e lasciare che si verifichi una

reazione di coniugazione in modo che venga formato un coniugato di anticorpo o un coniugato di frammento di anticorpo.

14. Metodo secondo la rivendicazione 13, in cui, dopo il passaggio a) e prima del passaggio b), viene eseguita una cromatografia a scambio cationico per rimuovere l'eccesso di agente bloccante la cisteina.

15. Metodo secondo la rivendicazione 13, in cui il rapporto tra agente riducente e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-4:1 (moli/moli).

16. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-15, in cui, dopo il passaggio b) e prima del passaggio c), viene eseguito un passaggio di scambio di tampone per rimuovere l'agente riducente.

17. Metodo secondo la rivendicazione 16, in cui il passaggio di scambio di tampone è ultrafiltrazione/diafiltrazione.

18. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-17, in cui l'agente ossidante è acido deidroascorbico ("DHAA").

19. Metodo secondo la rivendicazione 18, in cui il rapporto tra agente ossidante e anticorpo o frammento di anticorpo è 3-6:1 (moli/moli).

20. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-19, in cui la frazione chimica attivata è un peptide comprendente un alogeno, in cui l'alogeno è selezionato dal gruppo consistente in Br, I e Cl.

21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui il rapporto tra frazione chimica attivata e anticorpo o frammento di anticorpo è 2-3:1 (moli/moli).

22. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-21, in cui, dopo il passaggio d), viene eseguito un passaggio di purificazione per rimuovere la frazione chimica attivata.

23. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui il passaggio di purificazione include cromatografia a interazione idrofobica ("HIC"), ultrafiltrazione/diafiltrazione o cromatografia a interazione idrofobica ("HIC") seguita da ultrafiltrazione/diafiltrazione.

24. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'anticorpo o il frammento di anticorpo comprende un residuo di cisteina in una posizione selezionata dal gruppo consistente in D70 della catena leggera di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 7; E276 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8; e T363 della catena pesante di anticorpo rispetto alla sequenza di riferimento SEQ ID NO: 8.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

## LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

### TAVOLA 1/6

Figura 1

"Selective Reduction" = Riduzione selettiva

"Cys mAb" = Cys-mAb

""Un-capped" Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio rimosso

### TAVOLA 2/6

Figura 2

"Reduction" = Riduzione

"Oxidation" = Ossidazione

"Cys mAb" = Cys-mAb

""Un-capped" Over-reduced Cys mAb" = Cys-mAb sovra-ridotto con cappuccio rimosso

""Un-capped" Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio rimosso

### TAVOLA 3/6

Figura 3

"Alkylation" = Alchilazione

""Un-capped" Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio rimosso

"mAb-peptide conjugate" = Coniugato mAb-peptide

### TAVOLA 4/6

Figura 4

"acetate" = acetato

"Cap-S" = Cappuccio-S

### TAVOLA 5/6

Figura 5

"Un-capped" Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio rimosso

"Time [minutes]" = Tempo [minuti]

**TAVOLA 6/6**

Figura 6

"cysteamine" = cisteamina

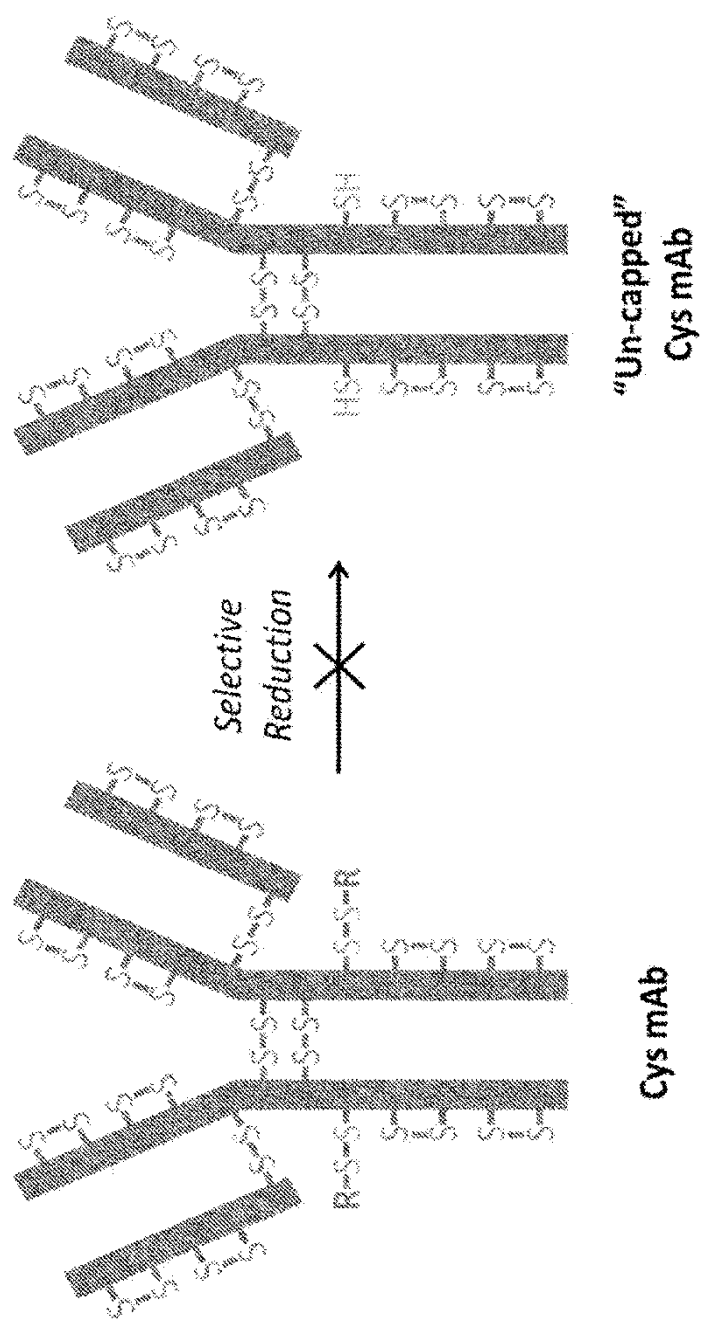
"Cysteamine-capped Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio di cisteamina

"Un-capped" Cys mAb" = Cys-mAb con cappuccio rimosso

"mAb-peptide conjugate" = Coniugato mAb-peptide

B

FIG. 1



B

FIG. 2

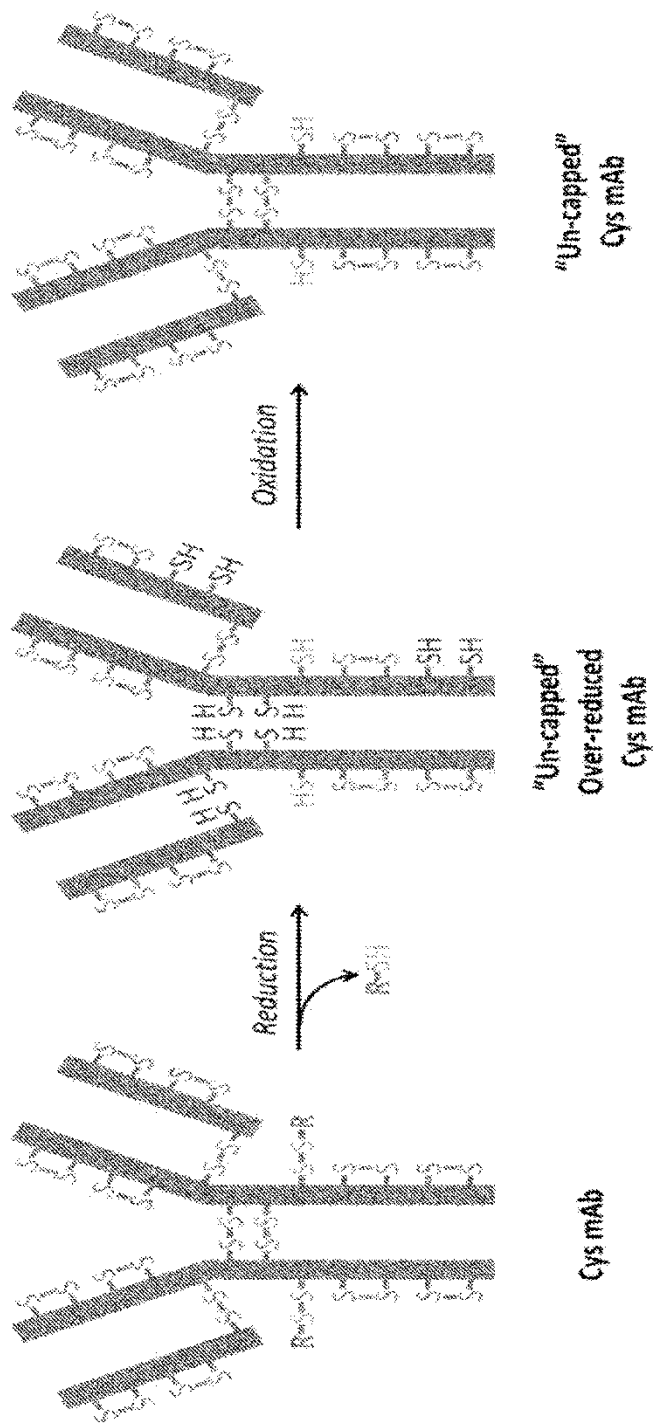
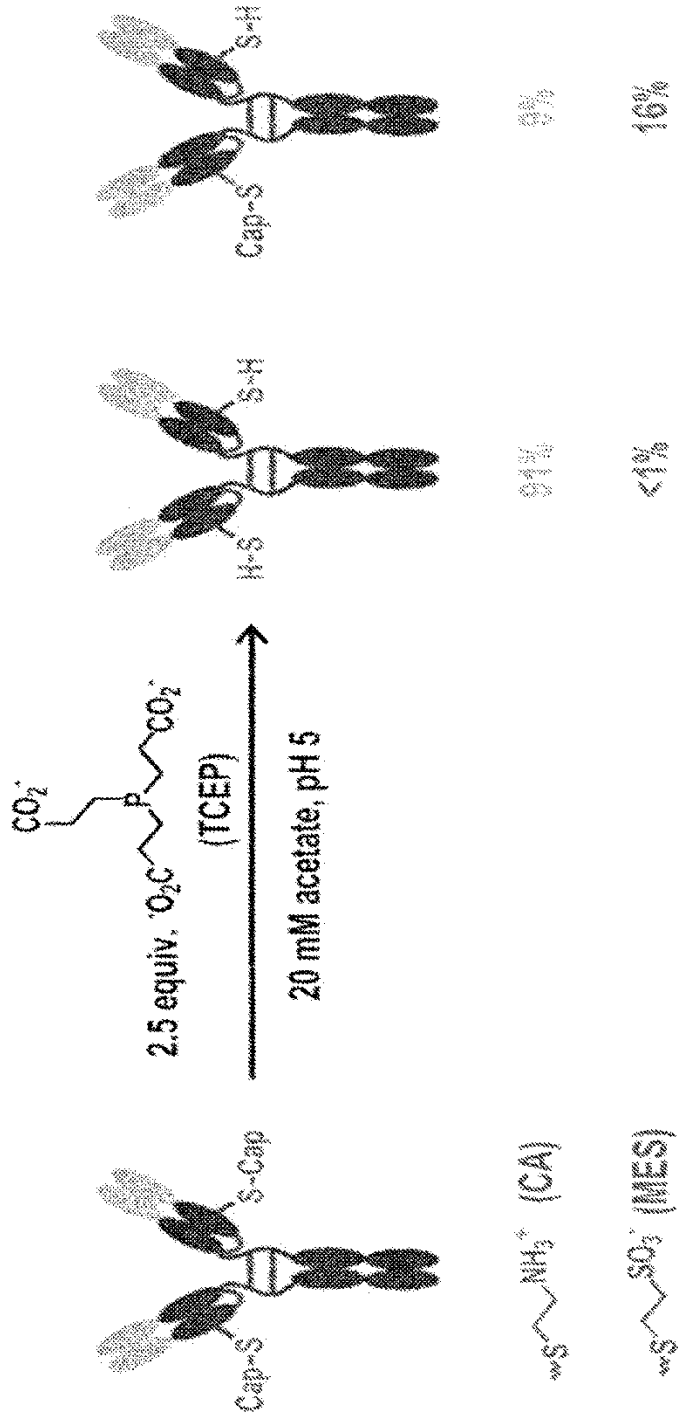


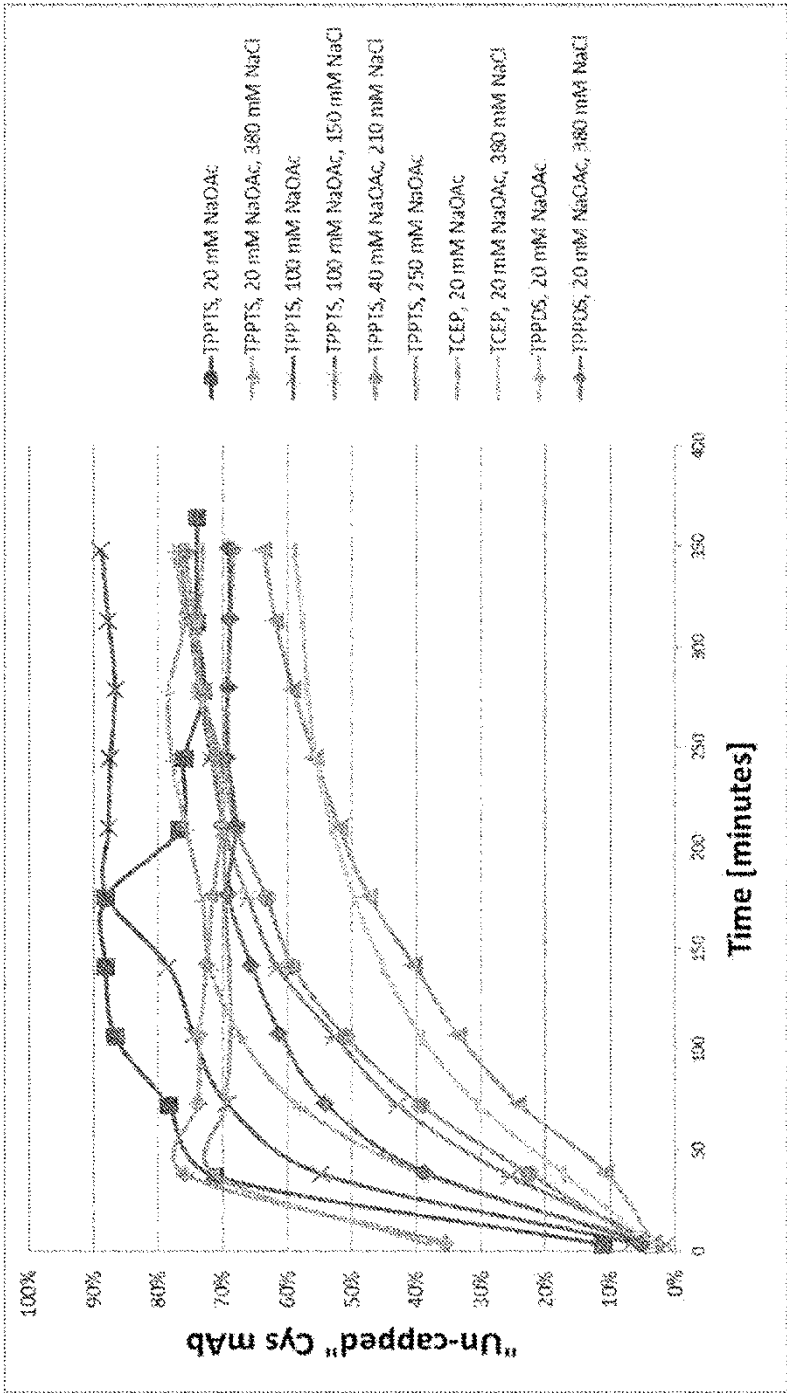


FIG. 4



B

FIG. 5



B

FIG. 6

