

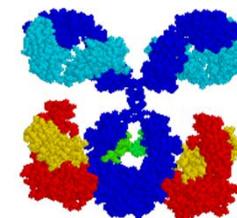
# BIOCAD

Biopharmaceutical Company

## Современные подходы к разработке оригинальных препаратов МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Карабельский Александр  
Владимирович  
к.б.н., зав. лаб. молекулярной генетики  
ЗАО “Биокад”

06.06.2013



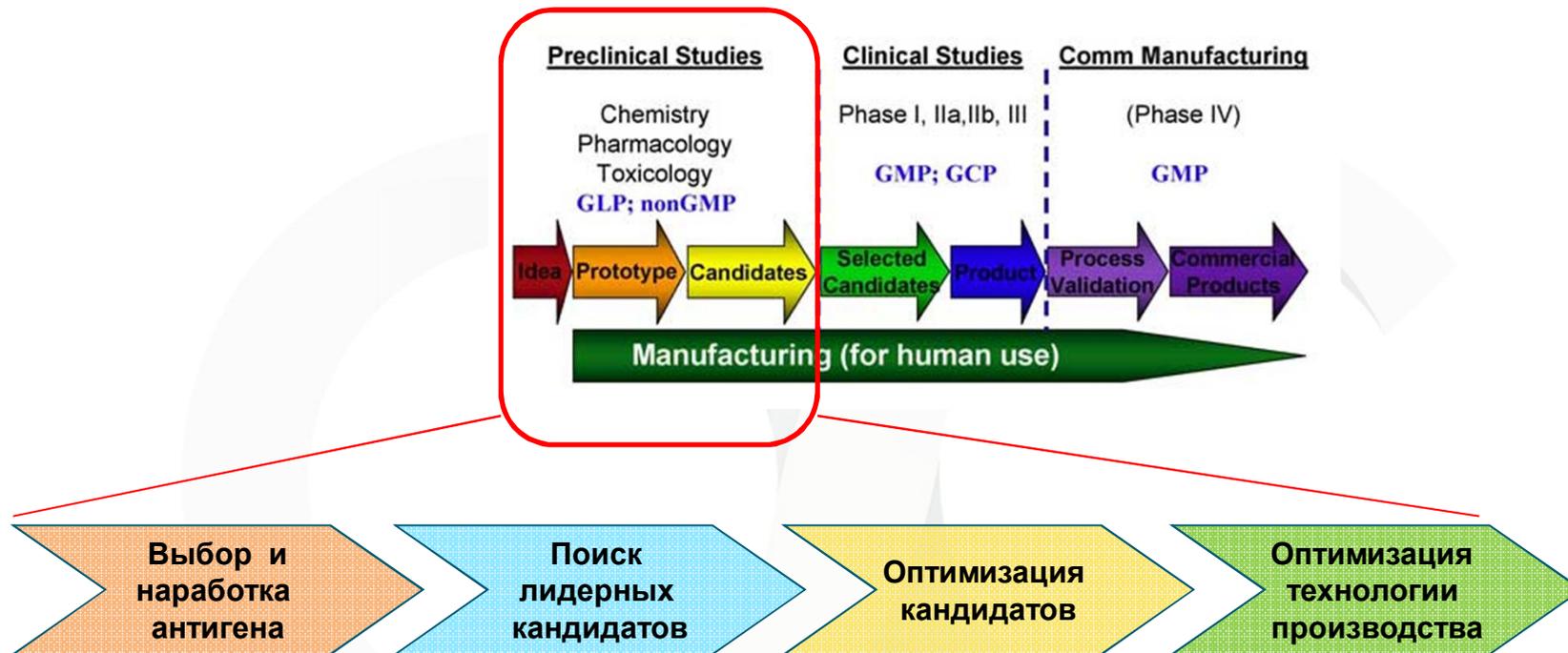
- Мишени для получения моноклональных антител
- Типы АТ и их свойства
- Способы отбора моноклональных антител. Скрининг библиотек генов
- Биспецифические антитела
- Стабильность и агрегация антител
- Оптимизация и функциональная характеристика антител
- Антитела следующего поколения – MABNEXT

- Моноклональные антитела (мАТ)
- Рекombинантные терапевтические белки (цитокины, факторы свертывания)
- Конъюгаты мАТ (ADC) (мАТ +радионуклид)
- Домены или белковые скаффолды (домены иммуноглобулинов – *nanobodies*)

### Область применения

- Заболевания иммунной системы (аутоиммунные, контроль процессов воспаления)
- Онкологические заболевания
- Нарушения метаболизма
- Нейродегенеративные состояния
- Регуляция процессов регенерации
- Нарушения гемостаза
- Генетические нарушения

# ЭТАПЫ РАЗРАБОТКИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ



## ■ ПЕРВЫЕ МИШЕНИ

“Low-hanging fruits”



## ■ НОВЫЕ МИШЕНИ

- малоизученные “неочевидные” белки. Нет строгой корреляции ген/белок/заболевание
- хорошо изученные, но “сложные для разработчика” белки (*интегральные серпентиновые рецепторы*)

## Способы поиска новых мишеней

### Комплексный анализ сигнальных путей и их взаимодействий

- геном+протеом+экзом+транскриптом+интерактом...+ “симптом”
- использование фенотипических клеточных тестов, в т.ч. с использованием МКА к мишеням

### Совместные проекты с НИИ

- Поддержка исследований, направленных на валидацию мишеней

*Novartis + Dana Farber Cancer Institute*

*Merck + Harvard Medical School*

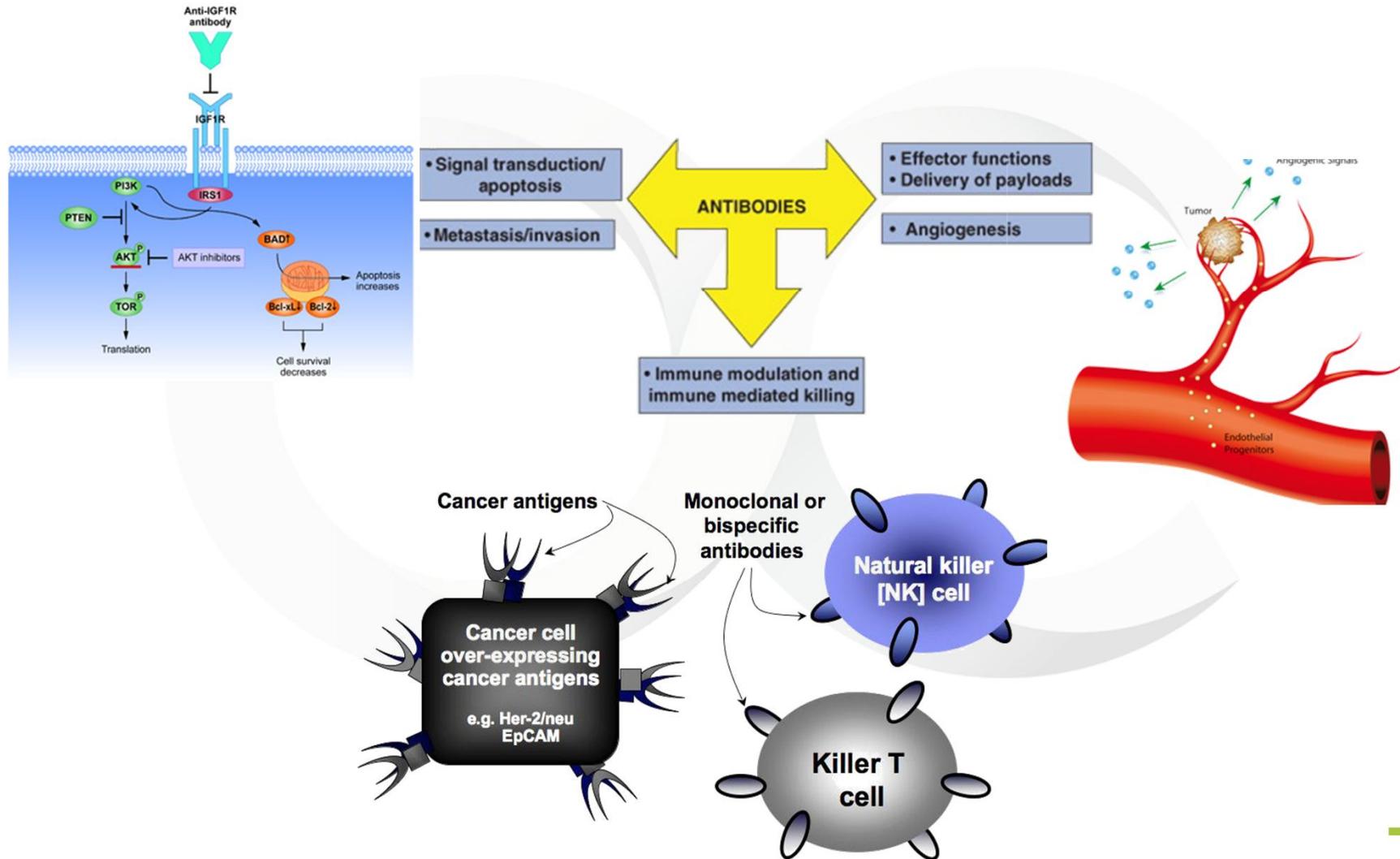
- Создание научных центров

*Prizer → Center for Technology Innovation*

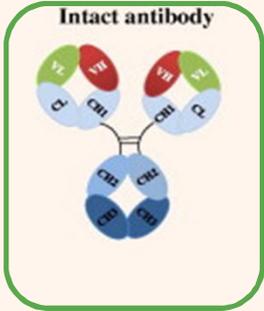
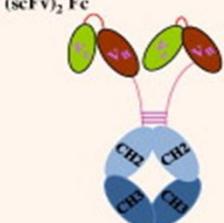
## ПРОТИВОРАКОВЫЕ АНТИТЕЛА ИЗВЕСТНЫЕ АНТИГЕНЫ-МИШЕНИ

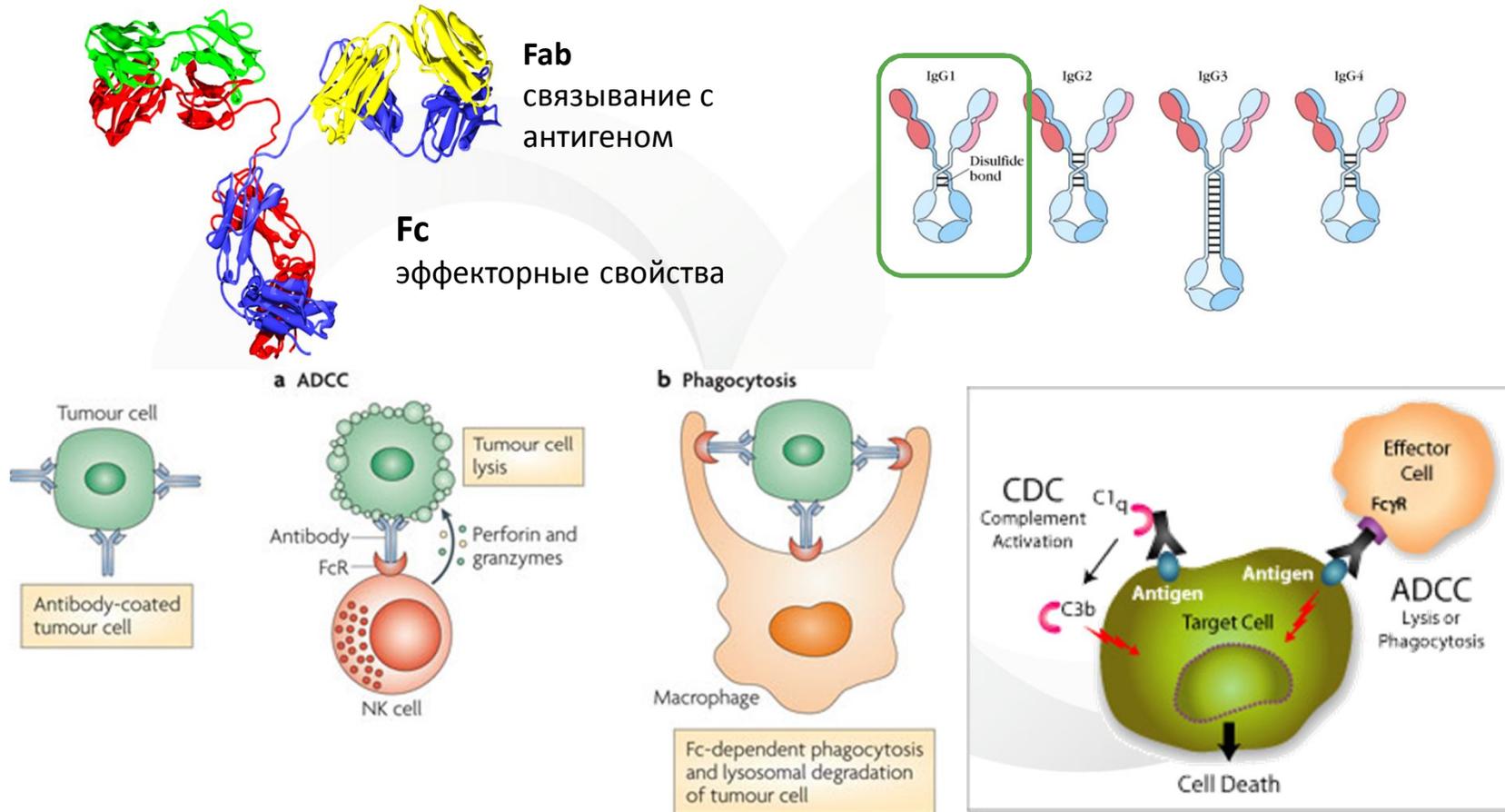
Antigen category	Examples of antigens	Tumor types expressing antigen
<b>Cluster of differentiation (CD) antigens</b>	CD20	non-Hodgkin lymphoma
	CD30	Hodgkin lymphoma
	CD33	Acute myelogenous leukemia
	CD52	Chronic lymphocytic leukemia
<b>Glycoproteins</b>	EpCAM	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	CEA	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	gpA33	Colorectal carcinoma
	Mucins	Epithelial tumors (breast, colon, lung, ovarian)
	TAG-72	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	Carbonic anhydrase IX	Renal cell carcinoma
	PSMA	Prostate carcinoma
	Folate binding protein	Ovarian tumors
<b>Glycolipids</b>	Gangliosides (e.g., GD2, GD3, GM2)	Neuroectodermal tumors, some epithelial tumors
<b>Carbohydrates</b>	Lewis-Y <sup>2</sup>	Epithelial tumors (breast, colon, lung, prostate)
<b>Vascular targets</b>	VEGF	Tumor vasculature
	VEGFR	Epithelium-derived solid tumors
	$\alpha V\beta 3$	Tumor vasculature
	$\alpha 5\beta 1$	Tumor vasculature
<b>Growth factors</b>	ErbB1/EGFR	Glioma, lung, breast, colon, head and neck tumors
	ErbB2/HER2	Breast, colon, lung, ovarian, prostate tumors
	ErbB3	Breast, colon, lung, ovarian, prostate tumors
	c-MET	Epithelial tumors (breast, ovary, lung)
	IGF1R	Lung, breast, head and neck, prostate, thyroid, glioma
	EphA3	Lung, kidney, colon, melanoma, glioma, hematological malignancies
	TRAIL-R1, TRAIL-R2	Solid tumors (colon, lung, pancreas) and hematological malignancies
	RANKL	Prostate cancer and bone metastases
<b>Stromal and extracellular matrix antigens</b>	FAP	Epithelial tumors (colon, breast, lung, head and neck, pancreas)
	Tenascin	Glioma, epithelial tumors (breast, prostate)

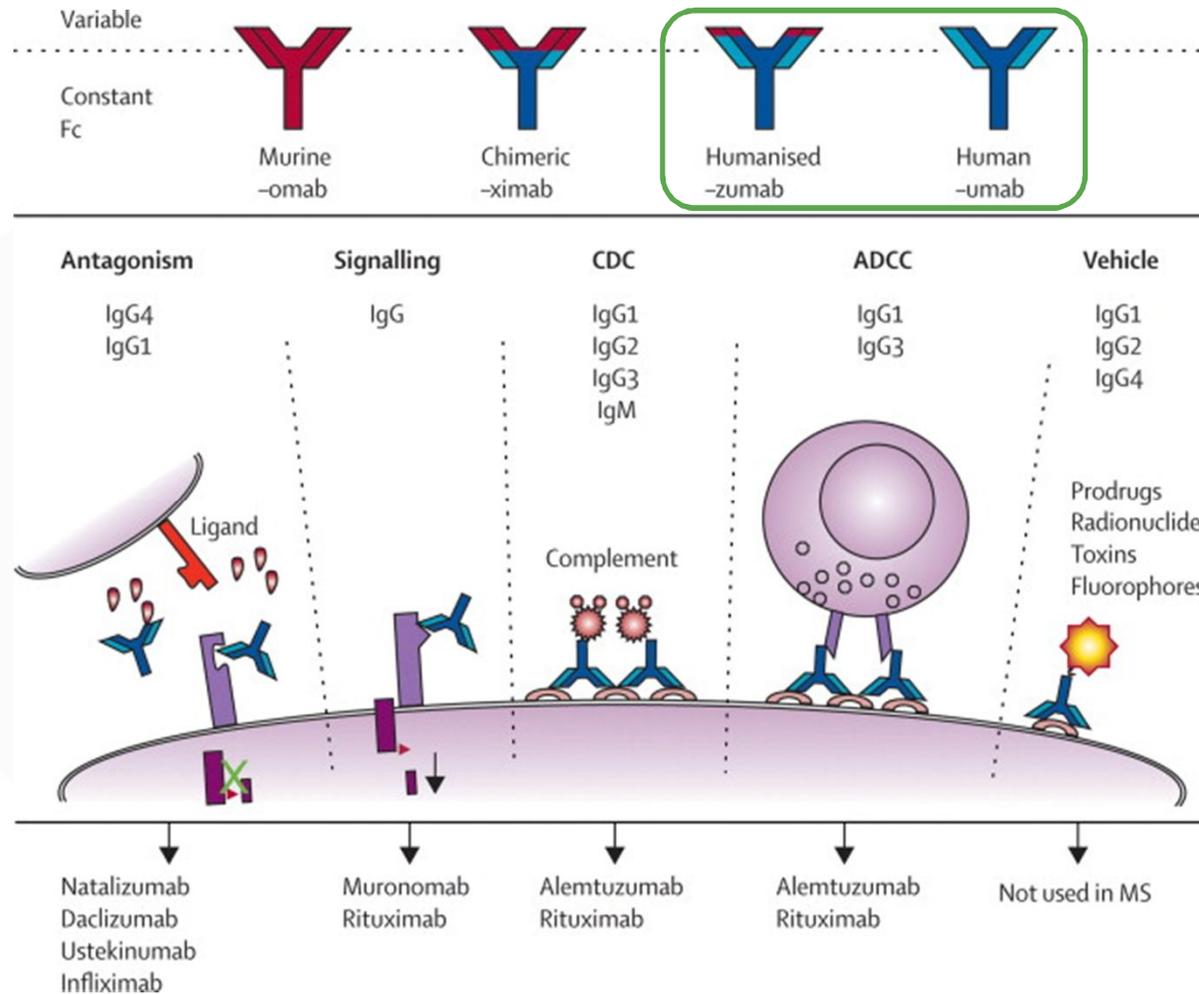
# ПРОТИВОРАКОВЫЕ АНТИТЕЛА МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ



Antibody	Target	FDA-Approved indication	Mechanism of action
Trastuzumab (Herceptin <sup>®</sup> ) humanized IgG1	HER2 (ErbB2)	HER2-positive breast cancer, as single agent or in combination with chemotherapy for (i) adjuvant or (ii) palliative treatment; HER2-positive gastric or gastroesophageal junction carcinoma, as first-line treatment in combination with cisplatin and capecitabine/5-FU	Inhibition of HER2 signaling; ADCC
Bevacizumab (Avastin <sup>®</sup> ) humanized IgG1	VEGF	For the palliative treatment of colorectal cancer, non-squamous non-small cell lung cancer, glioblastoma, or renal cell carcinoma	Inhibition of VEGF signaling
Cetuximab (Erbix <sup>®</sup> )* chimeric human/murine IgG1	EGFR (ErbB1)	In combination with radiation therapy for the initial treatment of locally or regionally advanced squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN); As a single agent for SCCHN patients with whom prior platinum-based therapy has failed; Palliative treatment of pre-treated metastatic EGFR-positive colorectal cancer	Inhibition of EGFR signaling; ADCC
Panitumumab (Vectibix <sup>®</sup> )* human IgG2	EGFR (ErbB1)	As a single agent for the treatment of pre-treated EGFR-expressing, metastatic colorectal carcinoma	Inhibition of EGFR signaling
Ipilimumab (Yervoy <sup>®</sup> ) IgG1	CTLA-4	For the treatment of unresectable or metastatic melanoma	Inhibition of CTLA-4 signaling
Rituximab (Rituxan <sup>®</sup> and Mabthera <sup>®</sup> ) chimeric human/murine IgG1	CD20	For the treatment of CD20-positive B cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL), and for maintenance therapy for untreated follicular CD20-positive NHL	ADCC; direct induction of apoptosis; CDC
Alemtuzumab (Campath <sup>®</sup> ) humanized IgG1	CD52	As a single agent for the treatment of B cell CLL	Direct induction of apoptosis; CDC
Ofatumumab (Arzerra <sup>®</sup> ) human IgG1	CD20	Treatment of patients with CLL refractory to fludarabine and alemtuzumab	ADCC; CDC
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg <sup>®</sup> ) humanized IgG4	CD33	For the treatment of patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse who are 60 years of age or older and who are not considered candidates for other cytotoxic chemotherapy (withdrawn from use in June 2010)	Delivery of toxic payload, calicheamicin toxin
Brentuximab vedotin (Adcetris <sup>®</sup> ) chimeric IgG1	CD30	For the treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic lymphoma	Delivery of toxic payload, auristatin toxin
<sup>90</sup> Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin <sup>®</sup> ) murine IgG1	CD20	Treatment of relapsed or refractory, low-grade, or follicular B cell NHL; Previously untreated follicular NHL in patients who achieve a partial or complete response to first-line chemotherapy	Delivery of the radio-isotope yttrium-90
<sup>131</sup> I-Tositumomab (Bexxar <sup>®</sup> ) murine IgG2	CD20	Treatment of patients with CD20 antigen-expressing relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed NHL	Delivery of the radio-isotope iodine-131; ADCC; direct induction of apoptosis

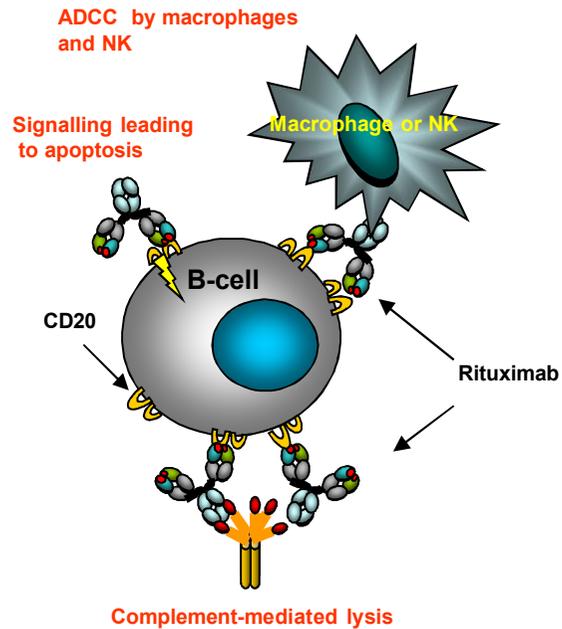
	Intact antibody	Fab	F(ab) <sub>2</sub>	Diabodies	scFv and(scFv) <sub>2</sub> Fc
				 	 
<b>Clinical status</b>	<p><b>FDA approved:</b>                      Oncoscint CR/OV: mouse IgG1                      Proscint: mouse IgG1                      Zevalin: mouse IgG1                      Bexxar: mouse IgG2a                      Votumumab: human IgG3</p>	<p><b>FDA approved:</b>                      CEA-Scan: mouse IgG1                      Myoscint: mouse IgG2a                      Verluma: mouse IgG2b                      LymphoScan: mouse IgG2a</p>	<p><b>FDA approved:</b>                      Igovomab: mouse IgG1</p>	<p><b>Clinical trial:</b>                      Bispecific scFv molecule (anti-CD19 and CD3) clinical phase I safety for Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL)</p>	<p><b>Pre-clinical trials:</b> [123I]-labeled anti-CEA minibody, [124I/64Cu] labeled anti-CD20 scFv-CH3</p>
<b>Advantage/Disadvantage</b>	<p><b>Advantage:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly specific and sensitive towards antigens.</li> </ul> <p><b>Disadvantage:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Long circulation times, low radio-localization index</li> <li>• High background</li> <li>• Human anti-mouse antibody (HAMA) response</li> <li>• High cost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid tumor targeting</li> <li>• Fast blood clearance</li> <li>• Low background</li> <li>• Less immunogenic in comparison to intact antibodies</li> <li>• Improved tumor penetration</li> <li>• Imaging time: 2-5 hrs after injection</li> <li>• Low avidity</li> <li>• Renal radiotoxicity due to high renal uptake</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fast blood clearance</li> <li>• Low background</li> <li>• Improved tumor penetration</li> <li>• Imaging time: 4-5 hrs after injection</li> <li>• Renal radiotoxicity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Binding specificity comparable to parent antibody</li> <li>• Bivalent binding, high avidity</li> <li>• Higher tumor uptake</li> <li>• Better tumor deposition than minibodies</li> <li>• Longer retention in the tumor</li> <li>• Maximum tumor uptake 1-6 hrs after injection</li> <li>• Renal radiotoxicity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Better penetrates the tumor</li> <li>• Rapid blood clearance: Low radio-localization indices (tumor-to-normal-tissue ratio)</li> <li>• Less immunogenic</li> <li>• Monovalent binding nature</li> <li>• Low functional avidity</li> <li>• Renal and hepatic radiotoxicity</li> <li>• scFv-Fc: Better therapeutic efficacy, good tumor contrast, slow clearance, high tumor uptake</li> </ul>





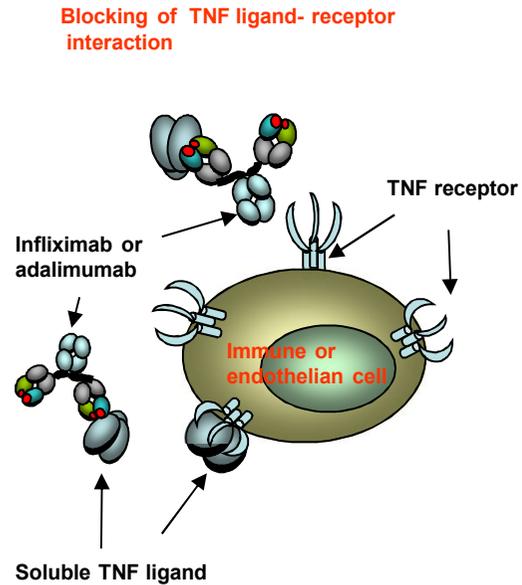
# ТИПЫ АНТИТЕЛ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

## Rituximab



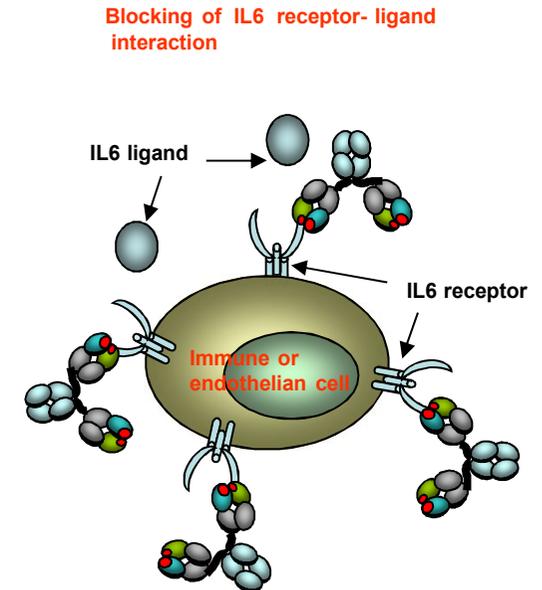
В-клеточная лимфома.  
лейкемия, ревматоидный артрит

## Infliximab and Adalimumab



Ревматоидный артрит,  
псориаз, болезнь Крона

## Tocilizumab



Ревматоидный артрит,  
псориаз, болезнь Крона

- Гибридомы, трансгенные животные
- Дисплейные методы: фаговый и клеточный дисплей, бесклеточные системы

**Table 1 Comparison of major technology platforms for therapeutic antibody discovery**

Platforms	Main applications	Major advantages	Key disadvantages	FDA approved therapeutic antibodies
Hybridoma	Generate hits and research reagents	Mature technology and cost effective	Potential immunogenicity	Orthoclone, Zevalin, Bexxar
Humanization	Generate therapeutic candidates	Well established and low cost	Not fully human antibodies	ReoPro, Rituxan, Simulect, Remicade, Erbitux, Adcetris, Zenapax, Synagis, Herceptin, Mylotarg, Mabcampath, Xolair, Actemra, Avastin, Tysabri, Lucentis, Soliris, Cimzia, Perjeta Humira and Benlysta
Phage display	Generate hits and therapeutic candidates	Large library size (> 10E10) and robust screening; fully human antibodies	Not all antibodies express well in Escherichia coli and require engineering	
Yeast display	Improve affinity and stability	Eukaryotic host; targeted sorting by FACS	Relatively small library size	None
Transgenic Rodents	Generate therapeutic candidates	High affinity fully human antibodies	Technology accessibility	Vectibis, Ilaris, Simponi, Stelara, Arzerra, Prolia, Yervoy

**МЕТОДЫ ДИСПЛЕЯ** → ОДНОВРЕМЕННАЯ РАБОТА С ДНК И БЕЛКАМИ  
– ОДИН МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС ДНК И ПРОДУКТ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНА

➤ **3 этапа разработки**

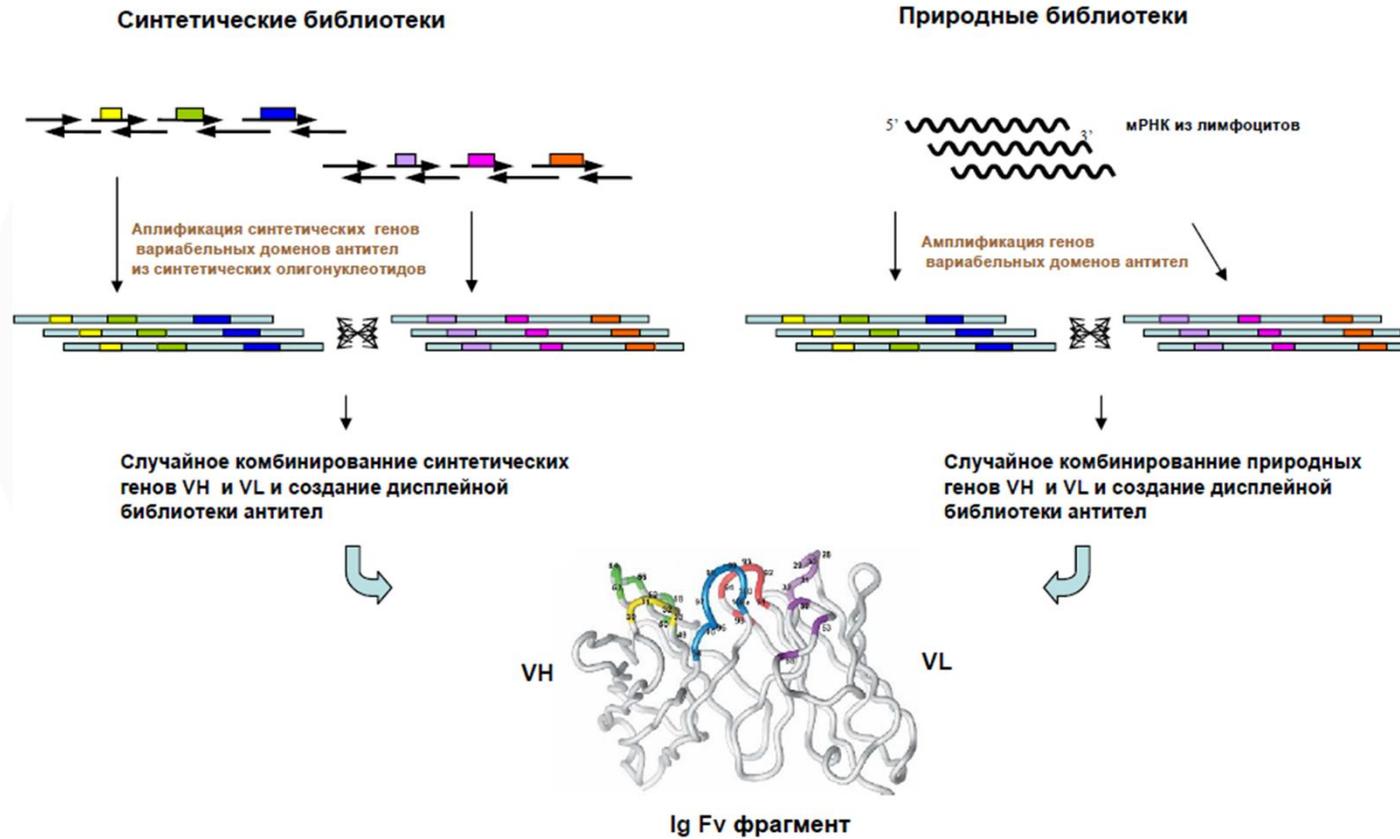
- ✓ Создание библиотек рекомбинантных ДНК антител
- ✓ Экспрессия и презентация АТ или их фрагментов на поверхности клеток или вирусных частиц
- ✓ Отбор клеток или частиц в зависимости от их взаимодействия с антигеном. Несколько циклов отбора

➤ **Библиотеки**

- ✓ Наивная
- ✓ Иммунная
- ✓ Синтетическая

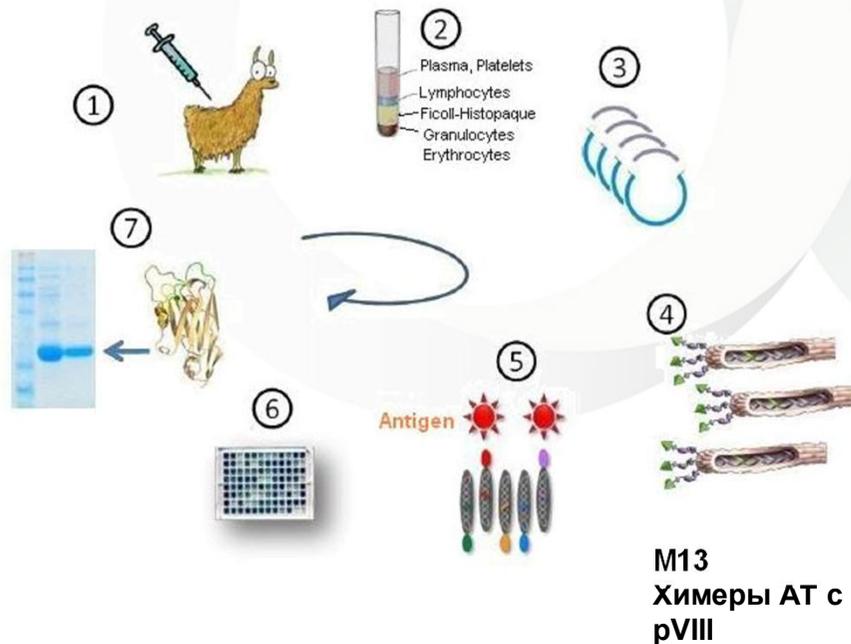
➤ **Количество вариантов** –  $10^6 - 10^{11}$

## Создание синтетических и природных библиотек антител



## ■ Стандартные технологии

- Использование синтетических и иммунных библиотек
- Работа в форматах scFv, Fab

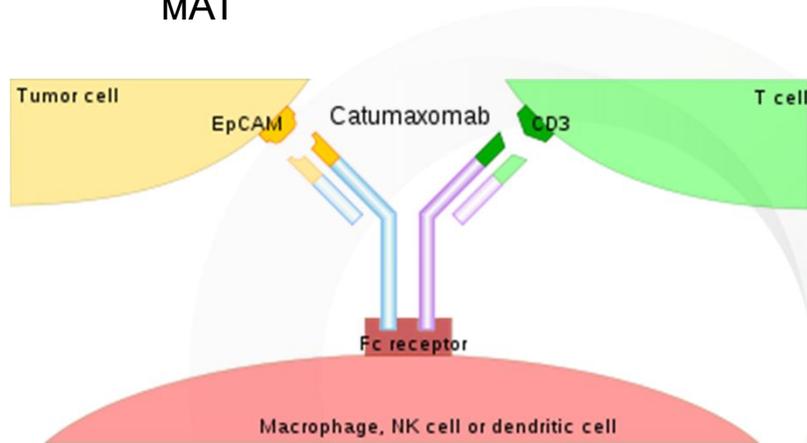


## ■ Новые подходы

- Использование библиотек различной природы
- Тандем: фаговый дисплей/клеточный дисплей (на FACS) – работа в форматах scFv, Fab, IgG
- NGS: deep sequencing – на всех этапах разработки для дизайна экспериментов, предсказания влияния замен, создания новых библиотек, статистической обработки *in vitro* экспериментов
- Технологии отбора фаговых частиц на “сложных” антигенах

■ Первое биспецифическое МАТ

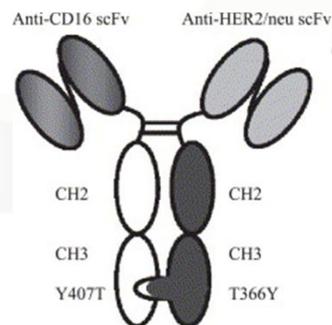
■ МАТ на этапах исследований



■ Клинические исследования на ранних стадиях биспецифических антител CD3+: CD19, CEA, CD20, gp100

■ Клинические исследования на ранних стадиях биспецифических антител “однотипных белков”: EGFR-HER3, HER2-HER3, Ang2-VEGFR, IL-4-IL12

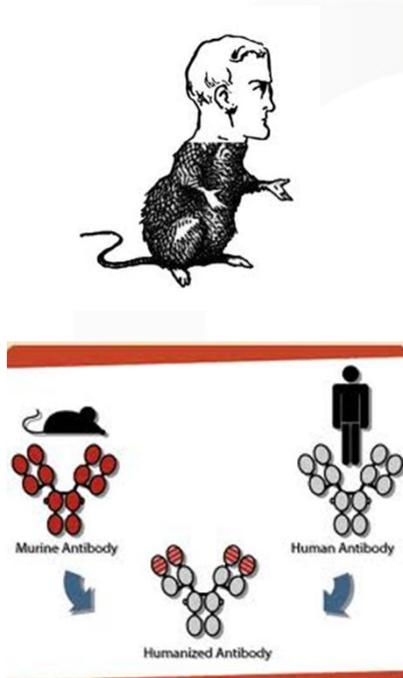
■ Поиск оптимальной технологии создания биспецифических молекул на основе полноразмерных антител и их доменов





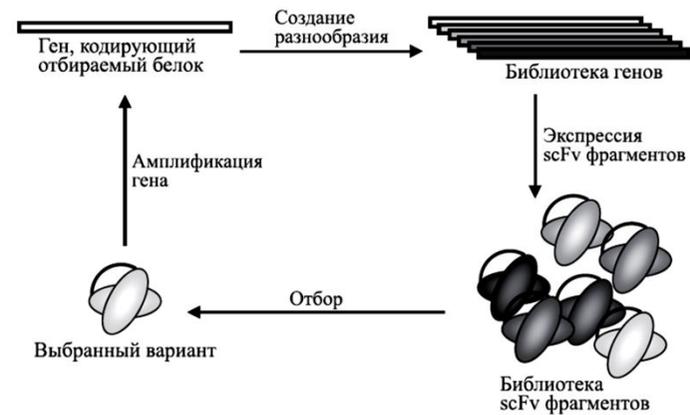
# СНИЖЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ИММУНОГЕННОСТИ. ГУМАНИЗАЦИЯ

## Известные методы



## Иновационные методы

- **Направленная гуманизация** – ограниченное число вариантов
  - CDR-grafting
  - SDR-grafting
  - Resurfacing
  - Superhumanization
- **Рандомная гуманизация** – большое число вариантов



- Увеличение продуктивности
- Создание ГЛФ
- Хранение ГЛФ

- Оптимальная доза
- Время полужизни
- Иммуногенность

## Стабильность

- Предсказание:
  - Гермлайнинг
  - Поиск и анализ консенсусов
- Модификации:
  - **Внесение стабилизирующих мутаций:**  
*“солевые мостики”, S-S связи*
  - **Элиминация нежелательных аминокислот:**  
*заряженные аминокислоты в гидрофобном ядре каркасной части*
  - **Суммарный подход:** анализ сиквенсов – анализ возможных структур – создание библиотек оптимальных вариантов и их скрининг

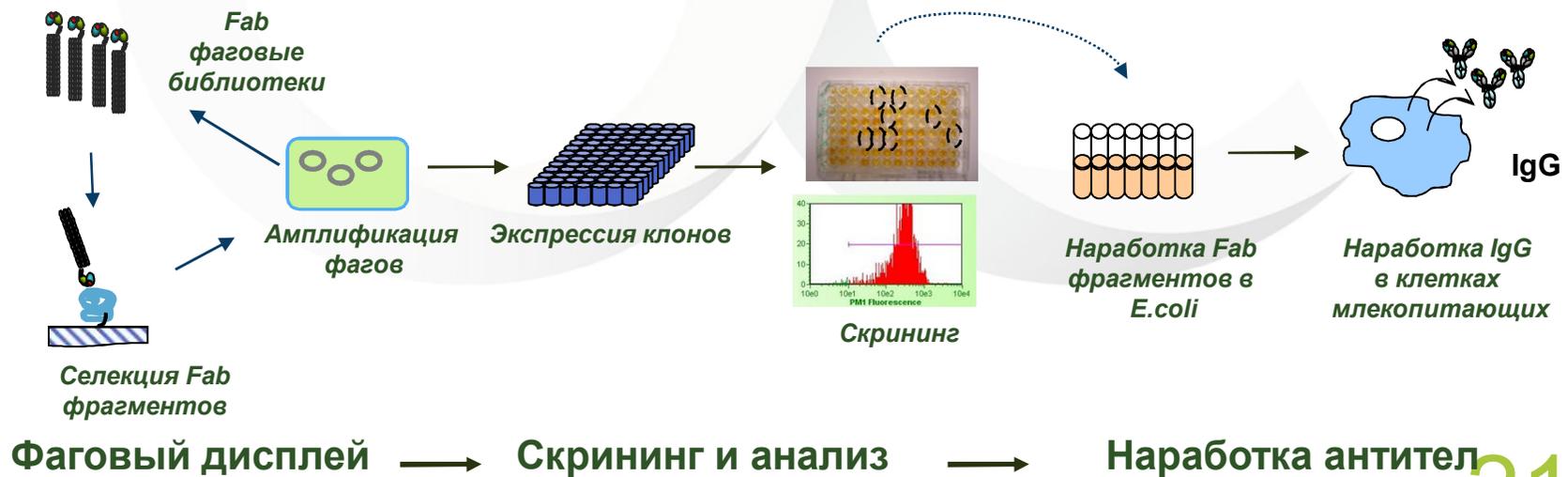
## Агрегация

- Сложно обеспечить оценку в высокопроизводительном формате
  - Зависит от условий культивирования клеток, очистки
- Направленный точечный мутагенез известных сайтов, снижающих агрегацию белков

### Причины и решения:

- **Взаимодействие белков в ненативной форме** – чем выше стабильность, тем меньше агрегация → **увеличение стабильности**
- **Взаимодействие белков в нативном состоянии** за счет гидрофобных участков → **изменение изоэлектрической точки**

- Фаговый дисплей антител человека и животных
- Создание библиотек
- Гуманизация и матурация
- Белковый дизайн, биспецифические антитела

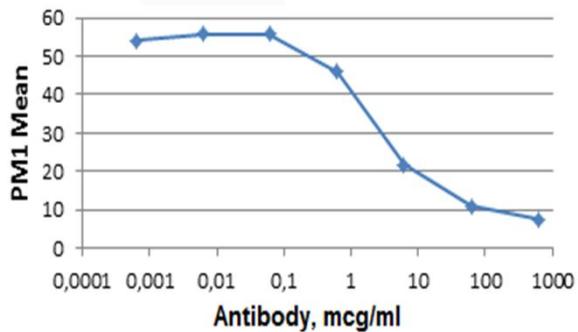




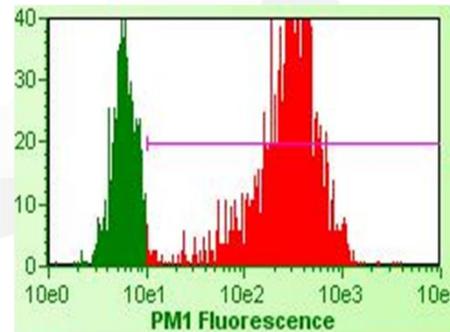
- Разработка клеточных тестов
- Транзиентная экспрессия антигенов и антител
- Поддержка проектов по разработке новых препаратов



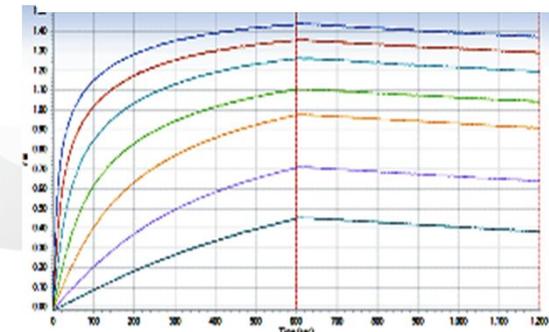
The Octet RED96 System



*Клеточные тесты*



*Проточная цитометрия*



*Анализ кинетики связывания*

**I. Клонирование**

(10 дней)



**II. Культивирование**

(6-12 дней)



**III. Очистка**

(3 дня)



**IV. Анализ**

(4 дня)

**Ключевые особенности:**

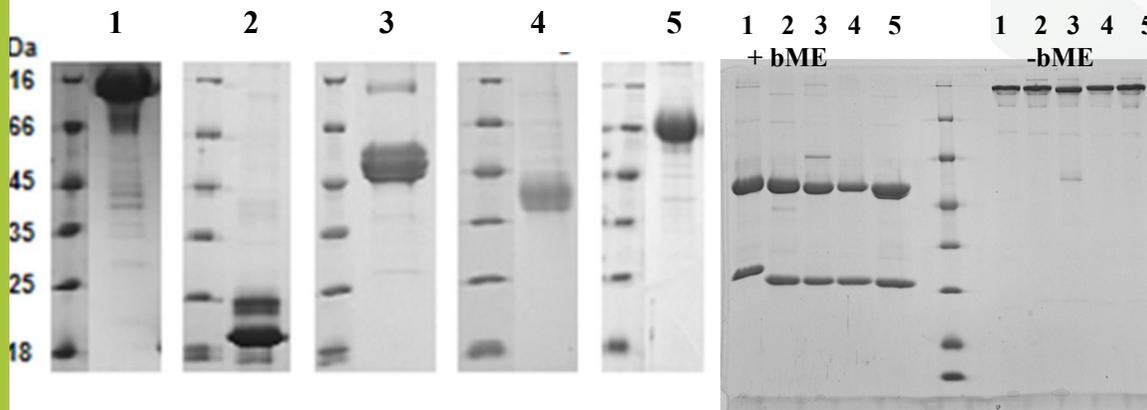
- Оригинальные вектора
- Транзиентная экспрессия
- Суспензионная культура
- Многократный фидинг
- Безбелковые среды, аффинная очистка

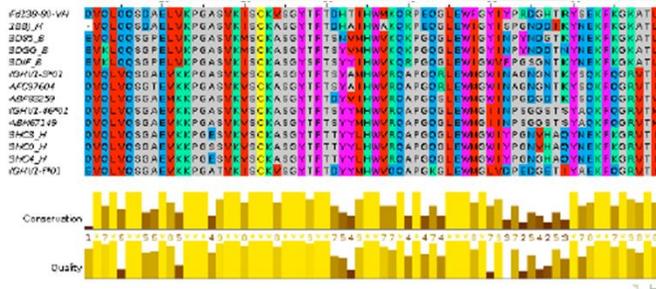
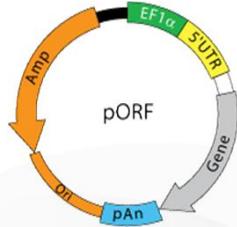
**Преимущества:**

- Высокий уровень экспрессии
- Быстрота получения
- Легкость масштабирования
- Высокая продуктивность
- Высокая чистота продукта

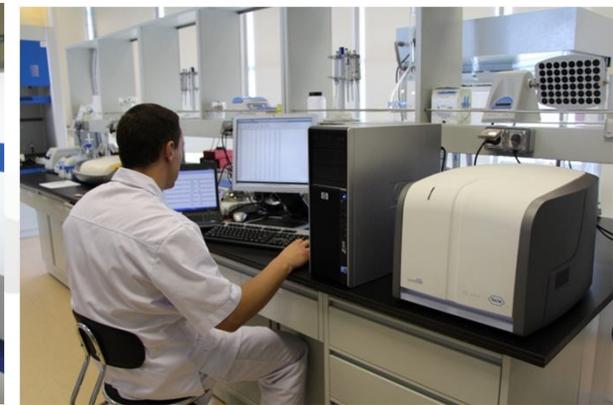
- собственная высокоэффективная система получения антигенов и IgG антител.
- быстрота процесса, корректные фолдинг и гликозилирование.
- выход продукта – до десятков миллиграммов на литр культуры
- произведено более 70 белков различной природы (лиганды, антитела, рецепторы)

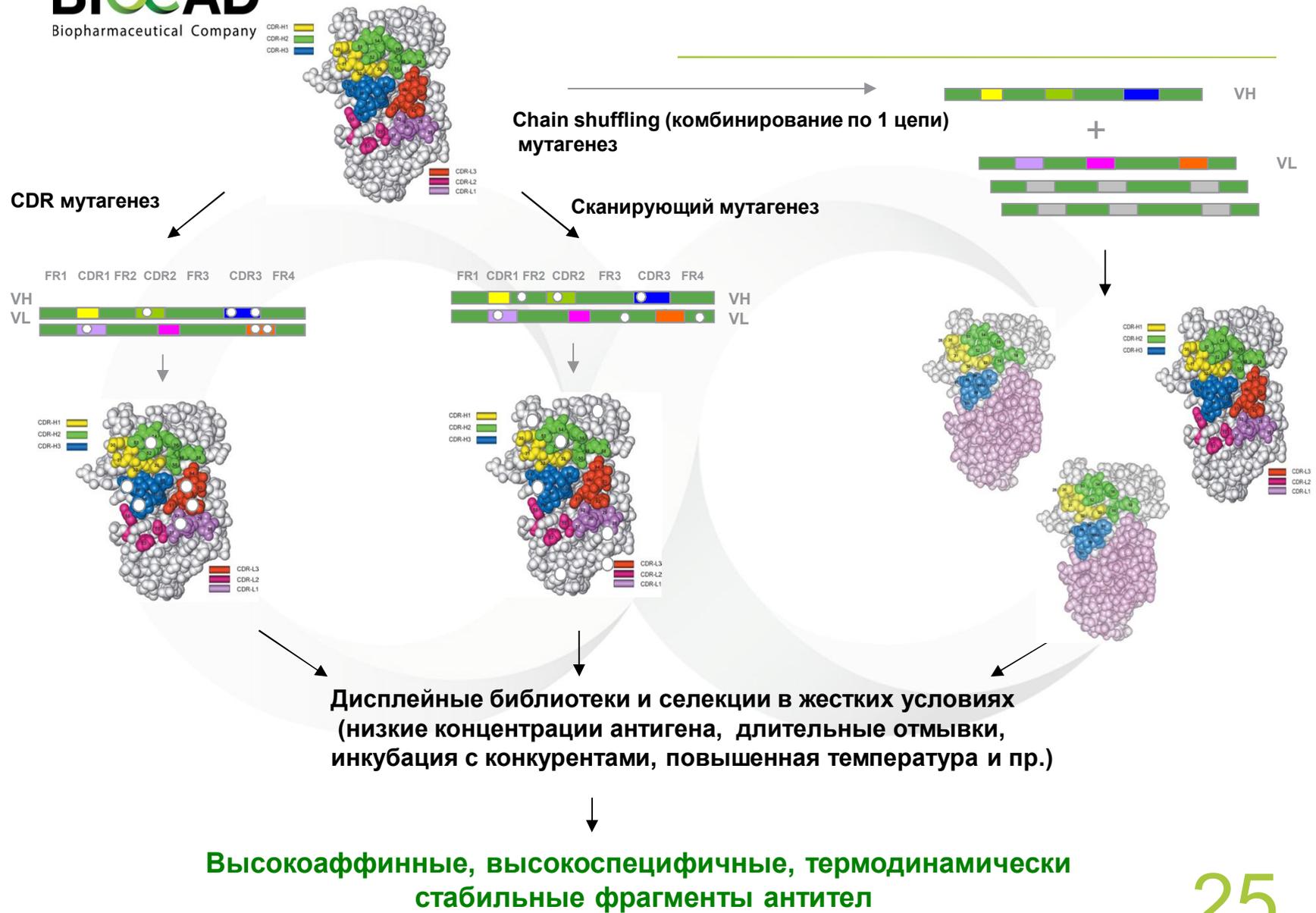
**SDS-электрофореграммы отдельных белков:**



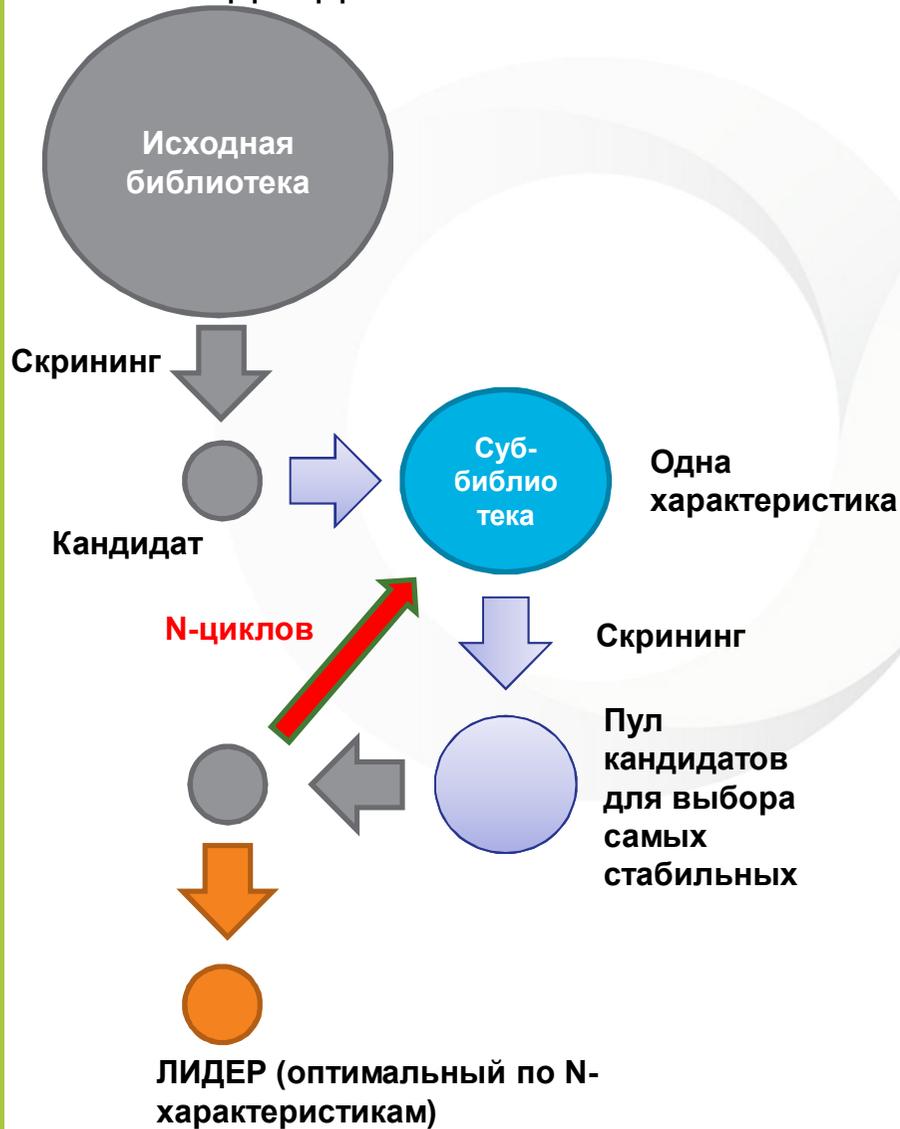


- Создание векторов для экспрессии генов в транзientных культурах и для получения клеточных линий (антигены, антитела, химерные гены)
- Создание иммунных, комбинаторных, рандомных библиотек генов
- Внедрение методов биоинформатического анализа данных
- Библиотека Fc-фрагментов антител: время полужизни, ADCC, CDC

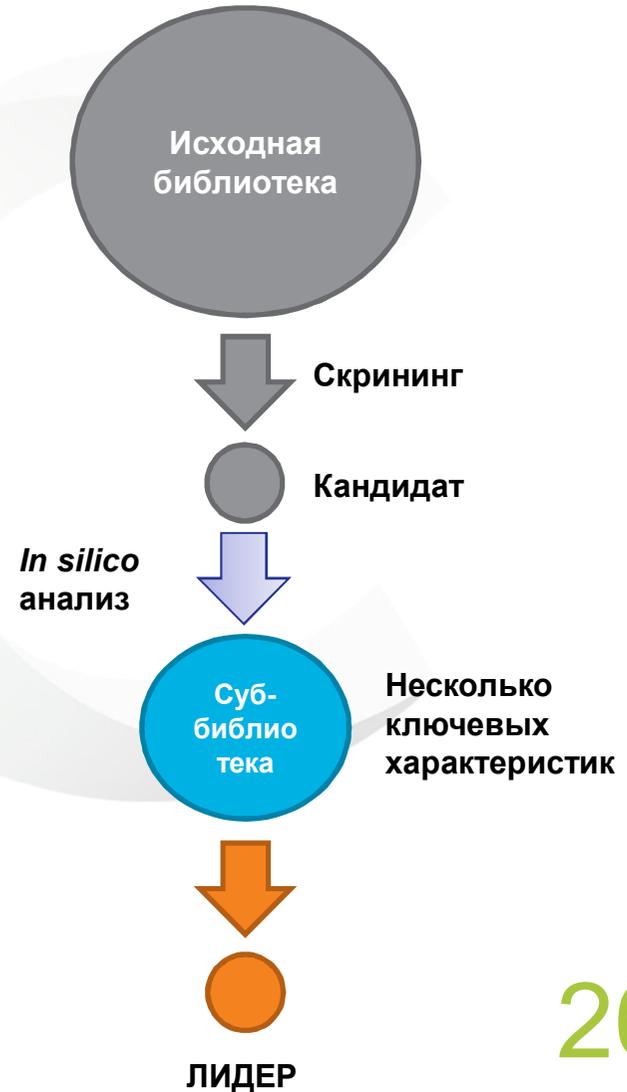




## ■ СТАНДАРТНЫЙ ПОДХОД



## ■ НОВЫЙ ПОДХОД

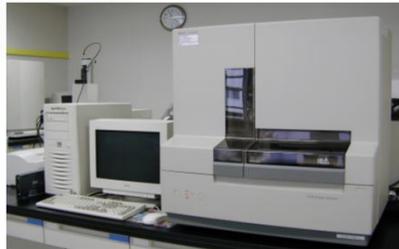
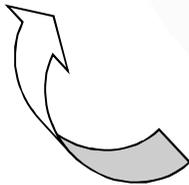


- **максимальная автоматизация процессов**
- **высокая производительность**
- **создание новых технологических платформ**

**Qpix2 (Genetix)**



**Freedom Evo 150 (Tecan)**



**Sequencer ABI3130 (Applied Biosystems)**





+ Биоаналоги (5)  
+ bio-superior (3)