

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 035253

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.05.21

(21) Номер заявки

201591801

(22) Дата подачи заявки

2014.03.12

(51) Int. Cl. A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

### (54) ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ

(31) 61/793,641

(32) 2013.03.15

(33) US

(43) 2016.03.31

(86) PCT/US2014/024597

(87) WO 2014/150937 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Абрамс Тиния, Коэн Стивен, Фантон  
 Кристи П. (US), Хубер Томас (CH),  
 Миллер Кэти, Шлейер Сью Хо  
 (US), Тиссо-Дагетт Катрин Ульрике,  
 Финнер Катрин (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) CHAPEL ALAIN ET AL.: "In vivo gene targeting of IL-3 into immature hematopoietic cells through CD117 receptor mediated antibody gene delivery", GENETIC VACCINES AND THERAPY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, 27 October 2004 (2004-10-27), page 16, XP021018926, ISSN: 1479-0556, DOI: 10.1186/1479-0556-2-16, abstract; page 2; paragraph 7-page 8.

Chemicon international: "MOUSE ANTI-c-Kit (CD117)", Blood J. Cell Physiol. Leukemia Res. Blood Immunol. Cell Biol. J. Immunol. Meths, 6 June 2003 (2003-06-06), pages 1917-192030, XP055127910, Retrieved from the Internet: URL:https://www.emdmillipore.com/INTL/en/product/Anti-c-Kit-Antibody%2C-clone-YB5.B8%2C-Phycoerythrin-conjugated, MM\_NF-MAB1162 H [retrieved on 2014-07-09], the whole document

US-A1-2005069551

WO-A2-2005037992

ILIAS GEORGALAS ET AL.: "Bilateral cystoid macular edema in a patient with chronic myeloid leukaemia under treatment with imatinib mesylate: report of an unusual side effect", GRAEFE'S ARCHIVE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY; INCORPORATING GERMAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 245, no. 10, 12 June 2007 (2007-06-12), pages 1585-1586, XP019542069, ISSN: 1435-702X, DOI: 10.1007/S00417-007-0600-Y, the whole document

US-A1-2002197262

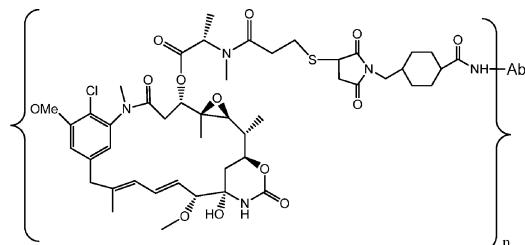
& KUROSAWA K. ET AL.: "IMMOBILIZED ANTI-KIT MONOCLONAL ANTIBODY INDUCES LIGAND-INDEPENDENT DIMERIZATION AND ACTIVATION OF STELLAR FACTOR RECEPTOR: BIOLOGIC SIMILARITY WITH MEMBRANE-BOUND FORM OF STELLAR FACTOR RATHER THAN IST SOLUBLE FORM", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 87, no. 6, 15 March 1996 (1996-03-15), pages 2235-2243, XP001033402, ISSN: 0006-4971, page 2235, last paragraph

WO-A1-2012154480

B1

035253

(57) Настоящее изобретение относится к лекарственному конъюгату антитела формулы Ab-(L-(D)<sub>m</sub>)<sub>n</sub> или его фармацевтически приемлемой соли, где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, L является линкером, D является остатком лекарственного средства, m является целым числом от 1 до 8 и n является целым числом от 1 до 10. Также представлен лекарственный конъюгат антитела формулы



**035253**

**B1**

035253    B1

035253    B1

где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а n является целым числом от 1 до 10. Кроме того, представлена фармацевтическая композиция для использования в лечении злокачественного новообразования, содержащая любой из указанных конъюгатов.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам против сKIT, фрагментам антител, лекарственным конъюгатам антител и их применению для лечения злокачественных новообразований.

### Предпосылки изобретения

сKIT является рецепторной тирозинкиназой с одним трансмембранным доменом, связывающейся с лигандом фактором стволовых клеток (SCF). SCF индуцирует гомодимеризацию сKIT, активирующую его тирозинкиназную активность и сигналы через пути PI3-АКТ и MAPK (Kindblom et al., Am J. Path. 1998 152(5): 1259). Исходно сKIT открыли как онкоген в виде укороченной формы, экспрессируемой ретровирусом кошачьих (Besmer et al., J. Virol. 1986; 60(1): 194-203). Клонирование соответствующего гена человека показало, что сKIT является членом класса рецепторных тирозинкиназ типа III, насчитывающим среди членов семейства FLT3, рецептор CSF-1 и рецептор PDGF.

У мышей, мутантных по сKIT, обнаруживали, что сKIT необходим для развития гематопоэтических клеток, половых клеток, тучных клеток и меланоцитов. У человека потеря функции сKIT может приводить к глухоте и депигментации кожи и волос. Описан ряд мутаций с приобретением функции сKIT при различных злокачественных новообразованиях. Такие злокачественные новообразования включают гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), острый миелолейкоз (AML), мелкоклеточный рак легких (SCLC), тучноклеточный лейкоз (MCL) и рак поджелудочной железы (Hirota et al., Science 1998 (279):577; Esposito et al., Lab. Invets. 2002 82(11): 1481).

Учитывая эти предварительные данные о том, что сKIT является онкогеном, получали антитело, с помощью которого идентифицировали сKIT в качестве маркера AML (Gadd et al., Leuk. Res. 1985 (9): 1329). Это моноклональное антитело мыши, известное как YB5.B8, получали с использованием лейкозных бластных клеток от пациента-человека, и оно связывалось с сKIT, избыточно экспрессирующемся на поверхности клеток AML, но Ckit не определяли на нормальных клетках крови или костного мозга (Gadd et al., выше). Получали второе антитело против сKIT (SR-1), блокирующее связывание SCF с сKIT и, таким образом, блокирующее передачу сигнала сKIT (Broudy et al., Blood 1992 79(2):338). Биологическим эффектом антитела SR-1 являлось ингибирование роста BFU-E и CFU-GM, и, основываясь на этих данных, предлагали его использование в дальнейших исследованиях гемопоэза или роста опухолевых клеток (Broudy et al., выше).

В дальнейших исследованиях злокачественных новообразований исследователи обнаруживали, что обработка иматинибом, низкомолекулярным ингибитором сKIT, будет значительно снижать пролиферацию клеточных линий GIST. Однако клетки, обработанные иматинибом, со временем становятся резистентными по причине вторичных мутаций сKIT (Edris et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Early On-line Edition 2013). Однако когда клетки GIST обрабатывали антителом SR-1 в качестве второго терапевтического средства, наблюдали значительное снижение пролиферации клеток и снижение экспрессии сKIT на поверхности клеток (Edris et al., выше). Таким образом, неконъюгированное антитело SR-1 являлось эффективным в решении проблемы резистентности к иматинибу в линиях GIST человека, что позволяет предполагать, что комбинация иматиниба/антитела против сKIT может являться применимой.

#### Лекарственные конъюгаты антител.

Лекарственные конъюгаты антител ("ADC") используют для местной доставки цитотоксических средств при лечении злокачественных новообразований (см., например, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005). ADC делают возможной направленную доставку остатка лекарственного средства, когда можно достигать максимальной эффективности при минимальной токсичности. По мере того, как все больше ADC демонстрируют многообещающие клинические результаты, существует повышенная потребность в разработке новых терапевтических средств для терапии злокачественных новообразований.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к лекарственному конъюгату антитела формулы  $Ab\text{-(L-D)}_m\text{n}$  или его фармацевтически приемлемой соли; где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом специфически связывающимся с эпиптом сKIT человека; L является линкером; D является остатком лекарственного средства; m является целым числом от 1 до 8; и n является целым числом от 1 до 10.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное n является 3 или 4.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с внеклеточным доменом сKIT (SEQ ID NO: 160).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпиптом сKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с сKIT человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с сKIT человека в SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Лекарственный коньюгат антитела, в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующей CDR другого антитела против cKIT из табл. 1.

Лекарственный коньюгат антитела, в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицируют, подвергают делеции или заменяют.

Лекарственный коньюгат антитела, сохраняющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности по сравнению с вариабельной областью легкой цепи или вариабельной областью тяжелой цепи.

Лекарственный коньюгат антитела, где антитело является моно克лональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

Лекарственный коньюгат антитела, где указанный линкер (L) выбран из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, заряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.

Лекарственный коньюгат антитела, где линкер получают из перекрестносишающего реагента, выбранного из группы, состоящей из N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилитио)пропионата (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилитио)пентаноата (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилитио)бутаноата (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилитио)-2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилодоацетата (SIA), N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоата (SIAB), малеинимида PEG NHS, N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оата (CX1-1).

Лекарственный коньюгат антитела, где указанный линкер получают из перекрестносишающего реагента N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC).

Лекарственный коньюгат антитела, где указанный остаток лекарственного средства (D) выбран из группы, состоящей из ингибитора V-ATФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bc12, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибиторов реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

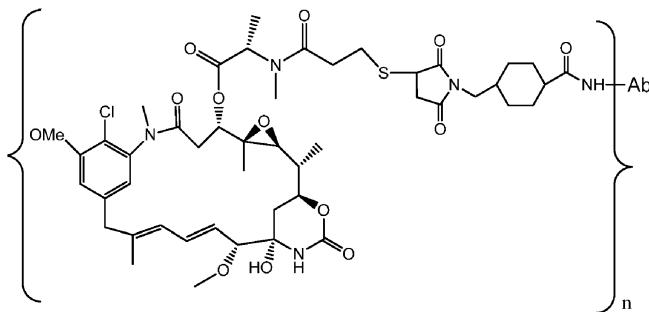
Лекарственный коньюгат антитела, где остаток лекарственного средства является майтанзиноидом.

Лекарственный коньюгат антитела, где майтанзиноид является N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзином (DM1) или N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанзином (DM4).

Лекарственный коньюгат антитела в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный коньюгат антитела в комбинации с терапевтическим средством, указанным в табл. 16.

Лекарственный коньюгат антитела формулы



или его фармацевтически приемлемая соль; где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с cKIT человека и по меньшей мере n-числом первичных аминов; и n является целым числом от 1 до 10.

Лекарственный коньюгат антитела, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155).

Лекарственный коньюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

Лекарственный коньюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164.

Лекарственный коньюгат антитела, где указанное Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Лекарственный коньюгат антитела, в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующего CDR другого антитела против cKIT из табл. 1.

Лекарственный коньюгат антитела, в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицировали, подвергали делеции или заменили.

Лекарственный коньюгат антитела, сохраняющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности по сравнению с вариабельной областью легкой цепи или вариабельной областью тяжелой цепи.

Лекарственный коньюгат антитела, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

Лекарственный коньюгат антитела, где указанное n является целым числом от 2 до 8.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное *n* является целым числом от 3 до 4.

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с терапевтическим средством, указанным в табл. 16.

Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственный конъюгат антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция, где указанную композицию получают в виде лиофилизата.

Фармацевтическая композиция, где указанный лиофилизат содержит лекарственный конъюгат антитела, сукцинат натрия и полисорбат 20.

Способ лечения сKIT-положительного злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту лекарственного конъюгата антитела или фармацевтической композиции.

Способ лечения, где указанное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы.

Способ, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

Способ, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с терапевтическим средством, указанным в табл. 16.

Лекарственный конъюгат антитела для применения в качестве лекарственного средства.

Лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическая композиция для применения в лечении сKIT-положительного злокачественного новообразования.

Лекарственный конъюгат антитела, вводимый в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный конъюгат антитела, вводимый в комбинации с терапевтическим средством, указанным в табл. 16.

Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

Клетка-хозяин, содержащая вектор.

Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение антитела из культуры.

Способ получения лекарственного конъюгата антитела против сKIT, включающий (а) химическое соединение SMCC с остатком лекарственного средства DM-1; (б) конъюгирование указанного линкера-лекарственного средства с антителом, выделенным из культуры клеток; и (с) очистку лекарственного конъюгата антитела.

Лекарственный конъюгат антитела, имеющий среднее соотношение майтазонида и антитела (MAR), измеряемое с помощью УФ-спектрофотометра, приблизительно 3,5.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (е) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (ф) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (а) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (б) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (с) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (д) LCDR1 SEQ

ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, являющийся меченым.

Диагностический реагент, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего средства и иона металла.

#### Определения.

Если не указано иначе, предполагают, что следующие термины и фразы, как применяют в настоящем описании, имеют следующие значения.

Термин "алкил" относится к моновалентной насыщенной углеводородной цепи, содержащей конкретное количество атомов углерода. Например, C<sub>1-6</sub>алкил относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода. Алкильные группы могут являться неразветвленными или разветвленными. Типичные разветвленные алкильные группы содержат одну, две или три цепи. Примеры алкильных групп включают, в качестве неограничивающих примеров, метил, этил, пропил (n-пропил и изопропил), бутил (n-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил), пентил (n-пентил, изопентил и неопентил) и гексил.

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело" относится к полипептиду из семейства иммуноглобулинов, способному связываться с соответствующим антигеном нековалентно, обратимо и специфичным образом. Например, природное антитело IgG является тетramerом, содержащим по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнитель но подразделять на гипервариабельные области, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антитело" включает, в качестве неограничивающих примеров, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела верблюжьих, химерные антитела и антидиотипические (против Id) антитела (включая, например, антитела против Id к антителам по настоящему изобретению). Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

Термины "определяющие комплементарность домены" или "определяющие комплементарность области" ("CDR") взаимозаменяю относятся к гипервариабельными областям VL и VH. CDR являются участком цепей антитела, связывающим белок-мишень, имеющим специфичность к такому белку-мишени. В каждой VL или VH человека находятся три CDR (CDR1-3, последовательно пронумерованные от N-конца), составляющие приблизительно 15-20% вариабельных доменов. CDR можно обозначать по их области и порядку. Например, "VHCDR1" или "HCDR1" относятся к первой CDR вариабельной области тяжелой цепи. CDR являются структурно комплементарными эпигапту белка-мишени и, таким образом, напрямую отвечают за специфичность связывания. Оставшиеся участки VL или VH, так называемые каркасные области, проявляют меньше вариабельности аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

Положения CDR и каркасных областей можно определять с использованием различных хорошо известных определений в этой области, например, по Rabat, по Chothia и AbM (см., например, Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих участков также описывают в следующих источниках: Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); and Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); and Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); and Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

Легкие и тяжелые цепи разделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "вариабельная" используют функционально. В связи с этим, следует понимать, что вариабельные домены частей легких (VL) и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. С другой стороны, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Общепринято, номер доменов константной области повышается с их удалением от антигенсвязывающего участка или амино-конца антитела. N-

конец является вариабельной областью, и на С-конце находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбокси-концевые домены тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как применяют в настоящем описании, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к одной или нескольким частям антитела, сохраняющим способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического препятствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры связывающих фрагментов включают, в качестве неограничивающих примеров, одноцепочечные Fv (scFv), Fv, связанные дисульфидными связями (sdFv), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)-2-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), состоящий из домена VH; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или другие эпитоп-связывающие фрагменты антитела.

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединять с использованием рекомбинантных способов, с помощью синтетического линкера, позволяющего получать их в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются для образования моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv ("scFv"); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающий фрагмент". Эти антигенсвязывающие фрагменты получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в этой области, и фрагменты подвергают скринингу на применимость аналогично интактным антителам.

Антигенсвязывающие фрагменты также можно включать в однодоменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интраантитела, диатела, триотела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and HudsoN, Nature Biotechnology 23: 1 126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты подвергать графтингу в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описывают фибронектиновые полипептидные монотела).

Антигенсвязывающие фрагменты можно включать в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных сегментов Fv (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., Protein Eng. 8: 1057-1062, 1995; и патент США № 5641870).

Как применяют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител" относится к полипептидам, включающим антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие, по существу, идентичную аминокислотную последовательность или полученные из того же генетического источника. Этот термин также включает препараты молекул антител одной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа.

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело человека" включает антитела, содержащие вариабельные области, в которых каркас и области CDR получают из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, ее также получают из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека, или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные при анализе каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000).

Антитела человека по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*, или консервативную замену для обеспечения стабильности или производства).

Как применяют в настоящем описании, термин "распознавать" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, обнаруживающему и взаимодействующему (например, связывающемуся) со своим эпитопом, является ли эпитоп линейным или конформационным. Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым специфически связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, располагающихся рядом благодаря третичному фолдингу белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные при третичном фолдинге, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают способы, известные в этой области, например, рентгеноструктурную кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). "Паратоп" является частью антитела, распознавающей эпитоп антигена.

Фраза "специфически связывает" или "избирательно связывает" при использовании в отношении

описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и антителом, фрагментом антитела, или полученным из антитела связывающим средством, относится к реакции связывания, с помощью которой определяют наличие антигена в гетерогенной популяции белков и других биологических препаратах, например, в биологическом образце, например, крови, сыворотке, плазме или образце ткани. Таким образом, в условиях конкретного обозначенного иммунологического анализа антитела или связывающие средства с конкретной специфичностью связывания связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в два раза сильнее фоновых значений и, по существу, не связываются в значительной степени с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном из аспектов в условиях конкретного обозначенного иммунологического анализа антитело или связывающее средство с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном по меньшей мере в 10 раз сильнее фоновых значений и, по существу, не связывается в значительной степени с другими антигенами, присутствующими в образце. Специфическое связывание с антителом или связывающим средством в таких условиях может потребовать селекции антитела или средства по его специфичности к конкретному белку. При желании или необходимости, этой селекции можно достигать, удаляя антитела, перекрестно реагирующие с молекулами других видов (например, мыши или крысы) или других подтипов. Альтернативно, в некоторых аспектах выбирают антитела или фрагменты антител, перекрестно реагирующие с конкретными желаемыми молекулами.

Как применяют в настоящем описании, термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных участках. В каждом антигennом участке вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном посредством слабых нековалентных сил в многочисленных участках; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, по существу, не содержащему другие антитела, имеющие другие антигенные специфичности. Однако, выделенное антитело, специфически связывающееся с одним антигеном, может иметь перекрестную реактивность по отношению к другим антигенам. Кроме того, выделенное антитело, по существу, может не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Термин "соответствующая последовательность зародышевой линии человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность вариабельной области человека, обладающую наибольшей определенной идентичностью аминокислотных последовательностей по отношению к референсной аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области при сравнении со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми последовательностями вариабельной области иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области человека с наибольшей идентичностью аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области при сравнении со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может являться только каркасными областями, только определяющими комплементарность областями, каркасными и определяющими комплементарность областями, вариабельным сегментом (как определено выше) или другими комбинациями последовательностей или подпоследовательностей, содержащих вариабельную область. Идентичность последовательности можно определять с использованием способов, представленных в настоящем описании, например, выравнивая две последовательности с использованием BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в этой области.

Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может иметь по меньшей мере приблизительно 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности по отношению к референсной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности вариабельной области.

Для выбора антител, специфически иммунореактивных по отношению к конкретному белку, можно использовать множество форматов иммунологических анализов. Например, для выбора антител, специфически иммунореактивных по отношению к белку, общепринято используют твердофазные иммунологические анализы ELISA (см., например, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), на предмет описания форматов и условий иммунологических анализов, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности). Как правило, при специфической или избирательной реакции связывания будут получать сигнал по меньшей мере в два раза выше фонового сигнала и, более типично, по меньшей мере в 10-100 раз выше фона.

Термин "равновесная константа диссоциации (KD,M)" относится к константе скорости диссоциации ( $kd$ , время $^{-1}$ ), разделенной на константу скорости ассоциации ( $ka$ , время $^{-1}$  M $^{-1}$ ). Равновесные константы диссоциации можно измерять с использованием любого способа, известного в этой области. Как правило, антитела по настоящему изобретению будут иметь равновесную константу диссоциации менее приблизительно  $10^{-7}$  или  $10^{-8}$  M, например, менее приблизительно  $10^{-9}$  M или  $10^{-10}$  M, в некоторых аспектах менее приблизительно  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M или  $10^{-13}$  M.

Термин "биодоступность" относится к системной доступности (т.е. уровням в крови/плазме) указанного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. Биодоступность является абсолютным термином, указывающим на измерение времени (скорости) и общего количества (меры) лекарственного средства, достигающего общего кровотока из вводимой лекарственной формы.

Как применяют в настоящем описании, фраза "по существу, состоящий из" относится к роду или виду активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также любым экспиентам, не являющимися активными в отношении целей способов или композиций. В некоторых аспектах фраза "по существу, состоящий из" прямо исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, иных, чем лекарственный коньюгат антитела по настоящему изобретению. В некоторых аспектах фраза "по существу, состоящий из" прямо исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, иных, чем лекарственный коньюгат антитела по настоящему изобретению и второе совместно вводимое средство.

Термин "аминокислота" относится к природным, синтетическим и неприродным аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функционирующими схожим с природными аминокислотами образом. Природные аминокислоты являются аминокислотами, кодируемыми генетическим кодом, а также аминокислотами, модифицированными позднее, например, гидроксипролину, γ-карбоксиглутаминовой кислоте и О-фосфосерину. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, имеющим ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. α-атом углерода, соединенный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфония. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остатки, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, имеющим структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но функционирующими схожим с природной аминокислоты образом.

Термин "консервативно модифицированный вариант" относится к аминокислотным последовательностям и последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, консервативно модифицированные варианты относятся к нуклеиновым кислотам, кодирующими идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или, в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, по существу, к идентичным последовательностям. По причине вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой указанный белок. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, кодон можно заменять любым из соответствующих описываемых кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", являющимися одним из видов консервативно модифицированных вариантов. С помощью каждой последовательности нуклеиновой кислоты в настоящем описании, кодирующей полипептид, также описывают каждый возможный молчщий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в этой области будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, как правило, являющегося единственным кодоном для метионина, и TGG, как правило, являющимся единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать для получения функционально идентичной молекулы. Таким образом, в каждой описываемой последовательности подразумевают каждый молчщий вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

В случае полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или вставки в полипептидной последовательности, приводящие к замене аминокислоты химически схожей аминокислотой. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в этой области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Следующие восемь групп включают аминокислоты, представляющие собой консервативные замены друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых аспектах, термин "консервативные модификации последовательности" используют в отношении модификаций аминокислот, не влияющие или не изменяющие значительно характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Как применяют в настоящем описании, термин "оптимизированный" относится к нуклеотидной последовательности, измененной так, что она кодирует аминокислотную последовательность с использованием кодонов, являющихся предпочтительными в продуцирующей клетке или организме, как правило, эукариотической клетке, например, дрожжевой клетке, клетка Pichia, грибковой клетке, клетке Trichodectma, клетке яичника китайского хомяка (CHO) или клетке человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют полностью или насколько возможно сохраняющей аминокислотную

последовательность, исходно кодируемую начальной нуклеотидной последовательностью, также известной как "родительская" последовательность.

Термины "процент идентичности" в отношении двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к степени, с которой схожи две или более последовательности или подпоследовательности. Две последовательности являются "идентичными", если они имеют одну последовательность аминокислот или нуклеотидов в сравниваемой области. Две последовательности являются "по существу, идентичными", если две последовательности имеют конкретную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, являющихся одинаковыми (т.е. 60% идентичности, необязательно, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности в конкретной области, или, если не указано, во всей последовательности) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измеряют с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивая вручную и визуальной оценки. Необязательно, идентичность существует в области, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов (или 10 аминокислот) в длину или более предпочтительно - в области, составляющей от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислоты) в длину.

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность служит референсной последовательностью, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательности, тестируемые и референсные последовательности вводят в компьютер, обозначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и задают параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или задавать альтернативные параметры. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательности вычисляют процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно референсной последовательности на основе параметров программы.

Как применяют в настоящем описании, "окно сравнения" включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранный из группы, состоящей из от 20 до 600 положений, как правило - от приблизительно 50 до приблизительно 200 положений, более типично - от приблизительно 100 до приблизительно 150 положений, в котором последовательность можно сравнивать с референсной последовательностью из того же количества смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в этой области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), с помощью алгоритма гомологического выравнивания по Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска схожести по Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерных воплощений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или выравнивания вручную и визуальной оценки (см., например, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и схожести последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описываемые в Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977 и Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990 соответственно. Программное обеспечение для анализа BLAST является общедоступным в National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм включает первоначальную идентификацию пар последовательностей с высокими баллами (HSP) посредством идентификации коротких слов длины W в последовательности запроса, соответствующих или удовлетворяющих некоторым пороговым баллам положительных значений T при выравнивании со словом той же длины из последовательности в базе данных. Т обозначают как порог баллов соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти исходные совпадения соседних слов служат начальным материалом для начальных поисков для обнаружения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько можно повышать кумулятивные баллы выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей кумулятивные баллы вычисляют с использованием параметров M (баллы выигрыша для пары совпадающих остатков; всегда  $> 0$ ) и N (баллы штрафа для несовпадающих остатков; всегда  $< 0$ ). В случае аминокислотных последовательностей для вычисления кумулятивных баллов используют матрицу замен. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращают, если кумулятивные баллы выравнивания снижаются на количество X от его максимального достигнутого количества; кумулятивные баллы становятся нулем или ниже по причине накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигают конца любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (в случае нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию используют длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используют длину слова 3, ожидание (E) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989), Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 89: 10915), выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

С помощью алгоритма BLAST также осуществляют статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Одной из мер сходства, получаемой с помощью алгоритма BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), представляющая собой указание на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет возникать случайно. Например, нукleinовую кислоту считают схожей с референсной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нукleinовой кислотой с референсной нукleinовой кислотой составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей также можно определять с использованием алгоритма по E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4: 1 1-17, 1988), включенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с использованием алгоритма по Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), включенного в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250, и веса пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо указанной выше процентной доли идентичности последовательностей, другим свидетельством о том, что две последовательности нукleinовой кислоты или полипептида являются, по существу, идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нукleinовой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами, индуцированными против полипептида, кодируемого второй нукleinовой кислотой, как описано ниже. Таким образом, как правило, полипептид является, по существу, идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим свидетельством того, что две последовательности нукleinовой кислоты являются, по существу, идентичными, является то, что две молекулы или комплементранные им молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Еще одним свидетельством о том, что две последовательности нукleinовой кислоты являются, по существу, идентичными, является то, что для амплификации последовательности можно использовать одни и те же праймеры.

В настоящем описании термин "нукleinовая кислота" используют взаимозаменямо с термином "полинуклеотид", и он относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин включает нукleinовые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи в осте, являющиеся синтетическими, природными и неприродными, имеющие свойства связывания, схожие с референсной нукleinовой кислотой, и метаболизирующиеся аналогично референсным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-0-метилрибонуклеотиды, пептид-нукleinовые кислоты (ПНК).

Если не указано иначе, конкретная последовательность нукleinовой кислоты также косвенно включает консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также конкретно указанную последовательность. Конкретно, как подробно описано ниже, можно осуществлять замены вырожденных кодонов, получая последовательности, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяют смешанными основаниями и/или дезоксинозиновыми остатками (Batzer et al. (1991), Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985), J. Biol. Chem. 260:2605-2608; и Rossolini et al. (1994), Mol. Cell. Probes 8:91-98).

Термин "функционально связанный" в отношении нукleinовых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, он относится к функциональной взаимосвязи регулирующей транскрипцию последовательности с транскрибуемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, промоторные регулирующие транскрипцию последовательности, функционально связанные с транскрибуемой последовательностью являются физически смежными с транскрибуемой последовательностью, т.е. они действуют в цис-положении. Однако, некоторые регулирующие транскрипцию последовательности, такие как энхансеры, не нуждаются в том, чтобы быть физически смежными или локализованными в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

В настоящем описании термины "полипептид" и "белок" используют взаимозаменямо в отношении полимера аминокислотных остатков. Термины относятся к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей природной аминокислоты, а также к природным полимерам аминокислот и неприродным полимерам аминокислот. Если не указано иначе, конкретная полипептидная последовательность также

косвенно включает ее консервативно модифицированные варианты.

Как применяют в настоящем описании термин "иммуноконъюгат" или "лекарственный конъюгат антитела" относится к связи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с другим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин, иммунотерапевтическое средство, зонд для визуализации и т.п. Связь может являться ковалентными связями или нековалентными взаимодействиями, такими как взаимодействия посредством электростатических сил. Для получения иммуноконъюгата можно использовать различные линкеры, известные в этой области. Кроме того, иммуноконъюгат можно получать в форме слитого белка, который можно экспрессировать с помощью полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат. Как применяют в настоящем описании, термин "сливный белок" относится к белкам, получаемых соединением двух или более генов или фрагментов генов, исходно кодирующих отдельные белки (включая пептиды и полипептиды). Трансляция слитого гена приводит к образованию единого белка с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков.

Термин "индивидуум" включает человека и не относящихся к человеку животных. Не относящиеся к человеку животные включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как низшие приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии и пресмыкающиеся. Если не указано иначе, в настоящем описании термины "пациент" или "индивидуум" используют взаимозаменяющими.

Как применяют в настоящем описании термин "токсин", "цитотоксин" или "цитотокическое средство" относится к любому средству, наносящему вред росту и пролиферации клеток, и которое может действовать, снижая, ингибируя или разрушая клетку или злокачественное новообразование.

Как применяют в настоящем описании, термин "противораковое средство" относится к любому средству, которое можно использовать для лечения нарушения пролиферации клеток, такое как злокачественное новообразование, включая, в качестве неограничивающих примеров, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и средства для лучевой терапии, направленные противораковые средства и иммунотерапевтические средства.

Как применяют в настоящем описании, термин "остаток лекарственного средства" или "полезная нагрузка" относится к химическому остатку, конъюгированному с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, и может включать любое терапевтическое или диагностическое средство, например, противораковое, противовоспалительное, противоинфекционное (например, противогрибковое, антибактериальное, антипаразитарное, противовирусное) или анестезирующее средство. В определенных аспектах остаток лекарственного средства выбран из ингибитора V-ATФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауринстата, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора протеасом, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR. Способы прикрепления каждого из них к линкеру, совместимому с антителами, и способ по настоящему изобретению известны в этой области. См., например, Singh et al. (2009), *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Кроме того, полезная нагрузка может являться биофизическим зондом, флуорофором, спиновой меткой, инфракрасным зондом, аффинным зондом, хелатирующем зондом, спектроскопическим зондом, радиоактивным зондом, молекулой липида, полиэтиленгликолем, полимером, спиновой меткой, ДНК, РНК, белком, пептидом, поверхностью, антителом, фрагментом антитела, наночастицей, квантовой точкой, липосомой, частицей PLGA, сахаридом или полисахаридом.

Термин "остаток лекарственного средства майтанзиноида" означает подструктуру конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющую структуру соединения майтанзиноида. Впервые майтанзин выделили из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Затем открыли, что некоторые микроорганизмы также производят майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры C-3-майтанзинола (патент США № 4151042). Сообщают о синтетическом майтанзиноле и аналогах майтанзинола. См. патенты США № 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533, и Kawai et al. (1984), *Chem. Pharm. Bull.* 34(1)-34(1), каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Конкретные примеры майтанзинолов, применяемых для конъюгации, включают DM1, DM3 и DM4.

Термин "опухоль" относится к неопластическому росту и пролиферации клеток, злокачественному или доброкачественному, и всем предраковым и злокачественным клеткам и тканям.

Термин "противоопухолевая активность" означает снижение скорости пролиферации опухолевых клеток, жизнеспособности или метастатической активности. Возможным способом демонстрации противоопухолевой активности является демонстрация снижения скорости роста опухолевых клеток, остановки роста размера опухоли или снижения размера опухоли. Такую активность можно оценивать с использованием общепринятых моделей опухолей *in vitro* или *in vivo*, включая, в качестве неограничивающих примеров, модели ксенотрансплантированных, модели аллотрансплантированных, модели ММТВ и другие модели, известные в этой области для исследования противоопухолевой активности.

Термин "злокачественное новообразование" относится к недоброкачественной опухоли или злокачественному новообразованию. Как применяют в настоящем описании, термин "злокачественное новообразование" включает злокачественное новообразование, отличающееся нерегулируемым или неконтролируемым ростом клеток. Примеры злокачественных новообразований включают карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы.

Термин "злокачественное новообразование" включает первичные злокачественные опухоли (например, те, клетки которых не мигрировали в участки организма индивидуума, иные, чем участок исходной опухоли) и вторичные злокачественные опухоли (например, возникающие при метастазировании, миграции опухолевых клеток во вторичные участки, отличающиеся от участка исходной опухоли).

Термин "сKIT" относится к тирозинкиназному рецептору, являющемуся членом семейства рецепторных тирозинкиназ III. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности сKIT известны и опубликованы под регистрационными номерами GenBank X06182.1, EU826594.1, GU983671.1, HM015525.1, HM015526.1, AK304031.1 и BC071593.1. См. также последовательность кДНК сKIT человека в SEQ ID NO: 1 и последовательность белка сKIT человека в SEQ ID NO: 2. Структурно рецептор сKIT является трансмембранным белком типа I, содержит сигнальный пептид, 5 Ig-подобных доменов C2 во внеклеточном домене, содержит протеинкиназный домен во внутриклеточном домене и по всей своей длине имеет по меньшей мере приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Структурно последовательность нуклеиновой кислоты сKIT по всей своей длине имеет по меньшей мере приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательность по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

Термины "сKIT-экспрессирующее злокачественное новообразование" или "сKIT-положительное злокачественное новообразование" относится к злокачественному новообразованию, экспрессирующему сKIT и/или мутантную форму сKIT на поверхности злокачественных клеток.

Как применяют в настоящем описании, термины "лечить" или "лечение" любого заболевания или нарушения в одном из аспектов относится к улучшению заболевания или нарушения (т.е. замедлению или остановке или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к облегчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут являться неочевидными для пациента. В еще одном аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к физической модуляции заболевания или нарушения (например, стабилизация очевидного симптома), физиологической модуляции (например, стабилизация физического симптома) или обеим. В еще одном аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к профилактике или задержке дебюта, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения.

Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяется относится к количеству, достаточному для получения желаемого результата (т.е. снижения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, профилактики метастазирования, ингибирования или профилактики вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекции). В некоторых аспектах терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательные побочные эффекты. Можно определять терапевтически приемлемое количество, сначала вводя низкую дозу, а затем постепенно повышая эту дозу до достижения желаемого эффекта. "Профилактически эффективная доза" и "терапевтически эффективная доза" молекул по настоящему изобретению может предотвращать дебют или приводить к снижению тяжести, соответственно, симптомов заболевания, включая симптомы, ассоциированные со злокачественным новообразованием.

Термин "совместно вводимый" относится к одновременному наличию двух активных средств в крови индивидуума. Активные средства, вводимые совместно, можно вводить одновременно или последовательно.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показана активность ADC сKIT-MCC-DM1 в субпопуляции линий злокачественных клеток.

На фиг. 2 показана активность 9P3-MCC-DM1, 9P3-SPDB-DM4 и 9P3-CX1-1-DM1 в субпопуляции линий злокачественных клеток.

На фиг. 3 показана активность 9P3-MCC-DM1 в панели линий клеток AML, GIST, меланомы и SCLC с различными уровнями экспрессии поверхностного рецептора сKIT.

На фиг. 4 показана способность ADC сKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток GIST-T1 (иматиниб-чувствительных).

На фиг. 5 показана способность ADC сKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток GIST430 (иматиниб-резистентных).

На фиг. 6 показана способность ADC сKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток NCI-H526 (SCLC с более высокой экспрессией сKIT).

На фиг. 7 показана способность ADC сKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток NCI-H1048 (SCLC с более низкой экспрессией сKIT).

На фиг. 8 показана способность ADC сcKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток CMK11-5 (AML с высокой экспрессией cKIT).

На фиг. 9 показана способность ADC сcKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток Uke-1 (AML с более низкой экспрессией cKIT).

Фиг. 10 представляет собой HDx-MS исходные данные, построенные в виде различий, скорректированных относительно стандартной ошибки измерений. Более отрицательное значение свидетельствует о большей защите от дейтериевого обмена после связывания 9Р3 с антигеном cKIT. Две наиболее значимые области защиты обозначены как область 1 и область 2.

На фиг. 11 показаны области защиты HDx-MS, картированные с использованием заполнения поверхности: область 1 (показана черным) и область 2 (показана темно-серым). Участки связывания SCF показаны как участок I (светло-серые сферы), участок II (средне-серые сферы) и участок III (более темные серые сферы).

Фиг. 12 представляет собой вестерн-блоттинг, демонстрирующий способность SCF, NEG085-MCC-DM1, NEG024-MCC-DM1 и 20376-MCC-DM1 модулировать фосфорилирование cKIT в клеточной линии Mo7e, экспрессирующей cKIT дикого типа (фиг. 12(A)), или в клеточной линии GIST-T1, экспрессирующей мутантный cKIT (фиг. 12(B)), через 15 мин.

На фиг. 13 показано, что Ab NEG085 и 20376 опосредуют быструю интернализацию поверхностного cKIT на клетках GIST-T1 (A) и на клетках костного мозга человека (B)

Фиг. 14 представляет собой вестерн-блоттинги, на которых показана способность SCF или NEG085-MCC-DM1 ускорять деградацию cKIT в клеточной линии GIST-T1, экспрессирующей мутантный cKIT (фиг. 14A), и клеточной линии NCI-H526, экспрессирующей cKIT дикого типа (фиг. 14B), с течением времени.

На фиг. 15 показана способность NEG085, NEG024, 20376, NEG085-MCC-DM1 ингибировать SCF-зависимую пролиферацию клеток Mo7e.

На фиг. 16 показана способность NEG085 и NEG085-MCC-DM1 ингибировать SCF-независимую пролиферацию клеток Mo7e.

На фиг. 17 показана оценка способности антител Campath (Ab против CD52), NEG085 или 20376 не индуцировать ADCC *in vitro* в клетках Uke-1.

На фиг. 18 показано, что NEG085 и 20376 не опосредуют первичный апоптоз тучных клеток человека.

На фиг. 19 показано, что NEG085 и 20376 не опосредуют первичную дегрануляцию тучных клеток человека.

На фиг. 20 показана колокализация IgG1 и митотический блок NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1.

На фиг. 21 показаны тканевые срезы с митотическим блоком (р-гистон H3) и апоптозом (каспаза 3) после однократной дозы ADC против cKIT.

На фиг. 22 графически представлена индукция митотического блока и апоптоза через 8 дней после однократной дозы ADC против cKIT.

На фиг. 23 показана (A) дозозависимая эффективность в ксенотрансплантате GIST T1 мыши и (B) изменение массы тела в течение лечения.

На фиг. 24 графически представлен (A) ELISA с антителами против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1 и (B) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1.

Фиг. 25 является таблицей дозозависимого эффекта NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши.

Фиг. 26 представляет собой гистологические срезы с дозозависимой эффективностью NEG027-MCC-DM1 в GIST T1. (A) представляет собой суммарные опухоли группы 4, (B) представляет собой суммарные опухоли группы 5.

На фиг. 27 показана (A) эффективность при дозе 0,625 мг/кг в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши, (B) изменение объема опухоли по сравнению с контролем (% T/C) и (C) изменение массы тела в течение лечения.

На фиг. 28 показана кластеризация в день 41 после введения однократной дозы ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши.

Фиг. 29 является таблицей эффективности ADC против cKIT при низкой эффективной дозе в модели ксенотрансплантата GIST T1.

На фиг. 30 показана (A) PK антитела против cKIT в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (левая панель представляет собой ELISA с антителами против DM1), (B) правая панель представляет собой ELISA с антителами против IgG1 человека.

На фиг. 31А-С показана (A) активность NEG085-MCC-DM1, NEG024MCC-DM1 и NEG086-MCC-DM1 в модели SCLC, (B) изменение массы тела в течение лечения, (C) экспрессия cKIT в образце опухоли.

Фиг. 32 является таблицей исследования эффективности ADC против cKIT в NCI-H1048 SCLC.

На фиг. 33А-В показан (А) дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC), (В) изменение массы тела в течение лечения.

Фиг. 34 является таблицей, в которой представлено исследование эффективности NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-1048 (SCLC) мыши.

На фиг. 35А-С показана (А) эффективность 20376 и NEG024 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLC) мыши, (В) концентрация антитела в сыворотке после введения дозы и (С) ИИС для cKIT, показавшая экспрессию уровней cKIT на опухоли H526.

На фиг. 36 показаны ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких (SCLC).

На фиг. 37 показана эффективность ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата AML (Kasumi-1).

На фиг. 38 показана эффективность ADC против cKIT в модель ксенотрансплантата мастоцитоза HMC-1 мыши.

На фиг. 39А/В показана эффективность перекрестно реагирующих с cKIT мыши 2 037 6-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши с (А) дозой и объемом опухоли и (В) изменением массы тела в течение лечения.

На фиг. 40А/В показана (А) эффективность перекрестно реагирующих с cKIT мыши 20376-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши-PK и (В) концентрация антитела в сыворотке после введения дозы.

На фиг. 41 показано исследование дозозависимой эффективности при GIST T1 у мышей SCID-beige.

На фиг. 42А/В показана (А) эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (отсутствие эффективности неконъюгированного антитела) и (В) изменение массы тела в течение лечения.

Фиг. 43 представляет собой сравнение эффективности в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (немеченое/MCC-DM1/SPDB-DM4).

На фиг. 44А/В показана (А) эффективность в модели ксенотрансплантата GIST 430 со сравнением SPDB-DM4 и MCC-DM1 и (В) изменение массы тела в течение лечения.

На фиг. 45 показана эффективность в модели GIST 430 у мышей SCID-beige.

Фиг. 46 представляет собой фотографии иммуноокрашивания р-гистона H3 после обработки NEG085-MCC-DM1.

Фиг. 47 представляет собой график митотического блока, показанного посредством окрашивания р-гистона H3 после введения NEG085-MCC-DM1.

На фиг. 48А показано окрашивание на cKIT опухоли GIST T1, на фиг. 48В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1, на фиг. 48С показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фиг. 49А показано окрашивание на cKIT опухоли GIST 430, на фиг. 49В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST 430, на фиг. 49С показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фиг. 50А показано окрашивание cKIT опухоли NCI-H526 (мелкоклеточного рака легких (SCLC)), на фиг. 50В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526, на фиг. 50С показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фиг. 51А показано количество IgG1 после введения дозы NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526, фиг. 51В представляет собой график ELISA с антителами против DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 после введения дозы NEG085-MCC-DM1.

Фиг. 52А представляет собой график, на котором показана эффективность NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата первичного AML мыши, на фиг. 52В показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

Фиг. 53 представляет собой изображение кристаллической структуры Fab NEG085 в комплексе с доменами 1 и 2 cKIT. Тяжелые цепи Fab показаны темно-серым, легкие цепи Fab показаны белым и домены cKIT показаны светло-серым. Эпитопы и паратопы показаны черным.

#### **Подробное описание**

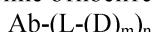
Настоящее изобретение относится к антителам, фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам) и лекарственным конъюгатам антител, связывающимся с cKIT. В частности, настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с cKIT и интернализующимся после такого связывания. Антитела и фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению можно применять для получения лекарственных конъюгатов антител. Кроме того, настоящее изобретение относится к лекарственным конъюгатам антител, имеющим желаемые фармакокинетические характеристики и другие желаемые свойства, и, таким образом, их можно применять для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего cKIT, в качестве неограничивающих примеров: гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, туч-

ноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим лекарственные конъюгаты антител, и способам получения и применения таких фармацевтических композиций для лечения злокачественного новообразования.

Лекарственные конъюгаты антител.

Настоящее изобретение относится к лекарственным конъюгатам антител, в которых антитело, антигенсвязывающий фрагмент или его функциональный эквивалент, специфически связывающийся с сcKIT, соединяют с остатком лекарственного средства. В одном из аспектов антитела, антигенсвязывающие фрагменты или их функциональные эквиваленты соединяют посредством ковалентного присоединения с помощью линкера с остатком лекарственного средства, являющегося противораковым средством. С помощью лекарственных конъюгатов антител можно избирательно доставлять эффективную дозу противоракового средства (например, цитотоксического средства) в опухолевые ткани, экспрессирующие сcKIT, посредством чего можно достигать большей селективности (и более низкой эффективной дозы).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату формулы (I):



где Ab представляет сcKIT-связывающее антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), представленный в настоящем описании;

L является линкером;

D является остатком лекарственного средства;

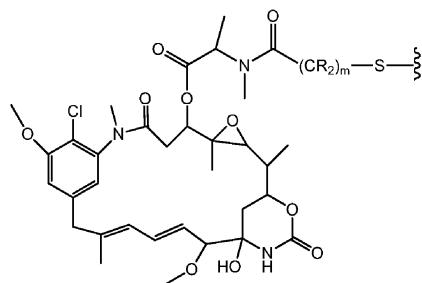
m является целым числом от 1 до 8 и

n является целым числом от 1 до 20.

В одном из аспектов n является целым числом от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 5. В конкретном аспекте n составляет от 3 до 4. В некоторых аспектах m представляет собой 1. В некоторых аспектах m представляет собой 2, 3 или 4.

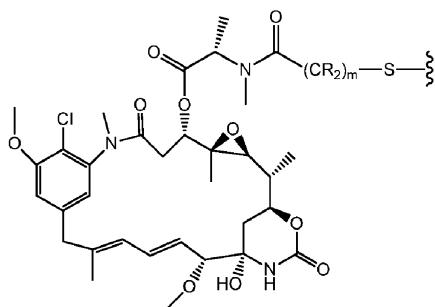
Хотя соотношение лекарственного средства и антитела имеет конкретное целое значение для конкретной молекулы конъюгата (например, n, умноженное на m, в формуле (I)), следует понимать, что значение часто будет являться средним значением при использовании для описания образца, содержащего множество молекул, по причине некоторой степени неоднородности, как правило, ассоциированной с этапом конъюгации. В настоящем описании среднюю нагрузку для образца иммуноконъюгата обозначают как соотношение лекарственного средства и антитела или "DAR." В случае майтанзиноидов его можно обозначать как соотношение майтанзиноида и антитела или "MAR". В некоторых аспектах DAR составляет от приблизительно 1 до приблизительно 5 и, как правило, составляет приблизительно 3, 3,5, 4, 4,5 или 5. В некоторых аспектах по меньшей мере 50% образца по массе составляет соединение, имеющее среднее  $\text{DAR} \pm 2$ , и предпочтительно - по меньшей мере 50% образца составляет конъюгат, имеющий среднее  $\text{DAR} \pm 1$ . Другие аспекты включают иммуноконъюгаты, где DAR составляет приблизительно 3,5. В некоторых аспектах DAR "приблизительно n" означает, что измеряемое значение DAR составляет в пределах 20% n.

Настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и их функциональный эквиваленты, представленные в настоящем описании, соединенные или конъюгированные с остатком лекарственного средства. В одном из аспектов остаток лекарственного средства D является остатком лекарственного средства майтанзиноида, включая имеющее структуру:

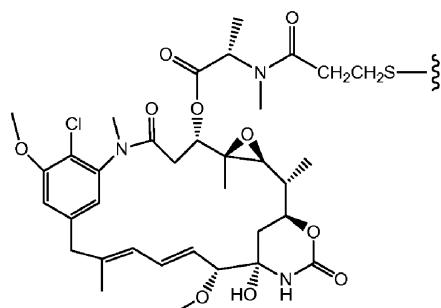


где волнистой линией указано ковалентное соединение атома серы майтанзиноида с линкером лекарственного конъюгата антитела. В каждом случае R независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил. Алкиленовая цепь, прикрепляющая амидную группу к атому серы, может являться метанилом, этанилом или пропанилом, т.е. m представляет собой 1, 2 или 3 (патент США № 633410, патент США № 5208020, Chari et al. (1992), Cancer Res. 52; 127-131, Lui et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623).

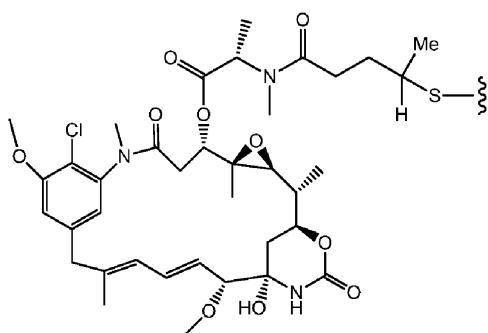
В описываемые иммуноконъюгаты включены все стереоизомеры остатка лекарственного средства майтанзиноида, т.е. любая комбинация конфигураций R и S в хиральных атомах углерода майтанзиноида. В одном из аспектов остаток лекарственного средства майтанзиноида имеет следующую стереохимию.



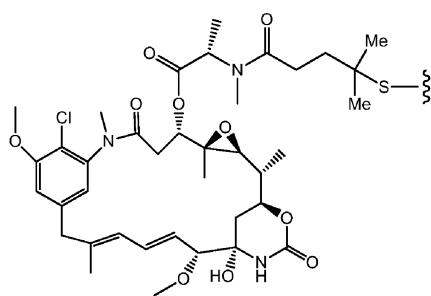
В одном из аспектов остатком лекарственного средства майтанзиноида является N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин (также известный как DM1). DM1 представлен следующей структурной формулой.

**DM1**

В другом аспекте остатком лекарственного средства майтанзиноида является N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (также известный как DM3). DM3 представлен следующей структурной формулой.

**DM3**

В другом аспекте остатком лекарственного средства майтанзиноида является N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (также известный как DM4). DM4 представлен следующей структурной формулой.

**DM4**

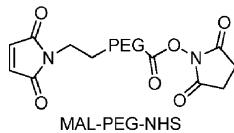
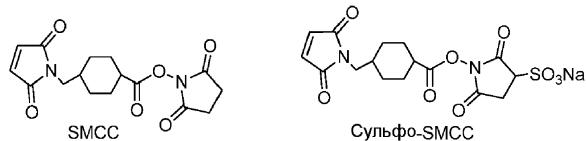
Остаток лекарственного средства D можно соединять с антителом посредством линкера L. L является любым химическим веществом, способным соединять антитело Ab с остатком лекарственного средства D. С помощью линкера L присоединяют антитело Ab к лекарственному средству D посредством ковалентных связей. Линкерный реагент является бифункциональным или многофункциональным остатком, который можно использовать для соединения остатка лекарственного средства D и антитела Ab для получения лекарственных конъюгатов антител. Лекарственные конъюгаты антител можно получать с использованием линкера, имеющего реакционную способность для связывания с остатком лекарственного средства D и антителом Ab. Цистеин, тиол или амин, например, N-конец или боковая цепь аминокис-

лоты, такой как лизин, антитела, может образовывать связь с функциональной группой линкерного реагента.

В одном из аспектов L является расщепляемым линкером. В другом аспекте L является нерасщепляемым линкером. В некоторых аспектах L является кислотонеустойчивым линкером, фотолабильным линкером, линкером, расщепляемым пептидазами, линкером, расщепляемым эстеразами, линкер с восстановляемой дисульфидной связью, гидрофильным линкером, заряженным линкером или линкером на основе дикарбоновой кислоты.

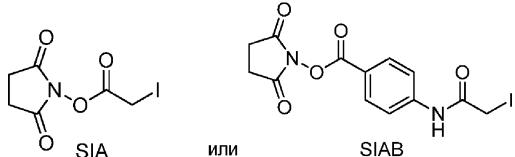
Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие нерасщепляемый линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, хорошо известны в этой области и могут образовывать нерасщепляемые линкеры, содержащие атом серы (такие как SMCC) или не содержащие атом серы. Предпочтительные перекрестносшивающие реагенты, образующие нерасщепляемые линкеры между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, содержат остатки на основе малеинимида или галогенацетила. В соответствии с настоящим изобретением считаю, что такие нерасщепляемые линкеры получают из остатков на основе малеинимида или галогенацетила.

Перекрестносшивающие реагенты, содержащие остаток на основе малеинимида, включают, в качестве неограничивающих примеров, N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), являющийся "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), N-сукцинимидиловый сложный эфир κ-малеинимидоундекановой кислоты (KMUA), N-сукцинимидиловый сложный эфир γ-малеинимидомасляной кислоты (GMBS), N-сукцинимидиловый сложный эфир Е-малеинимидокапроновой кислоты (EMCS), т-малеинимидобензоил-N-гидрокисусукцинимид сложный эфир (MBS), N-(α-малеинимидоацетокси)сукцинимидный сложный эфир (AMSA), сукцинимидил-6-(Р-малеинимидопропионамило)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил-4-(Р-малеинимидофенил)бутират (SMPB), N-(Р-малеинимидофенил)изоцианат (PMIP) и перекрестносшивающие реагенты на основе малеинимида, содержащие полиэтиленгликолевый спейсер, такие как MAL-PEG-NHS. Эти перекрестносшивающие реагенты образуют нерасщепляемые линкеры, полученные из остатков на основе малеинимида. Типичные структуры перекрестносшивающие реагенты на основе малеинимида представлены ниже.



В другом аспекте линкер L получают из N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (сульфо-SMCC) или MAL-PEG-NHS.

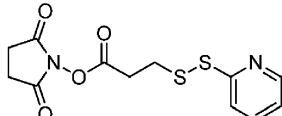
Перекрестносшивающие реагенты, содержащие остаток на основе галогенацетила, включают N-сукцинимидилодоацетат (SIA), N-сукцинимидил(4-йodoацетил)аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил бромоацетат (SBA) и N-сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP). Эти перекрестносшивающие реагенты образуют нерасщепляемый линкер, получаемый из остатков на основе галогенацетила. Типичные структуры перекрестносшивающих реагентов на основе галогенацетила представлены ниже.



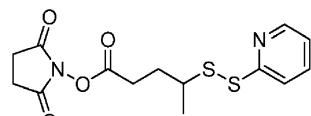
В одном из аспектов линкер L получают из N-сукцинимидилодоацетата (SIA) или N-сукцинимидил(4-йodoацетил)аминобензоата (SIAB).

Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие расщепляемый линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, хорошо известны в этой области. Линкеры, содержащие дисульфидные связи, являются линкерами, расщепляемые посредством дисульфидного обмена, который может происходить в физиологических условиях. По настоящему изо-

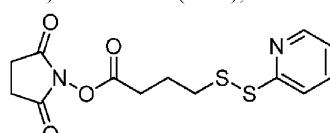
бретению считают, что такие расщепляемые линкеры получают из остатков на основе дисульфида. Подходящие дисульфидные перекрестносшивающие реагенты включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)бутаноат (SPDB) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), структуры которых представлены ниже. Эти дисульфидные перекрестносшивающие реагенты образуют расщепляемые линкеры, получаемые из остатков на основе дисульфида.



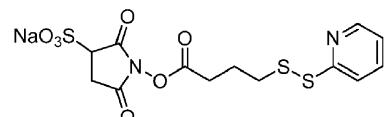
N-сукцинимидил-3-(2-пиридилилдитио)пропионат (SPDP),



N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)пентаноат (SPP),



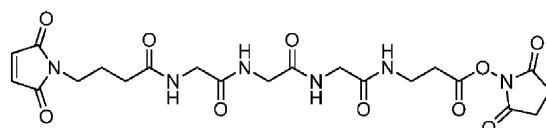
N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)бутаноат (SPDB) и



N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB).

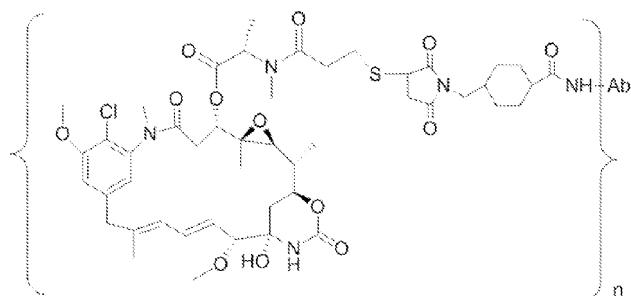
В одном из аспектов линкер L получают из N-сукцинимидил-4-(2-пиридилилдитио)бутаноата (SPDB).

Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие заряженный линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанизиноидом, и антителом Ab, известны как заряженные перекрестносшивающие реагенты. В одном из аспектов линкер L получают из заряженного перекрестносшивающего реагента, являющегося CX1-1. Структура CX1-1 представлена ниже.

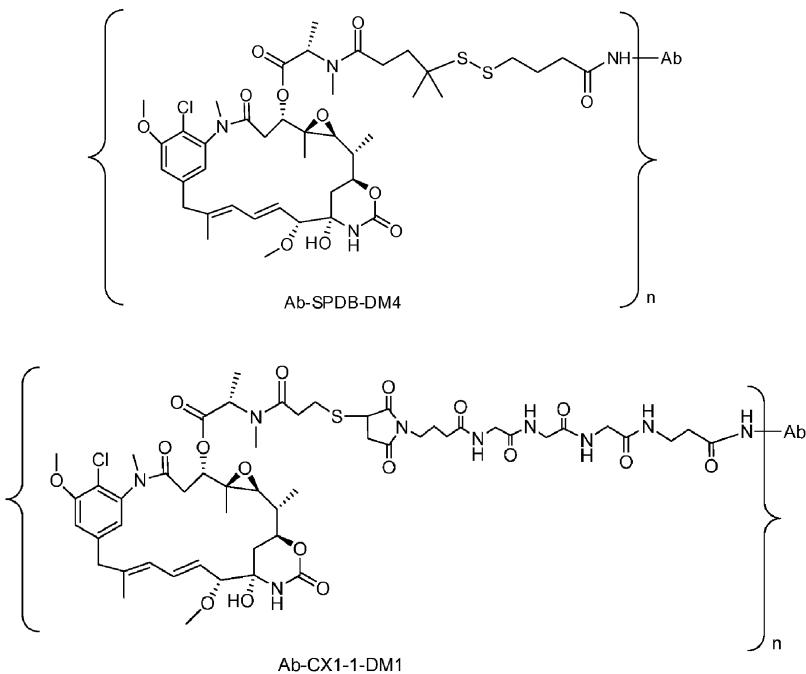


2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагаптадекан-1-оат (CX1-1).

В одном из аспектов настоящего изобретения коньюгат представлен любой из следующих структурных формул:



Ab-MCC-DM1



где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с сKIT человека;

n, указывающее на количество групп D-L, прикрепленных к Ab посредством образования амидной связи с первичным амином Ab, является целым числом от 1 до 20. В одном из аспектов n является целым числом от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 5. В конкретном аспекте n является 3 или 4.

В одном из аспектов среднее молярное соотношение лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и антитела в конъюгате (т.е. среднее значение w, также известное как соотношение майтанозида и антитела (MAR)) составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0 или 8,1), от приблизительно 2,5 до приблизительно 7, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 2,5 до приблизительно 4,5 (например, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9, приблизительно 4,0, приблизительно 4,1, приблизительно 4,2, приблизительно 4,3, приблизительно 4,4, приблизительно 4,5), от приблизительно 3,0 до приблизительно 4,0, от приблизительно 3,2 до приблизительно 4,2 или от приблизительно 4,5 до 5,5 (например, приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4 или приблизительно 5,5).

В одном из аспектов настоящего изобретения конъюгат, по существу, имеет высокую чистоту и обладает одним или несколькими из следующих свойств (a) более приблизительно 90% (например, более или равно приблизительно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%), предпочтительно более приблизительно 95% молекул конъюгата являются мономерными, (b) уровень неконъюгированного линкера в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 10% (например, менее или равно приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%) (относительно общего линкера), (c) менее 10% молекул конъюгата являются перекрестношитыми (например, менее или равно приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%), (d) уровень свободного лекарственное средство (например, DM1 или DM4) в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 2% (например, менее или равно приблизительно 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 или 0%) (моль/моль относительно общего цитотоксического средства).

Как применяют в настоящем описании, термин "неконъюгированный линкер" относится к антителу, ковалентно связанному с линкером, полученным из перекрестношивающего реагента (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1), где антитело не является ковалентно соединенным с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) посредством линкера (т.е. "неконъюгированный линкер" может представлять собой Ab-SMCC, Ab-SPDB или Ab-CX1-1).

#### 1. Остаток лекарственного средства.

Настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, специфически связывающимся с сKIT. Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат антитела против сKIT, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты, конъюгированные с

остатком лекарственного средства, например, противораковым средством, средством против гематологических нарушений, средством для лечения аутоиммунных заболеваний, противовоспалительным средством, противогрибковым средством, антибактериальным средством, антипаразитарным средством, противовирусным средством или анестезирующими средством. Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты можно конъюгировать с несколькими идентичными или разными остатками лекарственных средств с использованием любых известных в этой области способов.

В определенных аспектах остаток лекарственного средства в иммуноконъюгатах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из ингибитора V-АТФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bc12, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауростатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

В одном из аспектов остаток лекарственного средства в иммуноконъюгатах по настоящему изобретению является остатком лекарственного средства майтанзиноида, такого как, в качестве неограничивающих примеров, DM1, DM3 или DM4.

Кроме того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению можно конъюгировать с остатком лекарственного средства, модифицирующего указанный биологический ответ. Остатки лекарственных средств нельзя истолковывать как ограниченные классическими химиотерапевтическими средствами. Например, остаток лекарственного средства может являться белком, пептидом или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью, такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин A, экзотоксин Pseudomonas, холерный токсин или дифтерийный токсин, белок, такой как фактор некроза опухоли,  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, тканевый активатор плазминогена, цитокин, апоптотическое средство, антиангиогенным средством или модifikатор биологического ответа, таким как, например, лимфокин.

В одном из аспектов, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгируют с остатком лекарственного средства, такого как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Примеры цитотоксина включают, в качестве неограничивающих примеров, таксаны (см., например, международные патентные заявки (PCT) № WO 01/38318 и PCT/US03/02675), ДНК-алкилирующие средства (например, аналоги СС-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармицина, ауростатин E, ауростатин F, майтанзиноиды и цитотоксические средства, содержащие реактивный остаток полиэтиленгликоля (см., например, Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco et al., Blood 2003 15; 102(4): 1458-65), патенты США № 5475092, 6340701, 6372738 и 6436931, публикацию патентной заявки США № 2001/0036923 A1, рассматриваемые патентные заявки США № 10/024290 и 10/116053 и международную патентную заявку (PCT) № WO 01/49698), таксон, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этогозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантракинлон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюокортикоиды, прокайн, тетракайн, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитаребин, 5-фторурацил декарбазин), аблирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманинит, стрептозотоцин, митомицин C, и цисдихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин, антрациклины (например, даунорубицин (ранее известный как дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее известный как актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин) (См. например, Seattle Genetics US20090304721).

Другие примеры цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителами, фрагментами антител (антигенсвязывающими фрагментами) или функциональными эквивалентами по настоящему изобретению, включают дуокармицины, калихимицины, майтанзины и ауростатины и их производные.

Различные типы цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических средств с антителами известны в этой области, см., например, Saito et al. (2003), Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al. (2003), Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003), Cancer Cell 3:207-212; Allen (2002), Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kretzman (2002), Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer (2001), Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом для

получения цитотоксических радиофармацевтических средств, обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для диагностического или терапевтического применения включают, в качестве неограничивающих примеров, йод-131, индий-111, иттрий-90 и лютений-177. Способы получения радиоиммуноконъюгатов известны в этой области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, включая Zevalin™ (IDEA Pharmaceuticals) и Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и можно использовать аналогичные способы для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител, представленных в настоящем описании. В определенных аспектах макроциклическим хелатирующим средством является 1,4,7, 10-тетреазициклододекан-N,N',N'',N'''-тетракускусная кислота (DOTA), которую можно прикреплять к антителу с помощью линкерной молекулы. Такие линкерные молекулы общезвестны в этой области и описаны в Denardo et al. (1998), Clin Cancer Res. 4 (10):2483-90; Peterson et al. (1999), Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; и Zimmerman et al. (1999), Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно, с полипептидом по меньшей мере из 10, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 30, по меньшей мере из 40, по меньшей мере из 50, по меньшей мере из 60, по меньшей мере из 70, по меньшей мере из 80, по меньшей мере из 90 или по меньшей мере из 100 аминокислот) для получения слитых белков. В частности, настоящее изобретение относится к сливным белкам, содержащим фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), представленный в настоящем описании (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)-2-фрагмент, домен VH, CDR VH, домен VL или CDR VL) и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

Дополнительные сливные белки можно получать способами перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (в совокупности обозначаемых как "ДНК-перетасовка")- ДНК-перетасовку можно осуществлять для изменения активностей антител по настоящему изобретению или их фрагментов (например, антитела или их фрагментов с более высокими аффинностями и более низкими скоростями диссоциации). В общем, см. патенты США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al. (1997), Curr. Opinon Biotechnol. 8:724-33; Harayama (1998), Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al. (1999), J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco (1998). Biotechniques 24(2):308-313 (таким образом, каждый из этих патентов и публикаций включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять, подвергая случайному мутагенезу с помощью ПЦР пониженней точности, инсерции случайных нуклеотидов или других способов до рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, специфически связывающийся с антигеном, можно подвергать рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. из одной или нескольких гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению можно конъюгировать с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных аспектах маркерная аминокислотная последовательность является гекса-гистидиновым пептидом, таким как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, например, гекса-гистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают в качестве неограничивающих примеров, гемагглютининовую ("HA") метку, соответствующую эпигопту, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al. (1984), Cell 37:767), и метку "FLAG" (A. Einhauer et al., J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001). Как представлено в настоящем описании, антитела или антигенсвязывающие фрагменты также можно конъюгировать с пептидами, проникающими в опухоль, для повышения их эффективности.

В других аспектах антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгируют с диагностическим или детектируемым средством. Такие иммуноконъюгаты могут быть применимы для мониторинга или прогнозирования дебюта, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или нарушения, как часть способа клинического тестирования, такого как определение эффективности конкретной терапии. Такую диагностику и определение можно осуществлять, соединяя антитело с детектируемыми веществами, включая, в качестве неограничивающих примеров, различные ферменты, в качестве неограничивающих примеров, такие как, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстаза; простетические группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, умбеллиферон, флуо-

ресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, люминон, биолюминесцентные материалы, такие как, в качестве неограничивающих примеров, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, йод ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  и  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), серу ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^{3}\text{H}$ ), индий ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$  и  $^{111}\text{In}$ ), технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ), таллий ( $^{201}\text{Tl}$ ), галлий ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), палладий ( $^{103}\text{Pd}$ ), молибден ( $^{99}\text{Mo}$ ), ксенон ( $^{133}\text{Xe}$ ), фтор ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{113}\text{Sn}$  и  $^{117}\text{Sn}$ ; и позитрон-эмиттирующие металлы с использованием различных способов позитрон-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению можно прикреплять к твердым подложкам, особенно подходящим для иммунологических анализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают, в качестве неограничивающих примеров, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

## 2. Линкер.

Как применяют в настоящем описании, "линкер" является любым химическим веществом, способным связывать антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональный эквивалент с другим остатком, таким как остаток лекарственного средства. Линкеры могут являться восприимчивыми к расщеплению (расщепляемый линкер), такому как, вызываемое кислотами расщепление, фото-индуцируемое расщепление, вызываемое пептидазами расщепление, вызываемое эстеразами расщепление и расщепление дисульфидной связи, в условиях, в которых соединение или антитело остается активным. Альтернативно, линкеры могут являться, по существу, устойчивыми к расщеплению (например, стабильный линкер или нерасщепляемый линкер). В некоторых аспектах, линкер является заряженным линкером, гидрофильным линкером или линкером на основе дикарбоновой кислоты.

В одном из аспектов используемый линкер получают из перекрестносшивавшего реагента, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридинилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридинилдитио) бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилдоацетат (SIA), N-сукцинимидил(4-йдоацетил)амиnobензоат (SIAB), малеинимид-PEG NHS, N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил 17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1). В другом аспекте используемый линкер получают из сшивающего средства, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4, 7, 10, 13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1).

Нерасщепляемые линкеры являются любым химическим веществом, способным связывать лекарственное средство, такое как майтанзинойд, с антителом стабильным, ковалентным образом и не поддающимся под категорию, указанные выше для расщепляемых линкером. Таким образом, нерасщепляемые линкеры являются, по существу, устойчивыми к вызываемому кислотами расщеплению, фото-индуцируемому расщеплению, вызываемому пептидазами расщеплению, вызываемому эстеразами расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Кроме того, термин "нерасщепляемый" относится к способности химической связи в линкере или смежной с линкером быть устойчивой к кислоте, фотолабильному расщепляющему средству, пептидазе, эстеразе или химическому или физиологическому соединению, расщепляющему дисульфидную связь, в условиях, в которых лекарственное средство, такое как майтазонид, или антитело не теряет свою активность.

Кислото-лабильные линкеры являются линкерами, расщепляемыми при кислом pH. Например, конкретные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют кислый pH (pH 4-5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислото-лабильных линкеров.

Фотолабильные линкеры являются линкерами, применимыми на поверхности тела и во многих полостях тела, доступных для света. Кроме того, инфракрасное излучение может проникать в ткань.

Некоторые линкеры могут расщепляться пептидазами, т.е. расщепляемые пептидазами линкеры. Только конкретные пептиды легко расщепляются внутри или снаружи клеток, см., например, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) и Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Кроме того, пептиды состоят из  $\alpha$ -аминокислот и пептидных связей, химически представляющих собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Следует понимать, что другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, не являются пептидными связями, и их считают нерасщепляемыми.

Некоторые линкеры могут расщепляться эстеразами, т.е. расщепляемые эстеразами линкеры. И снова, только конкретные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами, присутствующими снаружи и внутри клеток. Сложные эфиры образуются посредством конденсации карбоновой кислоты и спиртов. Простые сложные эфиры являются сложными эфирами, получаемыми с использованием простых спиртов, таких как алифатические спирты, и небольших циклических и небольших ароматических спиртов.

Заряженные линкеры получают из заряженных перекрестносшивающих реагентов, сохраняющих свой заряд после включения в лекарственный конъюгат антитела. Примеры заряженных линкеров можно найти в US 2009/0274713.

### 3. Конъюгация и получение ADC.

Конъюгаты по настоящему изобретению можно получать любыми известными в этой области способами, такими как описываемые в патентах США № 7811572, 6411163, 7368565 и 8163888 и публикациях патентных заявок США № 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 и 2012/0259100. Полное содержание этих патентов и публикаций патентных заявок включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### Одноэтапный способ.

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать одноэтапным способом. Способ включает комбинирование антитела, лекарственного средства и сшивающего средства в, по существу, водной среде, необязательно, содержащей один или несколько сорасторовителей, при подходящем pH. В одном из аспектов способ включает этап приведения антитела по настоящему изобретению в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство, а затем приведение первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство, в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции.

В одном из аспектов одноэтапный способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 6 или выше (например, от приблизительно 6 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 7, от приблизительно 7 до приблизительно 9, от приблизительно 7 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,0, от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,0 или от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,0). Например, способ включает приведение связывающегося с клетками средства в контакт с лекарственным средством (DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9, приблизительно 8,0, приблизительно 8,1, приблизительно 8,2, приблизительно 8,3, приблизительно 8,4, приблизительно 8,5, приблизительно 8,6, приблизительно 8,7, приблизительно 8,8, приблизительно 8,9 или приблизительно 9,0. В другом аспекте способ включает приведение связывающегося с клетками средства в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 7,8 (например, pH от 7,6 до 8,0 или pH от 7,7 до 7,9).

Одноэтапный способ (т.е. приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1)) можно осуществлять при любой подходящей температуре, известной в этой области. Например, одноэтапный способ можно осуществлять при температуре от приблизительно 20°C или менее (например, приблизительно -10°C (при условии, что предотвращают замерзание раствора, например, посредством включения органического растворителя, используемого для растворения цитотоксического средства и бифункционального перекрестносшивающего реагента) до приблизительно 20°C, от приблизительно 0 до приблизительно 18°C, от приблизительно 4 до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20 до приблизительно 30°C или от приблизительно 20 до приблизительно 25°C) или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30 до приблизительно 37°C). В одном из аспектов одноэтапный способ осуществляют при температуре от приблизительно 16 до приблизительно 24°C (например, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C или приблизительно 25°C). В другом аспекте одноэтапный способ осуществляют при температуре приблизительно 15°C или менее (например, от приблизительно -10 до приблизительно 15°C или от приблизительно 0 до приблизительно 15°C). Например, способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) при температуре

приблизительно 15°C, приблизительно 14°C, приблизительно 13°C, приблизительно 12°C, приблизительно 11°C, приблизительно 10°C, приблизительно 9°C, приблизительно 8°C, приблизительно 7°C, приблизительно 6°C, приблизительно 5°C, приблизительно 4°C, приблизительно 3°C, приблизительно 2°C, приблизительно 1°C, приблизительно 0°C, приблизительно -1°C, приблизительно -2°C, приблизительно -3°C, приблизительно -4°C, приблизительно -5°C, приблизительно -6°C, приблизительно -7°C, приблизительно -8°C, приблизительно -9°C или приблизительно -10°C, при условии, что предотвращают замерзание раствора, например, посредством включения органических растворителей, используемых для растворения сшивающего средства (например, SMCC, сульфо-SMCC, сульфо-SPDB SPDB или CX1-1). В одном из аспектов способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) при температуре от приблизительно -10 до приблизительно 15°C, от приблизительно 0 до приблизительно 15°C, от приблизительно 0 до приблизительно 10°C, от приблизительно 0 до приблизительно 5°C, от приблизительно 5 до приблизительно 15°C, от приблизительно 10 до приблизительно 15°C или от приблизительно 5 до приблизительно 10°C. В другом аспекте способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) при температуре приблизительно 10°C (например, температуре от 8 до 12°C или температуре от 9 до 11°C).

В одном из аспектов описываемое выше приведение в контакт осуществляют, получая антитело, затем приводя антитело в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), а затем приводя первую смесь, содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Например, в одном из аспектов антитело помещают в сосуд для проведения реакции, в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) (таким образом, приводя антитело в контакт), а затем к смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), добавляют сшивающее средство (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) (таким образом, приводя смесь, содержащую антитело и лекарственное средство, в контакт). В одном из аспектов, антитело помещают в сосуд для проведения реакции, и в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) непосредственно после помещения антитела в сосуд. В другом аспекте антитело помещают в сосуд для проведения реакции, и в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) через временной интервал после помещения антитела в сосуд (например, через приблизительно 5 мин, приблизительно 10 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 40 мин, приблизительно 50 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 1 день или более после помещения связывающего клетки средства внутрь сосуда). Лекарственное средство (например, DM1 или DM4) можно добавлять быстро (т.е. в пределах короткого временного интервала, такого как приблизительно 5 мин, приблизительно 10 мин) или медленно (например, с использованием насоса).

Затем смесь, содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), можно приводить в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) непосредственно после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) или некоторый более поздний момент времени (например, от приблизительно 5 мин до приблизительно 8 ч или более) после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4). Например, в одном из аспектов сшивающее средство (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) добавляют к смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), непосредственно после добавления лекарственного средства (например, DM1 или DM4) в сосуд для проведения реакции, содержащий антитело. Альтернативно, смесь, содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), можно приводить в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) через приблизительно 5 мин, приблизительно 10 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч или более после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4). После приведения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) реакции позволяют происходить в течение приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 11 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 13 ч, приблизительно 14 ч, приблизительно 15 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 17 ч, приблизительно 18 ч, приблизительно 19 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 21 ч, приблизительно 22 ч, приблизительно 23 ч, приблизительно 24 ч или более (например, приблизительно 30 ч, приблизительно 35 ч, приблизительно 40 ч, приблизительно 45 ч или приблизительно 48 ч).

В одном из аспектов одноэтапный способ дополнительно включает этап тушения любого непрореагировавшего лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и/или непрореагировавшего сшивающего средства (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Как правило, этап тушения осуществляют до очистки конъюгата. В одном из аспектов смесь подвергают тушению посредством приведения смеси в контакт с тушащим реагентом. Как применяют в настоящем описании, термин "тушащий реагент" относится к реагенту, реагирующему со свободным лекарственным средством (например, DM1 или DM4) и/или сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). В одном из аспектов для обеспечения того, что любую непрореагировавшую группу (такую как тиол) в лекарственном средстве (например, DM1 или DM4) подвергают тушению, можно использовать тушащие реагенты малеинимид или галогенацетамид, такие как 4-малеинимидомасляная кислота, 3-малеинимидопропионовая кислота, N-этилмалеинимид, йодацетамид или йодацетамидопропионовая кислота. Этап тушения может помогать предотвращать димеризацию лекарственного средства (например, DM1). Димеризованный DM1 может быть трудно удалить. После тушения полярными, заряженными тиол-тушащими реагентами (такими как 4-малеинимидомасляная кислота или 3-малеинимидопропионовая кислота), избыток непрореагировавший DM1, превращается в полярный, заряженный, водорастворимый аддукт, который можно легко отделять от ковалентно-связанного конъюгата на этапе очистки. Также можно использовать тушение неполярными инейтральными тиол-тушащими реагентами. В одном из аспектов смесь подвергают тушению, приводя ее в контакт с тушащим реагентом, реагирующим с непрореагировавшим сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Например, для тушения любого непрореагировавшего SMCC в смесь можно добавлять нуклеофилы. Предпочтительно нуклеофил является амино-группой, содержащей нуклеофил, такой как лизин, таурин и гидроксиламин.

В другом аспекте реакции (т.е. приведению антитело в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1)) позволяют происходить до завершения перед приведением смеси в контакт с тушащим реагентом. В связи с этим, тушащий реагент добавляют в смесь через от приблизительно 1 ч до приблизительно 48 ч (например, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 11 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 13 ч, приблизительно 14 ч, приблизительно 15 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 17 ч, приблизительно 18 ч, приблизительно 19 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 21 ч, приблизительно 22 ч, приблизительно 23 ч, приблизительно 24 ч или приблизительно 25 ч до приблизительно 48 ч) после приведения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1).

Альтернативно, смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до приблизительно 5,0 (например, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 или 5,2). В другом аспекте смесь подвергают тушению, понижая pH до менее 6,0, менее 5,5, менее 5,0, менее 4,8, менее 4,6, менее 4,4, менее 4,2, менее 4,0. Альтернативно, pH понижают до от приблизительно 4,0 (например, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 или 4,2) до приблизительно 6,0 (например, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2), от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,5 (например, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 или 4,7) до приблизительно 5,0. В одном из аспектов смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до 4,8. В другом аспекте смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до 5,5.

В одном из аспектов одноэтапный способ дополнительно включает этап выдержки для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из антитела. Этап выдержки включает выдержку смеси перед очисткой конъюгата (например, после этапа реакции, между этапом реакции и этапом тушения или после этапа тушения). Например, способ включает (a) приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4); а затем приведение смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции, (b) выдержку смеси, полученной на этапе (a), для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из связывающегося с клетками средства, и (c) очистку смеси для получения очищенного конъюгата.

В другом аспекте способ включает (a) приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4); а затем приведение смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат, (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции, (b) тушение смеси, полученной на этапе (a), для тушения любого непрореагировавшего лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и/или непрореагировавшего сшивающего средства (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1), (c) выдержку

смеси, полученной на этапе (b), для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из связывающегося с клетками средства, и (d) очистку смеси для получения очищенного конъюгата (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1).

Альтернативно, этап выдержки можно осуществлять после очистки конъюгата с последующим дополнительным этапом очистки.

В другом аспекте реакции позволяют происходить до завершения перед этапом выдержки. В связи с этим, этап выдержки можно осуществлять приблизительно через интервал от 1 ч до приблизительно 48 ч (например, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 11 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 13 ч, приблизительно 14 ч, приблизительно 15 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 17 ч, приблизительно 18 ч, приблизительно 19 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 21 ч, приблизительно 22 ч, приблизительно 23 ч, приблизительно 24 ч или от приблизительно 24 ч до приблизительно 48 ч) после приведения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивющим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1).

Этап выдержки включает поддержание раствора при подходящей температуре (например, от приблизительно 0 до приблизительно 37°C) в течение подходящего периода времени (например, от приблизительно 1 ч до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 до приблизительно 24 ч, от приблизительно 1 до приблизительно 8 ч или от приблизительно 1 до приблизительно 4 ч) для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из антитела при, по существу, отсутствии высвобождения стабильно связавшихся линкеров из антитела. В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре приблизительно 20°C или менее (например, от приблизительно 0 до приблизительно 18°C, от приблизительно 4 до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20 до приблизительно 30°C или от приблизительно 20 до приблизительно 25°C) или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30 до приблизительно 37°C). В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 16 до приблизительно 24°C (например, приблизительно 15°C, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C или приблизительно 25°C). В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 2 до приблизительно 8°C (например, приблизительно 0°C, приблизительно 1°C, приблизительно 2°C, приблизительно 3°C, приблизительно 4°C, приблизительно 5°C, приблизительно 6°C, приблизительно 7°C, приблизительно 8°C, приблизительно 9°C или приблизительно 10°C).

В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствора при температуре приблизительно 37°C (например, приблизительно 34°C, приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39°C или приблизительно 40°C).

Длительность этапа выдержки зависит от температуры и pH, при которых его осуществляют. Например, длительность этапа выдержки, по существу, можно снижать, осуществляя его при повышенной температуре, при этом максимальная температура ограничена стабильностью конъюгата связывающегося с клетками средства и цитотоксического средства. Этап выдержки может включать поддержание раствора в течение от приблизительно 1 ч до приблизительно 1 дня (например, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 14 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 18 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 22 ч или приблизительно 24 ч), от приблизительно 10 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 12 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 14 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 16 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 18 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 20 ч до приблизительно 24 ч, от приблизительно 5 ч до приблизительно 1 недели, от приблизительно 20 ч до приблизительно 1 недели, от приблизительно 12 ч до приблизительно 1 недели (например, приблизительно 12 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней или приблизительно 7 дней) или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 недели.

В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 2 до приблизительно 8°C в течение периода по меньшей мере от приблизительно 12 ч до недели. В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 2 до приблизительно 8°C в течение ночи (например, от приблизительно 12 до приблизительно 24 ч, предпочтительно приблизительно 20 ч).

Значение pH для этапа выдержки, предпочтительно, составляет от приблизительно 4 до приблизительно 10. В одном из аспектов, значение pH для этапа выдержки составляет приблизительно 4 или более, но менее приблизительно 6 (например, от 4 до 5,9) или приблизительно 5 или более, но менее приблизительно 6 (например, от 5 до 5,9). В другом аспекте значения pH для этапа выдержки находятся в

диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 10 (например, от приблизительно 6,5 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 8). Например, значения pH для этапа выдержки могут составлять приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5 или приблизительно 10.

В других аспектах этап выдержки может включать инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 6-7,5 в течение от приблизительно 12 ч до приблизительно 1 недели, инкубацию смеси при 4°C и pH приблизительно 4,5-5,9 в течение от приблизительно 5 ч до приблизительно 5 дней, или инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 4,5-5,9 в течение от приблизительно 5 ч до приблизительно 1 дня.

Одноэтапный способ, необязательно, может включать добавление сахарозы на этапе реакции для повышения растворимости и выделения коньюгатов. Желательно, сахарозу добавляют в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20% (мас./об.) (например, приблизительно 0,1, 1, 5, 10, 15 или 20% (мас./об.)). Предпочтительно сахарозу добавляют в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 10% (мас./об.) (например, приблизительно 0,5, приблизительно 1, приблизительно 1,5, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10 или приблизительно 11% (мас./об.)). Кроме того, этап реакции также может включать добавление буферного средства. Можно использовать любое подходящее буферное средство, известное в этой области.

Подходящие буферные средства включают, например, цитратный буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер и фосфатный буфер. В одном из аспектов буферное средство выбрано из группы, состоящей из НЕПСО (N-(2-гидроксиэтил)пiperазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты)), РОПСО (дегидрата пиперазин-1,4-bis-(2-гидрокси-пропан-сульфоновой кислоты)), НЕПЕС (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты), НЕРПС (ЕРРС) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновой кислоты), ТЕС (N-[три(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновой кислоты) и их комбинации.

Одноэтапный способ дополнительно может включать этап очистки смеси для получения очищенного коньюгата (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1). Для очистки коньюгатов по настоящему изобретению можно использовать любые способы очистки, известные в этой области. В одном из аспектов для коньюгатов по настоящему изобретению используют тангенциальную поточную фильтрацию (TFF), неадсорбционную хроматографию, адсорбционную хроматографию, адсорбционную фильтрацию, селективное осаждение или любой другой подходящий способ очистки, а также их комбинации. В другом аспекте перед подверганием коньюгатов описываемой выше очистке, их сначала фильтруют через одну или несколько PVDF мембранны. Альтернативно, коньюгаты фильтруют через одну или несколько PVDF мембранны после подвергания коньюгатов описываемой выше очистке. Например, в одном из аспектов коньюгаты фильтруют через одну или несколько PVDF мембранны, а затем очищают с использованием тангенциальной поточной фильтрации. Альтернативно, коньюгаты очищают с использованием тангенциальной поточной фильтрации, а затем фильтруют через одну или несколько PVDF мембранны.

Для очистки можно использовать любые подходящие системы TFF, включая систему типа Pellicon® (Millipore, Billerica, MA), кассетную систему Sartocon® (Sartorius AG, Edgewood, NY) и систему типа Centrasette® (Pall Corp., East Hills, NY).

Для очистки можно использовать любую подходящую смолу для адсорбционной хроматографии. Предпочтительные способы адсорбционной хроматографии включают хроматографию на гидроксиапатите, гидрофобную хроматографию с индукцией заряда (HCIC), хроматографию с гидрофобными взаимодействиями (HIC), ионообменную хроматографию, комбинированную ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC), хроматографию с красителем-лигандом, аффинную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию и их комбинации. Примеры подходящих гидроксиапатитных смол включают керамический гидроксиапатит (СНТ типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), гидроксиапатит HA Ultrogel® (Pall Corp., East Hills, NY) и керамический фторапатит (CFT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примером подходящей смолы для HCIC является смола МЕР Hypercel® (Pall Corp., East Hills, NY). Примеры подходящих смол для HIC включают бутил-сефарозную, гексил-сефарозную, фенил-сефарозную и октил-сефарозную смолы (все от GE Healthcare, Piscataway, NJ), а также метиловую смолу Macro-prep® и трет-бутиловую смолу Macro-Prep® (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих ионообменных смол включают смолы SP-Sepharose®, CM-Sepharose® и Q-Sepharose® (все от GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Unosphere® S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих комбинированных ионообменных материалов включают смолу Bakerbond® ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Примеры подходящих смол для IMAC включают смолу Chelating Sepharose® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Profinity® IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих смол с красителем-лигандом включают смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих аффинных смол включают сефарозную смолу с протеином A (например, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) и лектиновые аффинные смолы, например, смолу Lentil

Lectin Sepharose® (GE Healthcare, Piscataway, NJ), где антитело несет соответствующие лектинсвязывающие участки. Примеры подходящих смол для обращенно-фазовой хроматографии включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Для очистки можно использовать любую подходящую смолу для неадсорбционной хроматографии. Примеры подходящих смол для неадсорбционной хроматографии включают, в качестве неограничивающих примеров, смолы SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEX™ (например, SUPERDEX™ 75 и SUPERDEX™ 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60, и P-100) и другие смолы, известные специалистам в этой области.

Двухэтапный способ и способ, осуществляемый в одном реакционном сосуде.

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать, как описано в патенте США № 7811572 и публикации патентной заявки США № 2006/0182750. Способ включает этапы (a) приведения антитела по настоящему изобретению в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) для ковалентного присоединения линкера (т.е. Ab-SMCC, Ab-SPDB или Ab-CX1-1) к антителу и, таким образом, получения первой смеси, содержащей антитело со связавшимся с ним линкером; (b) необязательно, подвергания первой смеси очистке для получения очищенной первой смеси антитела со связавшимся с ним линкером; (c) конъюгирования лекарственного средства (например, DM1 или DM4) с антителом со связавшимся с ним линкером в первой смеси посредством осуществления реакции антитела со связавшимся с ним линкером с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения второй смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции; и (d) подвергания второй смеси очистке для очистки конъюгата от других компонентов второй смеси. Альтернативно, можно пропускать этап очистки (b). Для этапов (b) и (d) можно использовать любые способы очистки, представленные в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления для этапов (b) и (d) используют TFF. В другом варианте осуществления для этапа (b) используют TFF и для этапа (d) используют абсорбционную хроматографию (например, CHT).

Одноэтапный реагент и способ *in situ*.

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать посредством конъюгирования заранее полученного соединения лекарственное средство-линкер (например, SMCC-DM1, сульфо-SMCC-DM1, SPDB-DM4 или CX1-1-DM1) с антителом по настоящему изобретению, как описано в патенте США 6441163 и публикациях патентных заявок США № 2011/0003969 и 2008/0145374, с последующим этапом очистки. Можно использовать любые способы очистки, представленные в настоящем описании. Соединение лекарственное средство-линкер получают, проводя реакцию лекарственного средства (например, DM1 или DM4) со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Соединение лекарственное средство-линкер (например, SMCC-DM1, сульфо-SMCC-DM1, SPDB-DM4 или CX1-1-DM1), необязательно, подвергают очистке перед конъюгированием с антителом.

4. Определение характеристик и селекция желаемых антител и лекарственных конъюгатов антител.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или лекарственные конъюгаты антител по настоящему изобретению можно охарактеризовывать и выбирать по их физическим/химическим свойствам и/или видам биологической активности с помощью различных анализов, известных в этой области.

Например, антитело по настоящему изобретению можно тестировать на его антигенсвязывающую активность известными способами, такими как ELISA, FACS, Biacore или вестерн-блоттинг.

Трансгенные животные и клеточные линии особенно подходят для скрининга лекарственных конъюгатов антител (ADC), обладающих потенциалом в качестве профилактического или терапевтического лечения злокачественного новообразования, гиперэкспрессирующего опухолеспецифические антигены и рецепторы поверхности клетки. Скрининг на применимые ADC может включать введение трансгенному животному тестируемых ADC в диапазоне доз и анализ в различные моменты времени эффектов ADC в отношении оцениваемого заболевания или нарушения. Альтернативно или дополнительно, в соответствующих случаях лекарственное средство можно вводить перед или одновременно с воздействием индуктора заболевания. Тестируемые ADC можно подвергать скринингу серийно и отдельно, или параллельно в средне- или высокопроизводительном формате скрининга.

Один из аспектов относится к способу скрининга, включающему (a) трансплантиацию клеток из стабильной линии злокачественных клеток или опухоли пациента-человека, экспрессирующей cKIT (например, клеточной линии или фрагмента опухоли GIST, клеточной линии или фрагмента опухоли меланомы, первичных клеток AML) в не относящееся к человеку животное, (b) введение тестируемого лекарственного средства ADC не относящемуся к человеку животному и (c) определение способности кандидата ингибировать рост опухолей из трансплантируемой клеточной линии. Настоящее изобретение также включает способ скрининга тестируемых ADC для лечения заболевания или нарушения, отличающегося гиперэкспрессией cKIT, включающий (a) приведение клеток из стабильной линии злокачественных кл-

ток, экспрессирующих сKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством и (b) оценку способности тестируемого ADC ингибировать рост стабильной клеточной линии.

Другой аспект относится к способу скрининга, включающему (a) приведение клеток из стабильной линии злокачественных клеток, экспрессирующих сKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством ADC и (b) оценку способности тестируемого ADC блокировать активацию лиганда сKIT. В другом аспекте оценивают способность тестируемого ADC блокировать стимулированное лигандом фосфорилирование тирозина.

Дополнительный аспект относится к способу скрининга, включающему (a) приведение клеток из стабильной линии злокачественных клеток, экспрессирующих сKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством ADC и (b) оценку способности тестируемого ADC индуцировать гибель клеток. В одном из аспектов оценивают способность тестируемого ADC индуцировать апоптоз.

Тестируемое ADC можно подвергать скринингу, вводя его трансгенному животному в диапазоне доз и оценивая физиологический ответ животного на соединения с течением времени. В некоторых случаях, подходящим может являться введение соединения в комбинации с кофакторами, которые будут повышать эффективность соединения. Если для скрининга на ADC, применимые в лечении различных нарушений, ассоциированных с гиперэкспрессией сKIT, используют клеточные линии, получаемые из исследуемых трансгенных животных, тестируемые ADC добавляют в среду для культивирования клеток в соответствующий момент времени и оценивают клеточный ответ на ADC с течением времени с использованием соответствующих биохимических и/или гистологических анализов.

Таким образом, настоящее изобретение относится к анализам для идентификации ADC, специфичных к сKIT и связывающихся с сKIT, и гиперэкспрессии сKIT на опухолевых клетках.

#### Антитела против сKIT.

Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT человека. Антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению включают, в качестве неограничивающих примеров, моноклональные антитела человека или их фрагменты, выделенные, как описано в примерах ниже.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 28, 46, 64, 82, 100, 118 или 136 (табл. 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат CDR VH, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенной в табл. 1. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, содержащим (или альтернативно, состоящим из) одну, две, три, четыре, пять или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенных в табл. 1 ниже.

Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 37, 55, 73, 91, 109, 127 или 145 (табл. 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат CDR VL, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VL, приведенной в табл. 1 ниже. В частности, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с сKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат (или альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VL, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VL, приведенных в табл. 1.

Другие антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению включают аминокислоты, подвергнутые мутагенезу, но имеющие по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичности в областях CDR по отношению к областям CDR, приведенным в последовательностях, описываемых в табл. 1. В некоторых аспектах они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот подвергнуты мутагенезу в областях CDR по сравнению с областями CDR, приведенными в последовательностях, описываемых в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующими VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, специфически связывающих с сKIT. Такие последовательности нуклеиновой кислоты можно оптимизировать для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таблица 1  
Примеры антител против сcKIT

<u>9P3</u>		
SEQ ID NO 3: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 4:	HCDR2	NINYDGSSTYYLDSLKS
(Kabat)		
SEQ ID NO 5: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 6: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 7: (Chothia)	HCDR2	NYDGSS
SEQ ID NO 8: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 9:	VH	EVRLVESEGLVQPRSSMMLSCTASGFTFSDYY MAWVRQVPEKGLEWVANINYDGSSTYYLDSLKS RFIISRDNAKNILYLQMSSLKSEDTATYYCARG DYYGTTYWYFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO 10	Константная область тяжелой цепи	VAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO 11:	Тяжелая цепь (гуманизи- рованное)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDSVKKG RFTIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS GTQTYICNVNPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 12: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 13: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS

SEQ ID NO 14: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 15: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 16: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 17: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 18:	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYL NWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKKLWSFGG GTKLEIKR
SEQ ID NO:19	Константная область легкой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 20:	Легкая цепь (гуманизи- рованное VK1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 21:	ДНК легкой цепи (гуманизи- рованное VK3 NEG009)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQ

		GLSSPVTKSFNRGEC
<u>NEG024</u>		
SEQ ID NO 22: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 23: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 24: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 25: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 26: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 27: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 28:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 29:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 30:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC

		ATGGCCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGTGGCCAATATCAACCAAATCGCC GGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGAGAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGC ACAGCCGCCCTGGCTGCCCTGGTAAGGACTAC TTCCCCGAGGCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTCCCC GCCGTGCTGAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACACTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAG GACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGACAACGCCAAGACCAAGGCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT TCCGTGCTGACCGTGTGCTGCCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGACCCCCAG GTGTACACCTGCCCTCCCCCTCCGGAGGAGATG ACCAAGAACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC
--	--	---

		AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 31: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 32: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 33: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 34: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 35: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 36: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 37:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLN NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 38:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLN NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 39:	ДНК легкой цепи	GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGGCCACCCCTGTCC TGCAGAGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC AGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCAGGCACTACACCCTGACCATCAGCAGC AGCAGGCACTACACCCTGACCATCAGCAGC CTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC

		CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTCGGCCGA GGCACCAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGT TGCCTGCTGAACAACATTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCTTGAGCAAGGCCACTACGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GCCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGCGAGTGC
<b><u>NEG026</u></b>		
SEQ ID NO 40: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 41: (Kabat)	HCDR2	NINQNTGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 42: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 43: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 44: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 45: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 46:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQNTGSTYYVDSVQG RFTISRDNAKNNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 47:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQNTGSTYYVDSVQG RFTISRDNAKNNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSL

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 48:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGAATTGGTGGAAAGCGGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGGTCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAAACACC GGCAGCACCTACTACGTGGACAGCGTGAAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTAAGGACTAC TTCCCCGAGCCGTGACCGTGTCTGGAAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCAGGCCAAG GACACCCGTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA

		GAGGAGCAGTACAACACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAACAAGTGCAAGGTCTCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCTGCCCCCTCCCAGGAGATG ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGC TGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 49: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 50: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 51: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 52: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 53: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 54: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 55:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 56:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

		CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFRNGEC
SEQ ID NO 57:	ДНК цепи	легкой GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCGTCC TGCAGAGCCAGGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCGGCCAGGCC AGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCATCCCCGCCAGATTCTGGCAGCGC AGCGGCACCGACTACACCCGTGACCATCAGCAGC CTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTACACCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCCTGCCAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<b><u>NEG027</u></b>		
SEQ ID NO 58: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 59: (Kabat)	HCDR2	SINQNTGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 60: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 61: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 62: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 63:	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV

(Chothia)		
SEQ ID NO 64:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 65:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSN GALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 66:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGCTCTTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGTGGCCAGTATCAACAAAACACC GGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGCAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCAGCGTGTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGC ACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTCCCC

		GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAG GACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCTGCCCTCCCCCTCCGGGAGGAGATG ACCAAGAAACCAGGTGTCCTGACCTGTTGGTG AAGGGCTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCAACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGC TGCAGCGTGATGCAAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCGGC AAG
SEQ ID NO 67: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 68: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 69: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 70: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 71:	LCDR2	YTS

(Chothia)		
SEQ ID NO 72: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 73:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 74:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGGGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGE C
SEQ ID NO 75:	ДНК цепи	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCGTCC TGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGGCCGGCCAGGCCAGAGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGGCATCCCCGCCAGATTTCAGCAGCGAGCAGGGCACCCACTACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGACTACTGC CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTTCATCTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGGTGGACAAACGCCAGCGAGCAGGGCACACGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCCTGCAGGAGTGAACCGACAGGGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGTGC

<u>NEG085</u>		
SEQ ID NO 76: (Kabat)	HCDR1	GYYMA
SEQ ID NO 77: (Kabat)	HCDR2	NINYPGSSTYYLDSVKG
SEQ ID NO 78: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 79: (Chothia)	HCDR1	GFAFSGY
SEQ ID NO 80: (Chothia)	HCDR2	NYPGSS
SEQ ID NO 81: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 82:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGYY MAWVRQAPGKGLEWVANINYPGSSTYYLDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 83:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGYY MAWVRQAPGKGLEWVANINYPGSSTYYLDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 84:	ДНК тяжелой цепи	GAAAGTCAATTGGTGGAAAGCGCCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCGCCCTCAGCGGCTACTAC ATGGCCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGC

		CTGGAATGGGTGGCCAACATCAACTACCCCGGC AGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGAAGGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGC GAGGACACGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCAGGGACCACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGC ACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCC GTGACCGTGT CCTGGAAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACACTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCAGGCCAAG GACACCCGTATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCTGCCCTCCCCCTCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCGAGGTGTCCTGACCTGCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCA CGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCAACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GC
--	--	--

		TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 85: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 86: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 87: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 88: (Chothia)	LCDR1	SQSISYY
SEQ ID NO 89: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 90: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 91:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 92:	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVV CLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 93:	ДНК легкой цепи	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGCTGCAG AGCGGCGTGGCCAGCAGATTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCGCCTGTGGTCCTCGCGGA

		GGCACCAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCCTGCAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGCGAGTGC
<b><u>NEG086</u></b>		
SEQ ID NO 94: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 95: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 96: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 97: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 98: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 99: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 100: 100:	VH	EVQLVESGGLVQPQPGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYVDSVQG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 101:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGLVQPQPGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYVDSVQG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVPSSL GTQTYICNVNKHPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC

				PPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHTQKSLSLSPKG
SEQ 102:	ID цепи	NO ДНК	тяжелой	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGCCAATATCAACCAAATGCC GGCAGCACCTACTACGTGGACAGCGTGCAAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGCC ACAGCCGCCCTGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGCACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCAGGCCAAG GACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG

		TCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCAAGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCCTGCCCTCCCCGGAGGAGATG ACCAAGAACCGGTGTCCTGACCTGCTGGTG AAGGGCTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCCAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGC TGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 103: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 104: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 105: (Kabat)	LCDR3	QQGRRILWS
SEQ ID NO 106: (Chothia)	LCDR1	SQSISYY
SEQ ID NO 107: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 108: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 109:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 110:	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG

					SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ	ID	NO	ДНК	легкой	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTACCACCATCACC TGTCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCCGTGGTCCTCGGCGGA
111:			цепи		GGCACCAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCCTGACCTGAGCAAGGCCACTACGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCCTGGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGCGAGTGC
<b><u>NEG087</u></b>					
SEQ	ID	NO	HCDR1	DYYMA	
112:	(Kabat)				
SEQ	ID	NO	HCDR2	SINQNTGSTYYLDSVRG	
113:	(Kabat)				
SEQ	ID	NO	HCDR3	GDYYGTTWYFDV	
114:	(Kabat)				
SEQ	ID	NO	HCDR1	GFTFSDY	
115:	(Chothia)				

SEQ 116:	ID (Chothia)	NO	HCDR2	NQNTGS
SEQ 117:	ID (Chothia)	NO	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ 118:	ID VH	NO		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ 119:	ID Тяжелая цепь	NO		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRPEV TCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ 120:	ID ДНК цепи	NO	тяжелой	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGTGGCCAGTATCAACCAAAACACC GGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGCAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCAGC

		TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAG GACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATAACAGTGCAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCCTGCCCTCCGGAGGAGATG ACCAAGAACCAAGGTGTCCTGACCTGCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAAGCGACATGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGCCAGCCCCGAGAACAACTAC AAGACCAACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGC AGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ 121: (Kabat)	ID NO 121: (Kabat)	LCDR1 RASQSISSYLN
SEQ 122: (Kabat)	ID NO 122: (Kabat)	LCDR2 YTSRLQS

SEQ 123:	ID (Kabat)	NO	LCDR3	QQGRRRLWS
SEQ 124:	ID (Chothia)	NO	LCDR1	SQSISYY
SEQ 125:	ID (Chothia)	NO	LCDR2	YTS
SEQ 126:	ID (Chothia)	NO	LCDR3	GRRRLW
SEQ 127:	ID VL	NO		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGRRRLWSFGG GTKVEIK
SEQ 128:	ID Легкая цепь	NO		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGRRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ 129:	ID ДНК цепи	NO	легкой цепи	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGGCGTGCCAGCAGATTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCCCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTCTACCCCCGGGAGGCC

		AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAAG GCCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<b><u>20376</u></b>		
SEQ ID NO 130: (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO 131: (Kabat)	HCDR2	GIIPMSGRTTYAQKFQG
SEQ ID NO 132: (Kabat)	HCDR3	DYGPEAPDYQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 133: (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
SEQ ID NO 134: (Chothia)	HCDR2	IPMSGR
SEQ ID NO 135: (Chothia)	HCDR3	DYGPEAPDYQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 136:	VH	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD YGPEAPDYQSTSYFWYYAFDPWGQGTLTVSS
SEQ ID NO 137:	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD YGPEAPDYQSTSYFWYYAFDPWGQGTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

			TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK	
SEQ 138:	ID NO	ДНК цепи	тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCCGAAGTG AAGAAACCCGGCTCTAGCGTAAAGTCAGCTGT AAAGCTAGTGGGGCACCTCTAGCTACGCT ATTAGCTGGTCAGACAGGCCCAAGGTCAAGGC TTGGAGTGGATGGCGGAATTATCCCTATGAGC GGTAGAACTACCTACGCTCAGAAATTTCAGGGT AGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGC ACCGCCTATGGAACTGAGTTCTGAGGTCA GAGGACACGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAC TACGGCCCCGAGGCCCGACTACGGTCAATCA ACTAGCTACTCTGGTACTACGCCCTCGACCCT TGGGGTCAAGGCACCCCTGGTACCGTGTCTCA GCTAGCACTAAGGGCCAAGTGTGTTCCCTG GCCCGCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAC GCTGCCCTGGGTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACTCTGG GCTCTGACTCCGGCGTGACACACCTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCGTACAGCCTGAGC AGCGTGGTGACAGTGCCTCCAGCTCTGG ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCTGCCAGCTCCAGAACACTGCTGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCGTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACC TGCCTGGTGGGACGTGTCCCACGAGGACCCA GAGGTGAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAG GAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC

		GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATACAAGTGCAGGAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCTGCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCGGGTGTCCCTGACCTGTCGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGCCAGCCCCAGAACAACATACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCAGCAGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGCTGC AGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCAACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO 139: (Kabat)	LCDR1	SGDNIPSYFVH
SEQ ID NO 140: (Kabat)	LCDR2	DDNDRPS
SEQ ID NO 141: (Kabat)	LCDR3	SSWDQDTV
SEQ ID NO 142: (Chothia)	LCDR1	DNIPSYF
SEQ ID NO 143: (Chothia)	LCDR2	DDN
SEQ ID NO 144: (Chothia)	LCDR3	WDQDTV
SEQ ID NO 145:	VL	DIELTQPPSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVH WYQQKPGQAPVLVIYDDNDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQDTVVF GG GTKLTVL
SEQ ID NO 146:	Легкая цепь	DIELTQPPSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVH WYQQKPGQAPVLVIYDDNDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQDTVVF GG

					GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHE GSTVEKTVAPTECS
SEQ 147:	ID NO	ДНК цепи	легкой		GATATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGC GTCAGCCCTGGTCAAACGCCCTATCACCTGT AGCGGCATAATATCCCTAGCTACTTCGTGCAC TGGTATCAGCAGAAAGCCCCGTCAAGCCCCGTG CTGGTGATCTACGACGATAACGATAGACCTAGC GGAATCCCAGCGGTTAGCGGCTTAATAGC GGTAACACCGCTACCCCTGACTATTAGCGGCACT CAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGCTCT AGCTGGGATCAGGACACCGTGGTGGCGG GGCACTAAGCTGACCGTGCTGGTCAACCTAAG GCTGCCCCCAGCGTGACCCCTGTTCCCCCAGC AGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAGGCCACCC GTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCC GTGACCGTGGCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCC GTGAAGGCCGGCTGGAGACCACCAACCCCCAGC AAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGC TACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGGAAAGAGC CACAGGTCCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAG GGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAAC GAGTGCAGC

Другие антитела по настоящему изобретению включают антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, подвергнуты мутагенезу, но имеют по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичности по отношению к последовательностям, описываемым в табл. 1. В некоторых аспектах они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в вариабельных областях подвергнуты мутагенезу по сравнению с вариабельными областями, приведенными в последовательностях, описываемых в табл. 1, одновременно сохраняя, по существу, ту же терапевтическую активность.

Т.к. каждое из этих антител может связываться с сKIT, последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) можно "смешивать и сопоставлять" для получения других сKIT-связывающих антител. Такие "смешанные и сопоставленные" сKIT-связывающие антитела можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в этой области (например, ELISA и другие анализов, описываемых в примерах). Когда эти цепи смешивают и сопоставляют, последовательность VH из конкретной пары VH/VL необходимо заменять структурно схожей последовательностью VH. Аналогично, последовательность полноразмерной тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь необходимо заменять структурно схожей последовательностью полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично, последовательность VL из конкретной пары VH/VL необходимо заменять структурно схожей последовательностью VL. Аналогично, последовательность полноразмерной легкой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь необходимо заменять структурно схожей последовательностью полноразмерной легкой цепи. Таким образом, в одном из аспектов настояще изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей области, имеющей: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 28, 46, 64, 82, 100, 118 или 136 (табл. 1); и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 37, 55, 73, 91, 109, 127 или 145 (табл. 1); где антитело специфически связывается с сKIT.

В другом аспекте настояще изобретение относится к (i) выделенному моноклональному антителу, имеющему полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, оптимизированную для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 29, 47, 65, 83, 101, 119 или 137; и полноразмерную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, оптимизированную для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 38, 56, 74, 92, 110, 128 или 146; или (ii) функциональному белку, со-

держащему его антигенсвязывающую часть.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к сcKIT-связывающим антителам, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в таблице 1, или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 VH антител приведены в SEQ ID NO: 3, 22, 40, 58, 76, 94, 112 и 130. Аминокислотные последовательности CDR2 VH антител приведены в SEQ ID NO: 4, 23, 41, 59, 77, 95, 113 и 131. Аминокислотные последовательности CDR3 VH антител приведены в SEQ ID NO: 5, 24, 42, 60, 78, 96, 114 и 132. Аминокислотные последовательности CDR1 VL антител приведены в SEQ ID NO: 12, 31, 49, 67, 85, 103, 121 и 139. Аминокислотные последовательности CDR2 VL антител приведены в SEQ ID NO: 13, 32, 50, 68, 86, 104, 122 и 140. Аминокислотные последовательности CDR3 VL антител приведены в SEQ ID NO: 14, 33, 51, 69, 87, 105, 123 и 141.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с cKIT, и что антигенсвязывающую специфичность обеспечивают, главным образом, области CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL можно "смешивать и сопоставлять" (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и сопоставлять, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, 2 и 3 VH и CDR1, 2 и 3 VL для получения других C5-связывающих молекул). Такие "смешанные и сопоставленные" cKIT-связывающие антитела можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в этой области и описываемых в примерах (например, ELISA). При смешивании и сопоставлении последовательностей CDR VH последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH необходимо заменять структурно схожими последовательностями CDR. Аналогично, при смешивании и сопоставлении последовательностей VL CDR последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VL необходимо заменять структурно схожими последовательностями CDR. Специалистам в этой области будет очевидно, что новые последовательности VH и VL можно получать, заменяя одну или несколько последовательностей областей CDR VH и/или VL структурно схожими последовательностями из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании для моноклональных антител по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей области, содержащей CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 22, 40, 58, 76, 94, 112 и 130; CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 23, 41, 59, 77, 95, 113 и 131; CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 24, 42, 60, 78, 96, 114 и 132; CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 31, 49, 67, 85, 103, 121 и 139; CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 32, 50, 68, 86, 104, 122 и 140; и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 33, 51, 69, 87, 105, 123 и 141; где антитело специфически связывается с cKIT.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 12; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 13 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 14.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 22, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 24; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 31; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 32 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 33.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 40, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 41; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 42; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 49; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 50 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 51.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 58, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 59; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 60; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 67; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 68 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 69.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 76, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 77; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 78; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 85; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 86 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 87.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 94, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 95; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 96; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 103; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 104 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 105.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 112, CDR2 тяже-

лой цепи SEQ ID NO: 113; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 114; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 121; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 122 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 123.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 130, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 131; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 132; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 139; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 140 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 141.

В определенных аспектах антитело, специфически связывающееся с cKIT, является антителом или фрагментом антитела (например, антигенсвязывающим фрагментом), описываемым в табл. 1.

#### 1. Идентификация эпитопов и антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом.

Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с эпитопом во внеклеточном домене рецептора cKIT. В определенных аспектах антитела и фрагменты антител могут связываться с эпитопами в доменах 1-3 внеклеточного домена cKIT.

Настоящее изобретение также относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с тем же эпитопом, что и антитела против cKIT, описываемые в табл. 1. Таким образом, дополнительные антитела и фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) можно идентифицировать с учетом их способности перекрестно конкурировать (например, полностью ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания cKIT. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) по настоящему изобретению с белком cKIT (например, cKIT человека) свидетельствует о том, что тестируемое антитело может конкурировать с тем антителом или фрагментом антитела (например, антигенсвязывающими фрагментами) за связывание с cKIT; согласно неограничивающей теории, такое антитело может связываться с тем же или родственным (например, структурно схожим или пространственно близким) эпитопом на белке cKIT, что и антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), с которым оно конкурирует. В определенном аспекте антитело, связывающееся с тем же эпитопом на cKIT, что и антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению, является моноклональным антителом человека или гуманизированным моноклональным антителом. Такие моноклональные антитела человека или гуманизированные моноклональные антитела можно получать и выделять, как представлено в настоящем описании.

#### 2. Дополнительное изменение каркаса Fc-области.

Настоящее изобретение относится к сайт-специфичным меченым иммуноконъюгатам. Эти иммуноконъюгаты могут содержать модифицированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, дополнительно содержащие модификации в каркасных остатках в VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является "обратная мутация" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, подвергнутое соматической мутации, может содержать каркасные остатки, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой получают антитело. Такие остатки можно идентифицировать, сравнивая последовательности каркаса антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получают антитело. Для возвращения последовательностей каркасной области в ее конфигурацию зародышевой линии соматические мутации можно подвергать "обратной мутации" в последовательность зародышевой линии, например, посредством сайта-специфического мутагенеза. Такие антитела "с обратной мутацией" также предназначены для включения в настоящее изобретение.

Другой тип модификации каркаса включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы, таким образом, снижать потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также обозначают как "деиммунизация" и подробно описывают в патентной публикации США № 2003/0153043 Carr et al.

Дополнительно или альтернативно модификациям, осуществляемым в каркасных областях или областях CDR, можно конструировать антитела, включающие модификации в Fc-области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело можно химически модифицировать (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических остатков) или модифицировать для изменения его гликозилирования также для изменения одного или нескольких функциональных свойств антител. Каждый из этих аспектов подробно описываются ниже.

В одном из аспектов шарнирную область CH1 модифицируют таким образом, что изменяют количество остатков цистеина в шарнирной области, например, повышают или снижают. Этот подход описывают в патенте США № 5677425 Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом аспекте шарнирную область Fc антитела подвергают мутагенезу для снижения биологи-

ческого времени полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот встраивают в пограничную область домена CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнирная область таким образом, что антитело имеет нарушенное связывание со стафилококковым протеином A (SpA) относительно связывания SpA нативным Fc-шарнирным доменом. Этот подход подробно описывают в патенте США № 6165745 Ward et al.

В других аспектах Fc-область изменяют, заменяя по меньшей мере один аминокислотный остаток другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность родительского антитела.

Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, например, может являться Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход описывают, например, в патентах США № 5624821 и 5648260 Winter et al.

В другом аспекте одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или устраниенную обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход описывают, например, в патенте США № 6194551 Idusogie et al.

В другом аспекте изменяют один или несколько аминокислотных остатков, чтобы, таким образом, изменять способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описывают, например, в публикации PCT № WO 94/29351 Bodmer et al. В конкретном аспекте одну или несколько аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменяют одним или несколькими аллотипичными аминокислотными остатками для подкласса IgG1 и каппа-изотипа. Аллотипичные аминокислотные остатки также включают, в качестве неограничивающих примеров, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи каппа-изотипа, как описывают в Jefferis et al., Mabs. 1:332-338 (2009).

В еще одном аспекте Fc-область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к FcY-рецептору посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход описывают, например, в публикации PCT № WO 00/42072 Presta. Кроме того, картировали участки связывания на IgG1 к Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII и FcRn человека и описывали варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

В другом аспекте модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получать аглико-зилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к "антителу". Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, изменения один или несколько участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько замен аминокислот, приводящих к устранению одного или нескольких участков гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы, таким образом, устранить гликозилирование в этом участке. Такое аглико-зилирование может повышать аффинность антитела к антителу. Такой подход описывают, например, в патентах США № 5714350 и 6350861 Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно получать антитело, имеющее измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее сниженные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное содержание структур GlcNac в точке ветвления. Показано, что такие измененные профиля гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, экспрессируя антитело в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования описаны в этой области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела, чтобы, таким образом, получать антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 Hang et al. описывают клеточную линию с функционально разрушенным геном FUT8, кодирующем фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT № WO 03/035835 Presta описывают вариант клеточной линии CHO, клетки Lecl3, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, также приводящую к гипофукозилированию антител, экспрессируемой в такой клетке-хозяине (см. также Shields et al. (2002), J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT № WO 99/54342 Umana et al. описывают клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюказамилтрансферазы III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное содержание структур GlcNac в точке ветвления, приводящее к повышенной активности ADCC антител (см. также Umana et al., Nat. Biotech. 17: 176-180, 1999).

В другом аспекте антитело модифицируют для повышения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно встраивать одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 Ward. Альтернативно, для повышения

биологического времени полужизни антитела можно изменять в области CH1 или CL так, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора спасения, взятый из двух петель домена CH2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 Presta et al.

В случае минимизации активности ADCC антитела конкретные мутации в Fc-области приводят к "Fc-молчащим" антителам, имеющим минимальное взаимодействие с эффекторными клетками. В основном, "Fc-область IgG" используют для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая нативную последовательность Fc-области и вариант Fc-области. Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяют как содержащую аминокислотные остатки от положения C226 или от P230 к карбоксильному концу антитела IgG. Нумерацию остатков в Fc-область осуществляют согласно индексу EU по Rabat. С-концевой лизин (остаток K447) Fc-области можно удалять, например, при получении или очистке антитела.

Молчащие эффекторные функции можно получать посредством мутации в Fc-области антител, и они описаны в этой области: LALA и N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); и D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69), см. также Heusser et al., WO 2012065950. Примерами антител IgG1 с молчащей Fc являются мутант LALA, содержащий мутацию L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другим примером молчащего антитела IgG1 является мутация DAPA (D265A, P329A) (патент США № 6737056). Другое молчащее антитело IgG1 содержит мутацию N297A, приводящую к агликазилированным/негликозилированным антителам.

Fc-молчащие антитела приводят к низкой активности ADCC или ее отсутствию, что означает, что Fc-молчащее антитело проявляет активность ADCC, составляющую менее 50% специфичного лизиса клеток, отсутствие активности ADCC означает, что Fc-молчащее антитело проявляет активность ADCC (специфичный лизис клеток), составляющую менее 1%.

### 3. Получение антитела против cKIT.

Антитела против cKIT и их фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) можно получать любыми способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетramerов антитела, в то время как полноразмерные моноклональные антитела можно получать, например, с помощью гибридомной или рекомбинантной продукции. Рекомбинантная экспрессия может происходить в любых соответствующих клетках-хозяевах, известных в этой области, например, клетках-хозяевах мlekопитающих, бактериальных клетках-хозяевах, клетках-хозяевах дрожжей, клетках-хозяевах насекомых и т.д.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полинуклеотидам, кодирующими антитела, представленные в настоящем описании, например, полинуклеотидам, кодирующими вариабельные области тяжелой или легкой цепи или сегменты, содержащие определяющие комплементарность области, как представлено в настоящем описании. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий вариабельные области тяжелой цепи, имеет по меньшей мере 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 48, 66, 84, 102, 120 и 137. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий вариабельные области легкой цепи, имеет по меньшей мере 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 57, 75, 93, 111, 129 и 147.

В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, имеет по меньшей мере 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду SEQ ID NO: 30, 48, 66, 84, 102, 120. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, имеет по меньшей мере 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду SEQ ID NO: 39, 57, 75, 93, 111, 129 и 147.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать только последовательность вариабельной области антитела против cKIT. Они также могут кодировать вариабельную область и константную область антитела. Некоторые полинуклеотидные последовательности кодируют полипептид, содержащий вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи одного из примеров антитела против cKIT. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, соответственно, по существу, идентичных вариабельным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из антител мыши.

Полинуклеотидные последовательности можно получать твердофазным синтезом ДНК de novo или ПЦР-мутагенезом существующей последовательности (например, последовательностей, описываемых в примерах ниже), кодирующей антитело против cKIT или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять известными в этой области способами, такими как фосфотриэфирный способ по Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979; фосфодизэфирный способ по Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; диэтилфосфорамидатный способ по Beauchage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; и твердофазный способ из патента США № 4458066. Встраивание мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществлять как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992;

PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для продукции описываемых выше антител против сKIT. Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи антител против сKIT или связывающие фрагменты можно использовать различные экспрессирующие векторы. Для продукции антител в клетке-хозяине млекопитающего можно использовать вирусные и невирусные экспрессирующие векторы. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эпизомные векторы, как правило, с экспрессиющей кассетой для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов против сKIT в клетках млекопитающего (например, человека), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, San Diego, CA), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные в этой области для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденоавирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса Vaccinia и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al., выше; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992.

Выбор экспрессирующего вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых вектор будет экспрессироваться. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент антитела против сKIT. В некоторых аспектах для предотвращения экспрессии встраиваемых последовательностей, за исключением экспрессии в индуцирующих условиях, используют индуцибельный промотор. Индуцибельные промоторы включают, например, арабинозный промотор, промотор lacZ, промотор металлотионеина или промотор генов теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно выращивать в неиндуцирующих условиях без смещения популяции в сторону кодирующих последовательностях, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, другие регуляторные элементы также могут являться необходимыми или желательными для эффективной экспрессии цепи или фрагмента антитела против сKIT. Эти элементы, как правило, включают инициирующий кодон ATG и смежный участок связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повышать посредством включения энхансеров, соответствующих используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; и Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Например, для повышения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV.

Экспрессирующие векторы также могут обеспечивать позиционирование секреторной сигнальной последовательности для образования слитого белка с полипептидами, кодируемыми встраиваемыми последовательностями антитела против сKIT. Чаще, встраиваемые последовательности антитела против сKIT соединяют с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, подлежащие использованию для получения последовательностей, кодирующих вариабельные домены легкой и тяжелой цепи антитела против сKIT, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы делают возможной экспрессию вариабельных областей в виде слитых белков с константными областями, таким образом, приводя к продукции интактных антител или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева, содержащие и экспрессирующие цепи антитела против сKIT, могут являться прокариотическими или эукариотическими. E.coli является одним из прокариотических хозяев, применимых для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы-хозяева, пригодные для использования, включают бациллы, таких как *Bacillus subtilis*, и других энтеробактерий, таких как *Salmonella*, *Serratia*, и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получать экспрессирующие векторы, как правило, содержащие последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, участок начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество множества из хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (trp) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, не обязательно, с использованием последовательности оператора, и имеют последовательности участка связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии полипептидов против сKIT также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

В других аспектах для экспрессии и продукции полипептидов против сKIT по настоящему изобретению используют клетки-хозяева млекопитающих. Например, они могут являться гибридомной клеточной линией, экспрессирующими эндогенные гены иммуноглобулинов (например, миеломные гибридомные клонны, как описано в примерах), или линией клеток млекопитающих, несущей экзогенный экспрессирующий вектор (например, миеломные клетки SP2/0, пример которых приведен ниже). Они включают

любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортализованные клетки животного или человека. Например, разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая СНО клеточные линии, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, линии миеломных клеток, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов, в общем, описывают, например, в Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как участок начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), и необходимые участки обработки информации, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Эти экспрессирующие векторы, как правило, содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут являться конститтивными, специфичными для типа клеток, стадиеспецифичными и/или модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают, в качестве неограничивающих примеров, промотор металлотионеина, конститтивный основной поздний промотор аденоовириуса, дексаметазон-индукционный промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP ролIII, конститтивный промотор MPSV, тетрациклин-индукционный промотор CMV (такой как предранний промотор CMV человека), конститтивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в этой области.

Способы встраивания экспрессирующих векторов, содержащих интересующие полинуклеотидные последовательности, варьируются в зависимости от типа клеток-хозяев. Например, трансфекцию с хлоридом кальция общепринято используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев (см. Sambrook et al. выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, вироны, иммунолипосомы, коньюгаты поликатион-нуклеиновая кислота, депротеинизированную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленный средствами захват ДНК и трансдукцию ex vivo. Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом часто желательной будет являться стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, стабильно экспрессирующие цепи или связывающие фрагменты антитела против cKIT, можно получать с использованием экспрессирующих векторов, содержащих вирусные участки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективного маркера. После встраивания вектора клеткам можно позволять расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах до переноса на селективные среды. Целью включения селективного маркера является приданье резистентности к селекции, и его наличие делает возможным рост клеток, успешно экспрессирующих встроенные последовательности, в селективных средах.

Резистентные, стабильно трансфицированные клетки могут пролиферировать при использовании способов культивирования ткани, соответствующих типу клеток.

#### Терапевтическое и диагностическое применение.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные коньюгаты антител по настоящему изобретению применимы во множестве областей применения, включая, в качестве неограничивающих примеров, лечение злокачественного новообразования, такого как солидные злокачественные новообразования. В определенных аспектах антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные коньюгаты антител применимы для ингибирования роста опухоли, индуцирования дифференцировки, снижения объема опухоли и/или снижения онкогенности опухоли. Способы применения могут являться способами *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

В одном из аспектов антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные коньюгаты антител применимы для детекции наличия cKIT в биологическом образце. Как применяют в настоящем описании, термин "детекция" включает количественную или качественную детекцию. В определенных аспектах биологический образец содержит клетку или ткань. В определенных аспектах такие ткани включают нормальные и/или опухолевые ткани, экспрессирующие cKIT на более высоких уровнях относительно других тканей.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции наличия cKIT в биологическом образце. В определенных аспектах способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом против cKIT в условиях, допускающих связывание антитела с антигеном, и детекцию образования комплекса между антителом и антигеном.

Также включен способ диагностики нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией cKIT. В определенных аспектах способ включает приведение тестируемой клетки в контакт с антителом против cKIT; определение уровня экспрессии (количественно или качественно) cKIT на тестируемой клетке посредством детекции связывания антитела против cKIT с антигеном cKIT и сравнение уровня экспрессии cKIT в тестируемой клетке с уровнем экспрессии cKIT в контрольной клетке (например, нормальной клетке, происходящей из той же ткани, что и тестируемая клетка, или клетке, экспрессирующей cKIT на уровнях, сравнимых с такой нормальной клетке), где более высокий уровень экспрессии

сKIT на тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой свидетельствует о наличии нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией сKIT. В определенных аспектах тестируемую клетку получают от индивидуума, который, как полагают, имеет нарушение, ассоциированное с повышенной экспрессией сKIT. В определенных аспектах нарушение является нарушением пролиферации клеток, таким как злокачественное новообразование или опухоль.

В определенных аспектах способ диагностики или детекции, такой как описываемый выше, включает детекцию связывания антитела против сKIT с сKIT, экспрессирующимся на поверхности клетки или препарата мембранных, полученного из клетки, экспрессирующей сKIT на своей поверхности. Примером анализа для детекции связывания антитела против сKIT с сKIT, экспрессируемым на поверхности клетки, является анализ "FACS".

Для детекции связывания антител против сKIT можно использовать конкретные другие способы. Такие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, анализы связывания антигена, хорошо известные в этой области, такие как вестерн-блоттинг, радиоиммунологические анализы, ELISA (твердодиффузный иммуноферментный анализ), иммунологические анализы "сэндвич"-типа, анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммунологические анализы, иммунологические анализы с протеином А и иммуногистохимию (ИГС).

В определенных аспектах антитела против сKIT являются мечеными. Метки включают, в качестве неограничивающих примеров, метки или вещества, детектируемые напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также вещества, такие как ферменты или лиганды, детектируемые косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия.

В определенных аспектах антитела против сKIT иммобилизуют на нерастворимой матрице. Иммобилизация вызывает отделение антитела против сKIT от любых белков сKIT, остающихся свободными в растворе. Общепринято ее осуществляют посредством инсолюбилизации антитела против сKIT до осуществления анализа, посредством адсорбции к нерастворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al., патент США № 3720760) или посредством ковалентного присоединения (например, с использованием глутаральдегидной перекрестной сшивки), или посредством инсолюбилизации антитела против сKIT после образования комплекса между антителом против сKIT и белком сKIT, например, посредством иммунопреципитации.

Любой из указанных выше аспектов диагностики или детекции можно осуществлять с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо или в дополнение к антителу против сKIT.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики или улучшения заболевания, включающему введение антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) и лекарственных конъюгатов антител пациенту, таким образом, осуществляя лечение заболевания. В определенных аспектах заболевание, подвергаемое лечению с использованием антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) и лекарственных конъюгатов антител, является злокачественным новообразованием. Примеры заболеваний, которые можно подвергать лечению и/или профилактике, включают, в качестве неограничивающих примеров, гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), мелкоклеточный рак легких (SCLC), острый миелолейкоз (AML), меланому, тучноклеточный лейкоз (MCL), мастоцитоз, нейрофиброматоз, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и рак поджелудочной железы. В определенных аспектах злокачественное новообразование отличается экспрессирующими сKIT клетками, с которыми могут специфически связываться антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные конъюгаты антител.

Настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественного новообразования, включающим введение терапевтически эффективного количества антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах злокачественное новообразование является солидным раком. В определенных аспектах индивидуум является человеком.

В определенных аспектах способ ингибирования роста опухоли включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах индивидуум является человеком. В определенных аспектах индивидуум имеет опухоль, или ему удаляли опухоль.

В определенных аспектах опухоль экспрессирует сKIT, с которым связывается антитело против сKIT. В определенных аспектах опухоль гиперэкспрессирует сKIT человека.

В случае лечения заболевания соответствующая дозировка антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител зависит от различных факторов, таких как тип заболевания, подвергаемого лечению, тяжести и течения заболевания, отвечаемости заболевания, проводимой ранее терапии, анамнеза пациента и т.д. Антитело или средство можно вводить однократно или в течение серии введений, длящейся от нескольких дней до нескольких месяцев, или до достижения излечения или достижения снижения стадии заболевания (например, снижения размера опухоли).

Оптимальные режимы дозирования можно вычислять с учетом измерений накопления лекарственного средства в организме пациента, и они будут варьироваться в зависимости от относительной активности отдельного антитела, фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах доза составляет от 0,01 до 10 мг (например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 мг) на 1 кг массы тела, и ее можно вводить один или более раз в сутки, неделю, месяц или год. В определенных аспектах антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению вводят один раз каждые две недели или один раз каждые три недели. Лечащий врач может устанавливать частоту повторений для дозировки с учетом измеряемой длительности лечения и концентраций лекарственного средства в физиологических жидкостях или тканях.

#### Комбинированное лечение.

В конкретных случаях антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению комбинируют с другими терапевтическими средствами, такими как другие противораковые средства, противоаллергические средства, противорвотные средства (или антиэметики), обезболивающие, цитопротекторы и их комбинации.

Общие химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения в способах комбинированного лечения, включают анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицин сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), инъекцию бусульфана (Busulfex®), капсцитабин (XelodA®), N4-пентоксикарбонил-5-дезокси-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosar® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Cytosar-U®), инъекцию липосом с цитарабином (DeroCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Актиномицин D, Cosmegan), даунорубицин гидрохлорид (Cerubidine®), инъекцию липосом с даунорубицином цитратом (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицин гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флуадарабин фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксицитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарабицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальций, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксанtron (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), phoenix (иттрий-90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантатом кармустина (Gliadel®), тамоксифен цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекан гидрохлорид для инъекций (Нусамптина®), винblastин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®).

В одном из аспектов антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению комбинируют в фармацевтическом комбинированном составе или режиме дозирования в качестве комбинированного лечения со вторым соединением, имеющим противораковые свойства. Второе соединение из фармацевтического комбинированного состава или режима дозирования может иметь активности, дополняющие антитело или иммуноконъюгат из комбинации таким образом, что они не влияют неблагоприятно друг на друга. Например, антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению можно вводить в комбинации, в качестве неограничивающих примеров, с химиотерапевтическим средством, ингибитором тирозинкиназ, например, иматинибом, и другими ингибиторами пути cKIT.

Как применяют в настоящем описании, термин "фармацевтическая комбинация" относится к фиксированной комбинации в одной стандартной лекарственной форме или нефиксированной комбинации или набору из частей для комбинированного введения, где два или более терапевтических средств можно вводить независимо одновременно или раздельно с временными интервалами, особенно если эти временные интервалы позволяют компонентам комбинации демонстрировать совместное, например, синергическое, действие.

Термин "комбинированное лечение" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения, представленного в настоящем описании. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических средств, по существу, одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное соотношение активных ингредиентов. Альтернативно, такое введение включает совместное введение в контейнерах для многократных доз или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости можно восстанавливать или разводить до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное использование каждого типа терапевтического средства приблизительно одновременно или в различные моменты времени. В любом случае схема лечения будет обеспечивать положительное воздействие комбинации лекарственных средств в лечении состояний или нарушений, представленных в настоящем описании.

Комбинированное лечение может обеспечивать "синергию" и оказываться "синергичным", т.е. эффект, достигаемый при совместном использовании активных ингредиентов, является большим, чем сум-

ма эффектов, являющихся результатом использования соединений раздельно. Можно достигать синергического действия, если активные ингредиенты (1) составляют совместно и вводят или доставляют одновременно в комбинированной, стандартной лекарственной форме; (2) доставляют поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) с помощью некоторой другой схемы лечения. При доставке при поочередном лечении синергического действия можно достигать при последовательном введении или доставке соединений, например, с помощью разных инъекций в отдельных шприцах. В основном, при поочередном лечении эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, т.е. периодически, в то время как при комбинированном лечении эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного коньюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы EGFR, ингибиторы Her2, ингибиторы Her3, ингибиторы IGFR и ингибиторы Met.

Например, ингибиторы тирозинкиназ включают, в качестве неограничивающих примеров, эрлотиниб гидрохлорид (Tarcerva®); линифаниб (N-[4-(3-амино-1Н-индазол-4-ил)фенил]-N'-(2-фтор-5-метилфенил)мочевину, также известный как АВТ 869, доступный в Genentech); сунитиниб малат (Sutent®); босутиниб (4-[2,4-дихлор-5-метоксифенил]амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил, также известный как SKI-606 и описываемый в патенте США № 6780996); дазатиниб (Sprycel®); пазопаниб (Votrient®); сорафениб (Nexavar®); зактиму (ZD6474); нилотиниб (Tasigna®); регографениб (Stivarga®) и иматиниб или иматиниба мезилат (Gilevec® и Gleevec®).

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) включают, в качестве неограничивающих примеров, Эрлотиниб гидрохлорид (Tarcerva®), гефитиниб (Iressa®); N-[4-(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[(3"S")тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид, Tovok®; вандетаниб (Caprelsa®); лапатиниб (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); канертиниб дигидрохлорид(CI-1033); 6-[4-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]фенил]-N-[(1R)-1-фенилэтил]-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-4-амин (AEE788, CAS 497839-62-0); мубритиниб (TAK165); пелитиниб (EKB569); афатиниб (BIBW2992); нератиниб (HKI-272); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1Н-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]карбаминовую кислоту, (3S)-3-морфолинилометиловый сложный эфир (BMS599626); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[(3α,5β,6α)-октагидро-2-метилцикlopента[c]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); и 4-[4-[(1R)-1-фенилэтил]амино]-7Н-пирроло[2,3-d]пиридин-6-ил]фенол (PKI166, CAS 187724-61-4).

Антитела против EGFR включают, в качестве неограничивающих примеров, цетуксимаб (Erbitux®); панитумумаб (Vectibix®); матузумаб (EMD-72000); нимотузумаб (hR3); залутумумаб; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1) и ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (рецептора HER2) (также известного как Neu, ErbB-2, CD340 или p185) включают, в качестве неограничивающих примеров, трастузумаб (Herceptin®); Пертузумаб (Omnitarg®); нератиниб (HKI-272, (2E)-N-[4-[(3-хлор-4-[(пиридин-2-ил)метокси]фенил)амино]-3-циано-7-этоксихинолин-6-ил]-4-(диметиламино)бут-2-енамид, описываемый в публикации РСТ № WO 05/028443); лапатиниб или лапатиниб дитозилат (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[(3S)тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1Н-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]карбаминовую кислоту, (3S)-3-морфолинилметиловый сложный эфир (BMS 599626, CAS 714971-09-2); канертиниб дигидрохлорид (PD183805 или CI-1033); и N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[(3α,5β,6α)-октагидро-2-метилцикlopента[c]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8).

Ингибиторы HER3 включают, в качестве неограничивающих примеров, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 и MEHD-7945A.

Ингибиторы МЕТ включают, в качестве неограничивающих примеров, кабозантиниб (XL 184, CAS 849217-68-1); форетиниб (GSK1363089, ранее известный как XL880, CAS 849217-64-7); тивантиниб (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-гидрокси-2-метилпропил)-N-(5-(7-метоксихинолин-4-илокси)пиридин-2-ил)-5-метил-3-оксо-2-фенил-2,3-дигидро-1Н-пиразол-4-карбоксамид (AMG 458); кризотиниб (Xalkori®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-дигидро-1Н-индол-1-илсульфонил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил]-1Н-пиррол-2-ил}метилен)-1,3-дигидро-2Н-индол-2-он (SU1 1271); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил]-1Н-пиррол-2-ил}метилен)-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU1 1274); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-{{3,5-диметил-4-(3-морфолин-4-илпропил)-1Н-пиррол-2-ил}метилен}-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU1 1606); 6-[дифтор[6-

(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-*b*]пиридин-3-ил]метил]хинолин (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(хинолин-6-илметил)-1Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиразин-6-ил]-1Н-пиразол-1-ил]этанол (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-диоксан-2-илметил)-N-метил-N'-[3-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-5-оксо-5Н-бензо[4,5]циклогепта[1,2-*b*]пиридин-7-ил]сульфамид (МК2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-пиридин-3-ил]тио]хинолин (SGX523, CAS 1022150-57-7); и (3Z)-5-[[2,(6-дихлорфенил)метил]сульфонил]-3-[[3,5-диметил-4-[(2R)-2-(1-пирролидинилметил-1)-1-пирролидинил]карбонил]-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-1,3-дигидро-2Н-индол-2-он (РНА665752, CAS 477575-56-7).

Ингибиторы IGF1R включают, в качестве неограничивающих примеров, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 и BI836845. См., например, обзор Yee, JNCI, 104; 975 (2012).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами нежелезащего пути передачи сигнала FGF, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы MEK, ингибиторы Braf, ингибиторы PI3K/Akt, ингибиторы SHP2, а также ингибиторы mTOR.

Например, ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы (MEK) включают, в качестве неограничивающих примеров, XL-518 (также известный как GDC-0973, CAS 1029872-29-4, доступный в ACC Corp.); 2-[(2-хлор-4-йодофенил)амино]-N-(циклогексилметокси)-3,4-дифторбензамид (также известный как CI-1040 или PD184352 и описываемый в публикации РСТ № WO 2000035436); N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокси]-3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодофенил)амино]бензамид (также известный как PD0325901 и описываемый в публикации РСТ № WO 2002006213); 2,3-бис-[амино[(2-аминофенил)тио]метилен]бутандинитрил (также известный как U0126 и описываемый в патенте США № 2779780); N-[3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодофенил)амино]-6-метоксифенил]-1-[(2R)-2,3-дигидроксипропил]циклогексансульфонамид (также известный как RDEA19 или BAY869766 и описываемый в публикации РСТ № WO 2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(этиламино)-8,9,16-тригидрокси-3,4-диметил-3,4,9,19-тетрагидро-1Н-2-бензоксопирамид (также известный как E6201 и описываемый в публикации РСТ № WO 2003076424); 2'-амино-3'-метоксифлавон (также известный как PD98059, доступный в Biaffin GmbH & Co., KG, Germany); вемурафениб (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-йодофениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиридин-4,7(3Н,8Н)-дион (ТАК-733, CAS 1035555-63-5); пимасертиб (AS-703026, CAS 1204531-26-9) и траметиниб диметил сульфоксид (GSK-1 120212, CAS 1204531-25-80).

Ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают, в качестве неограничивающих примеров, 4-[2-(1Н-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-*d*]пиридин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описываемый в публикациях РСТ № WO 09/036082 и WO 09/055730); 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-*c*]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описываемый в публикации РСТ № WO 06/122806); 4-(трифторметил)-5-(2,6-диморфолинопиридин-4-ил)пиридин-2-амин (также известный как BKM120 или NVP-BKM120 и описываемый в публикации РСТ № WO 2007/084786); то-засертиб (VX680 или МК-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидиндион (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E, 4S, 4aR, 5R, 6aS, 9aR)-5-(ацетилокси)-1-[(ди-2-пропениламино)метилен]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-октагидро-11-гидрокси-4-(метоксиметил)-4a,6a-диметил-циклогексента[5,6]нафто[1,2-*c*]пиран-2,7,10(1Н)-трион (PX866, CAS 502 632-66-8); и 8-фенил-2-(морфолин-4-ил)хромен-4-он (LY294002, CAS 154447-36-6).

Ингибиторы mTOR включают, в качестве неограничивающих примеров, темсиролимус (Torisel®); ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2 [(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R) -1 8-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексил диметилfosфинат, также известный как AP23573 и МК8669 и описываемый в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afmitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-бис-[*(3S)*-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиридин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксизетокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-*d*]пиридин-7(8Н)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4); и N<sup>2</sup>-[1,4-диоксо-4-[(4-оксо-8-фенил-4Н-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил-L-аргинилглицил-L- $\alpha$ -аспартил-L-серин-, внутренняя соль (SF1126, CAS 936487-67-1).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими проапоптотическими средствами, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы IAP, ингибиторы Bcl2, ингибиторы Mc11, средства Trail, ингибиторы Chk.

Например, ингибиторы IAP включают, в качестве неограничивающих примеров, NVP-LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 и TL32711. Другие примеры ингибиторов IAP включают, в качестве неограничивающих примеров, описываемые в WO 04/005284, WO 04/007529, WO 05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 и WO 08/134679, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Ингибиторы BCL-2 включают, в качестве неограничивающих примеров, 4-[4-[[2-(4-хлорфенил)-5,5-диметил-1-циклогексен-1-ил]метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[(1R)-3-(4-морфолинил)-1-[(フェニルтио)метил]пропил]амино]-3-[(трифторметил)сульфонил]фенил]сульфонил]бензамид (также известный как ABT-263 и описываемый в публикации PCT № WO 09/155386); тетрокарцин А; антимицин; госсипол ((-)BL-193); обатоклакс; этил-2-амино-6-цикlopентил-4-(1-циано-2-этокси-2-оксоэтил)-4Н-хромон-3-карбоксилат (HA14-1); облимерсен (G3139, Genasense®); пептид Bak BH3; (-)-госсиполуксусная кислота (AT-101); 4-[4-[(4'-хлор[1,1'-бифенил]-2-ил)метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[(1R)-3-(диметиламино)-1-[(フェニлтио)метил]пропил]амино]-3-нитрофенил]сульфонил]бензамид (ABT-737, CAS 852808-04-9); и навитоклакс (ABT-263, CAS 923564-51-6).

Агонисты проапоптотических рецепторов (PARA), включая DR4 (TRAILR1) и DR5 (TRAILR2), включая, в качестве неограничивающих примеров, дуланермин (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); мапатунумаб (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); лексатумумаб (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); апомаб (Apomab®); конатумумаб (AMG655, CAS 896731-82-1); и тигатузумаб (CS1008, CAS 946415-34-5, доступный в Daiichi Sankyo).

Ингибиторы Checkpoint Kinase (CHK) включают, в качестве неограничивающих примеров, 7-гидроксистауроспорин (UCN-01); 6-бром-3-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)-5-(3R)-3-пиперидинил-пиразоло[1,5-а]пиrimидин-7-амин (SCH900776, CAS 891494-63-6); 5-(3-фторфенил)-3-уреидотиофен-2-карбоновой кислоты N-[(S)-пиперидин-3-ил]амид (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[(3S)-1-азабицикло[2.2.2]окт-3-ил]амино]-3-(1Н-бензимидазол-2-ил)-6-хлорхинолин-2(1Н)-он (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-аминодактиномицин (7-AAD), изогранулотимид, дебромгимениалдизин; N-[5-бром-4-метил-2-[(2S)-2-морфолинилметокси]фенил]-N'-(5-метил-2-пиразинил)мочевину (LY2603618, CAS 911222-45-2); сульфорафан (CAS 4478-93-7, 4-метилсульфинилбутилизотиоцианат); 9,10,11,12-тетрагидро-9,12-эпокси-1Н-диндоло [1,2,3-fg;3',2',1'-k1] пирроло [3,4-i][1,6]бензодиазоцин-1,3(2Н)-дион (SB-218078, CAS 135897-06-2); и TAT-S216A (Sha et al., Mol. Cancer. Ther. 2007; 6(1): 147-153), и CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)ptqpt).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами FGFR. Например, ингибиторы FGFR включают, в качестве неограничивающих примеров, бриваниб аланинат (BMS-582664, (S)-(R) -1-(4-(4-фтор-2-метил-1Н-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)-2-аминопропаноат); варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); довитиниб лактилмолочная кислота (TKI258, CAS 852433-84-2); 3-(2,6-дихлор-3,5-диметокси-фенил)-1-{6-[4-(4-этил-пиперазин-1-ил)фениламино]-пиrimидин-4-ил}-1-метилмочевину (BGJ398, CAS 87251 1-34-7); данусертиб (PHA-739358); и (PD173074, CAS 219580-11-7). В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с ингибитором FGFR2, таким как 3-(2,6-дихлор-3,5-диметоксифенил)-1-{6((4-(4-этилпиперазин-1-ил)фенил)амино)пиrimидин-4-ил}-1-метилмочевину (также известную как BGJ-398); или 4-амино-5-фтор-3-(5-(4-метилпиперазин-1-ил)-1Н-бензо[d]имидазол-2-ил)хинолин-2(1Н)-он (также известный как довитиниб или TKI-258), AZD4547 (Gavine et al., 2012, Cancer Research 72, 2045-56, N-[5-[2-(3,5-диметоксифенил)этил]-2Н-пиразол-3-ил]-4-(3R,5S)-диметилпиперазин-1-ил)бензамид), понатиниб (AP24534; Gozgit et al., 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99; 3-[2-(имидаzo[1,2-b]пиридазин-3-ил)этинил]-4-метил-N-{4-[4-(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-3-(трифторметил)фенил}бензамид, CAS 943319-70-8).

#### Фармацевтические композиции.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций, включающих иммуноконъюгаты, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиции могут дополнительно содержать одно или несколько других терапевтических средств, подходящих для лечения или профилактики гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы.

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать посредством смешивания с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизованных порошков, суспензий, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York,

N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

В конкретном аспекте лекарственная форма для клинического исследования (CSF) лекарственных конъюгатов антител по настоящему изобретению является лиофилизатом в сосуде, содержащем ADC, сукцинат натрия и полисорбат 20. Лиофилизат можно восстанавливать с использованием воды для инъекций, раствор содержит ADC, сукцинат натрия, сахарозу и полисорбат 20 при pH приблизительно 5,0. Для последующего внутривенного введения полученный раствор, как правило, будут дополнительно разводить в растворе носителя.

Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость метаболизма вещества в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность вещества и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. В определенных аспектах с помощью схемы введения максимизируют количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Таким образом, количество доставляемого биологического средства частично зависит от конкретного вещества и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Доступно руководство по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и низкомолекулярных соединений (см., например, Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003; Milgrom et al., New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001; Beniaminovitz et al., New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000; Ghosh et al., New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003; Lipsky et al., New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000).

Определение соответствующей дозы осуществляют практикующий врач, например, с использованием параметров или факторов, которые, как известно, или как предполагают в этой области, или как прогнозируют, влияют на лечение. Как правило, дозу начинают с количества несколько меньше оптимальной дозы и затем повышают с малыми приращениями до достижения желаемого или оптимального эффекта относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические критерии включают симптомы, например, воспаления или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов.

Точные уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях лекарственных конъюгатов антител можно варьировать таким образом, чтобы получать количество активного ингредиента, являющееся эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов, известных в области медицины.

Композиции, содержащие антитела или их фрагменты, можно вводить с помощью непрерывной инфузии или дозами с интервалами, например, один день, одну неделю или 1-7 раз в неделю. Дозы можно вводить внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, внутрицеребрально или ингаляционно. Конкретный протокол дозирования включает максимальную дозу или частоту дозирования, с помощью которой избегают значительных нежелательных побочных эффектов.

В случае иммуноконъюгатов по настоящему изобретению доза, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 до 100 мг/кг массы тела пациента. Доза может составлять от 0,0001 до 20 мг/кг, от 0,0001 до 10 мг/кг, от 0,0001 до 5 мг/кг, от 0,0001 до 2 мг/кг, от 0,0001 до 1 мг/кг, от 0,0001 до 0,75 мг/кг, от 0,0001 до 0,5 мг/кг, от 0,0001 до 0,25 мг/кг, от 0,0001 до 0,15 мг/кг, от 0,0001 до 0,10 мг/кг, от 0,001 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 0,25 мг/кг или от 0,01 до 0,10 мг/кг массы тела пациента. Дозу антител или их фрагментов можно вычислять с использованием массы тела пациента в килограммах (кг), умноженной на дозу, подлежащую введению, в мг/кг.

Введения доз иммуноконъюгатов можно повторять и введения можно разделять по меньшей мере 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45 днями, 2 месяцами, 75 днями, 3 месяцами или по меньшей мере 6 месяцами. В конкретном аспекте введения доз иммуноконъюгатов по настоящему изобретению повторяют каждые 3 недели.

Эффективное количество в случае конкретного пациента может варьироваться в зависимости от факторов, таких как состояние, подвергаемое лечению, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical

Practice, Urch Publ., London, UK, 2001).

Путь введения может являться, например, местным или накожным нанесением, инъекцией или инфузией посредством внутривенного, интраперитонеального, внутримозгового, внутримышечного, внутрглазного, интраартериального, интрапереброспинального введения, введение в очаг поражения, или введением с помощью систем замедленного высвобождения или имплантата (см., например, Sidman et al., *Biopolymers* 22:547-556, 1983; Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277, 1981; Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105, 1982; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030-4034, 1980; патенты США № 63504 66 и 6316024). При необходимости композиция также может включать солюбилизатор или местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции, или и то, и другое. Кроме того, также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и состав с аэрозольным средством. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации РСТ № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Композицию по настоящему изобретению также можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества известных в этой области способов. Как будет понятно специалистам в этой области, путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Выбранные пути введения иммуноконьюгатов включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, интраперитонеальный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение может представлять собой способы введения, иные, чем энтеральное и местное введение, как правило, посредством инъекции, и включает, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, интраартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композицию по настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназальный, пероральный, вагинальный, ректальный, сублингвальный или местный. В одном из аспектов иммуноконьюгаты по настоящему изобретению вводят посредством инфузии. В другом аспекте иммуноконьюгаты вводят подкожно.

Если иммуноконьюгаты по настоящему изобретению вводят в системе с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, для достижения контролируемого или замедленного высвобождения можно использовать помпу (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery* 88:507, 1980; Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989). Для достижения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств иммуноконьюгатов можно использовать полимерные материалы (см., например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983; see also Levy et al., *Science* 228:190, 1985; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105, 1989; патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публикацию РСТ № WO 99/15154 и публикацию РСТ № WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в составах с замедленным высвобождением, включают, в качестве неограничивающих примеров, поли(2-гидрокси этилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(*N*-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), поликариламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) и полиортезифиры. В одном из аспектов полимер, используемый в составе с замедленным высвобождением, является инертным, несодержащим вымываемые примеси, стабильным при хранении, стерильным и биодеградируемым. Систему с контролируемым или замедленным высвобождением можно помещать вблизи профилактической или терапевтической мишени, таким образом, требуя лишь фракции системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, p. 115-138, 1984).

Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, *Science* 249: 1527-1533, 1990. Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащим один или несколько иммуноконьюгатов по настоящему изобретению, можно использовать любой способ, известный специалисту в этой области. См., например, патент США № 4526938, публикацию РСТ № WO 91/05548, публикацию РСТ № WO 96/20698, PCT publication WO 91/05548, PCT publication WO 96/20698, Ning et al., *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, 1996; Song et al., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek et al., *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997; and Lam et al., *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997, содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Если иммуноконьюгаты по настоящему изобретению вводят местно, их можно составлять в форме

мази, крема, трансдермального пластиря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой форме, хорошо известной специалисту в этой области. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). В случае нераспыляемых местных лекарственных форм, как правило, используют формы от вязких до полутвердых или твердые формы, содержащие носитель или один или несколько эксципиентов, совместимых с местным применением и имеющих динамическую вязкость, в некоторых случаях, большую, чем у воды. Подходящие составы включают, в качестве неограничивающих примеров, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, линименты, мази и т.п., которые, при желании, стерилизуют или смешивают со вспомогательными средствами (например, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, буферами или солями) для воздействия на различные свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие местные лекарственные формы включают распыляемые аэрозольные препараты, где активный ингредиент, в некоторых случаях, в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упаковывают в смеси с летучим веществом под давлением (например, газообразным пропеллером, таким как фреон) или в мягкой бутылке. При желании, в фармацевтические композиции и лекарственные формы также можно добавлять увлажнители. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в этой области.

Если композиции, содержащие иммуноконьюгаты, вводят интраназально, их можно составлять в аэрозольной форме, спрее, водного аэрозоля или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства для применения по настоящему изобретению может быть удобно доставлять в форме аэрозоля с помощью упаковок, находящихся под давлением, или небулайзера с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлордифторметана, дихлортетрафторэтана, диоксид углерода или другого подходящего газа). В случае аэрозоля под давлением можно определять единицу дозирования, предоставляя клапан для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе можно составлять содержащими смесь порошков соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

В этой области известны способы совместного введения или лечения с использованием второго терапевтического средства, например, цитокина, стероида, химиотерапевтического средства, антибиотика, или лучевой терапии (см., например, Hardman et al. (eds.) (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001), Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001), Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может снижать симптомы по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%; по меньшей мере на приблизительно 30%; по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%.

Дополнительные терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые можно вводить в комбинации с иммуноконьюгатами, можно вводить менее чем через 5 мин, менее чем через 30 мин, через 1 ч, через приблизительно 1 ч, через от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, через от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, через от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, через от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, через от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, через от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, через от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, через от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, через от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, через от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, через от приблизительно 11 до приблизительно 12 ч, через от приблизительно 12 до 18 ч, через от 18 до 24 ч, через от 24 до 36 ч, через от 36 до 48 ч, через от 48 до 52 ч, через от 52 до 60 ч, через от 60 до 72 ч, через от 72 до 84 ч, через от 84 до 96 ч или через от 96 до 120 ч после иммуноконьюгатов по настоящему изобретению. Два или более терапевтических средств можно вводить в течение одного посещения пациента.

В определенных аспектах иммуноконьюгаты можно составлять для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гемато-энцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения BBB терапевтическими соединениями по настоящему изобретению (при желании), их можно составлять, например, в липосомах. Способы производства липосом, см., например, в патентах США № 4 522 811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одно или несколько веществ, избирательно транспортируемых в конкретные клетки или органы, таким образом, повышая направленную доставку лекарственного средства (см., например, Ranade (1989), J. Clin. Pharmacol. 29:685). Примеры направляющих веществ включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 Low et al.); маннозиды (Umezawa et al. (1988), Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); антитела (Bloeman et al. (1995), FEBS Lett. 357: 140; Owais et al. (1995), Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); рецептор белка сурфактанта A (Briscoe et al. (1995), Am. J. Physiol. 1233: 134); p. 120 (Schreier et al. (1994), J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994), FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994), Immunomethods 4:273.

Настоящее изобретение относится к протоколам введения фармацевтической композиции, содержащей иммуноконьюгаты в отдельности или в комбинации с другими терапевтическими средствами,

нуждающемуся в этом индивидууму. Комбинированные терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) можно вводить индивидууму одновременно или последовательно. Терапевтическое средство (например, профилактические или терапевтические средства) из комбинированных терапевтических средств также можно вводить циклически. Циклическая терапия включает введение первого терапевтического средства (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени с последующим введением второго терапевтического средства (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени и повторение этого последовательного введения, т.е. цикла, для снижения развития резистентности к одному из терапевтических средств (например, средств) для избегания или снижения побочных эффектов одного из терапевтических средств (например, средств) и/или для улучшения эффективности терапевтических средств.

Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) из комбинированных терапевтических средств по настоящему изобретению можно вводить индивидууму одновременно.

Термин "одновременно" не ограничен введением терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств) точно в одно и то же время, но скорее означает, что фармацевтическую композицию, содержащую антитела или их фрагменты, вводят индивидууму последовательно и в пределах временного интервала таким образом, что иммуноконъюгаты могут действовать совместно с другими терапевтическими средствами для обеспечения повышенного благоприятного эффекта относительно того, как если бы их вводили иначе. Например, каждое терапевтическое средство можно вводить индивидууму одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводят одновременно, их необходимо вводить достаточно близко по времени, таким образом, обеспечивая желаемый терапевтический или профилактический эффект. Каждое терапевтическое средство можно вводить индивидууму раздельно в любой соответствующей форме и любым подходящим путем. В различных аспектах терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) вводят индивидууму с интервалом менее 15 мин, менее 30 мин, менее 1 ч, приблизительно 1 ч, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, от приблизительно 11 до приблизительно 12, 24, 48, 72 ч или 1 неделя. В других аспектах два или более терапевтических средства (например, профилактических или терапевтических средств) вводят в течение одного посещения пациента.

Профилактические или терапевтические средства из комбинированных терапевтических средств можно вводить индивидууму в одной фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические средства из комбинированных терапевтических средств можно вводить индивидууму одновременно в отдельных фармацевтических композициях. Профилактические или терапевтические средства можно вводить индивидууму одним или разными путями введения.

### Примеры

Пример 1. Получение Ab против cKIT с помощью гибридомной технологии.

Антитела и другие белки.

Клеточную линию с транзиторной экспрессией, секретирующую белок cKIT человека, получали трансфекцией клеток 293 Freestyle™ (Invitrogen, Carlsbad, Ca). В кратком изложении, клетки, культивируемые в среде Freestyle™ (Invitrogen), трансфицировали с использованием реагента для трансфекции 293Fectin™ и рекомбинантной плазмида, содержащей ECD из кДНК cKIT человека и метку His6 на C-конце последовательности или Fc мыши (pFUSE, Invivogen, San Diego, CA). Через 48-72 ч среды центрифугируют для удаления клеток, стерилизуют фильтрацией и используют очищенный лизат для очистки белка.

В случае His6-меченного cKIT: Полученный концентрат наносили на колонку NiNTA His-Bind Superflow при скорости 0,5 мл/мин. После исходного промывания с помощью PBS связавшийся материал элюировали с использованием PBS со ступенчатым градиентом имидазола (10-500 мМ). Полученный элюат дialisировали относительно PBS, pH 7,3, стерилизовали фильтрацией и аликовитировали. В случае слияния Fc-cKit использовали колонки Protein G fastFlow (вместо NiNTA) как описано выше, и элюировали с глициновым буфером, pH 3, который нейтрализовали с использованием Трис, pH 8.

Получение гибридомы.

Иммунизация мышей и получение гибридом.

Очищенный cKIT разбавляли 1:1 полным адьювантом Фрейнда перед иммунизацией трансгенных по Bcl-2 мышей (линия C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 Wehi). Мышей иммунизировали с использованием способа, предусматривающего многократную иммунизацию с использованием нескольких участков (RIMMS) (McIntyre GD., Hybridoma, 1997). В кратком изложении, мышам инъектировали 1-3 мкг антигена в 8 конкретных участков вблизи периферических лимфоузлов (PLN). Эту процедуру повторяли 8 раз в течение 12 дней. В день 12 собирали тестируемую кровь и анализировали титр антител в сыворотке с помощью

ELISA. В день 15 у мышей с высоким титром удаляли объединенные PLN. Для сбора лимфоцитов PLN два раза промывали DMEM без добавок, а затем разъединяли, пропуская через экран 0,22 мкм (Falcon #352350, BD Bioscience, San Jose, CA). Полученные лимфоциты промывали еще 2 раза перед слиянием. Миеломные клетки F0 смешивали с лимфоцитами в соотношении 2,5 лимфоцитов к 1 клетке F0. Смесь клеток центрифугировали, а затем к клеточному осадку по каплям добавляли 1 мл PEG 1500 в течение 1 мин. Через 30 с медленно добавляли 1 мл DMEM и через 1 мин добавляли 19 мл DMEM в течение 5 мин. Подвергнутые слиянию клетки осаждали, суспендировали при плотности  $2 \times 10^5$  клеток/мл в средах НАТ (DMEM+20% FBS, Pen/Strep/Glu, 1-кратный NEAA, 1-кратный НАТ, 0,5-кратный HFCS) и помещали при 37°C на 1 ч. Затем клетки помещали в 384-луночные планшеты при 60 мкл/лунку.

Скрининг гибридом, секрецирующих антитела против cKIT.

Через десять дней после слияния, планшеты с гибридомой подвергали скринингу на наличие cKIT-специфичных антител. Для скрининга с помощью ELISA 384-луночные планшеты Maxisorp (Nunc #464718) покрывали 50 мкл cKIT (разбавленного до 15 нг/лунку в PBS) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Оставшийся белок отсасывали и лунки блокировали 1% BSA в PBS. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре лунки промывали четыре раза PBS+0,05% Tween (PBST). 15 мкл супернатанта гибридомы переносили на планшеты для ELISA. 15 мкл сыворотки мыши, взятой во время удаления PLN, разбавляли 1:1000 в PBS и добавляли в качестве положительного контроля. 50 мкл вторичного антитела (HRP-конъюгированного антитела козы против IgG мыши (Jackson Immuno Research #115-035-071, West Grove, PA), разбавленного 1:5000 в PBS) добавляли во все лунки на планшетах для ELISA. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшеты восемь раз промывали PBST. Добавляли 25 мкл TMB (KPL #50-76-05) и через 30 мин инкубации при комнатной температуре считывают оптическую плотность в планшетах при 605 нм. Клетки из положительных лунок выращивали в 24-луночных планшетах в средах НТ (DMEM+20% FBS, Pen/Strep/Glu, 1-кратный NEAA, 1-кратный НТ, 0,5-кратная HFCS).

Очистка антитела.

Супернатант, содержащий антитела против cKIT, очищали с использованием протеина G (Upstate #16-266 (Billerica, MA)). Перед нагрузкой супернатантом смолу уравновешивали 10 объемами колонки PBS. После связывания образца колонку промывали 10 объемами колонки PBS, а затем элюировали антитело 5 объемами колонки 0,1 М глицина, pH 2,0. Фракции колонки незамедлительно нейтрализовали 1/10 объема Трис-HCl, pH 9,0. Измеряли OD280 фракции и положительные фракции объединяли и дialisовали в течение ночи относительно PBS, pH 7,2.

Пример 2. Гуманизация и созревание аффинности антител против cKIT.

Дизайн гуманизации.

Последовательностями VH и VL антитела против cKIT 9Р3, полученного из гибридомы, являются SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 18 соответственно. Аминокислотными последовательностями константных доменов IgG1 человека, используемых для получения полного IgG1, являются SEQ ID NO: 10 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 19 для легкой цепи. Гуманизацию тяжелой цепи осуществляли граffтингом 3 областей CDR (GFTFSDDYYMA (SEQ ID NO: 148)), (NINYDGSSTYYLDS (SEQ ID NO: 149)) и (GDY-YGTTWYFDV (SEQ ID NO: 150)) из антитела против cKIT 9Р3 на акцепторный каркас зародышевой линии человека VH3 3-07 (база данных vBASE). Гуманизацию легкой цепи осуществляли граffтингом 3 областей CDR (RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 151)), (YTSLRLQS (SEQ ID NO: 152)) и (QQGKKLWS (SEQ ID NO: 153)) из антитела против cKIT 9Р3 на акцепторный каркас зародышевой линии человека VK3-L25 (база данных vBASE) или граffтингом 2 областей CDR (SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 153) на акцепторный каркас зародышевой линии человека VK1-012 (база данных vBASE). В дополнение к областям CDR, из последовательности 9Р3 оставляли один каркасный остаток из вариабельного домена легкой цепи, т.е. VL #71 и в случае VK3-L25 VL #79 (нумерация остатков на основе SEQ ID NO: 21). Кроме того, J-элементы человека JH4 и JK4 использовали для тяжелой и легкой цепи соответственно. Полученной аминокислотной последовательностью тяжелой цепи гуманизированного антитела являлась SEQ ID NO: 11, и в случае двух легких цепей - SEQ ID NO: 20 (VK1-012) и SEQ ID NO: 21 (VK3-L6).

Авторы настоящего изобретения выдвигали гипотезу о том, что аспартатный аминокислотный мотив с последующим глицином (DG) может являться восприимчивым к посттрансляционной модификации (образованию изоаспартата), и что лизины в CDR могут снижать фракцию активного антитела после конъюгации антитела и лекарственного средства. Для оптимизации гуманизированных антител использовали комбинацию случайного мутагенеза (т.е. ПЦР пониженной точности) и направленного мутагенеза.

Получение гуманизированных последовательностей.

Последовательности ДНК, кодирующие гуманизированные домены VL и VH, заказывали в GeneArt (Life Technologies Inc. Regensburg, Germany), включая оптимизацию кодонов для homo sapiens. Последовательности, кодирующие домены VL и VH, субклонировали с помощью вырезания и вставки из векторов, полученных из GeneArt, в экспрессирующие векторы, подходящие для секреции в клетках млекопитающих. Тяжелые и легкие цепи клонировали в отдельные экспрессирующие векторы, чтобы сделать

возможной котрансфекции. Элементы экспрессирующего вектора включают промотор (энхансер-промотор цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, делающий возможной эпизомную репликацию и репликацию в прокариотах (например, точку начала репликации SV40 и ColE1 или другие известные в этой области), и элементы, делающие возможной селекцию (ген резистентности к ампициллину и маркер зеоцин).

#### Экспрессия и очистка гуманизированных антител.

Эмбриональные клетки почки человека, конститутивно экспрессирующие большой антиген Т SV40 (HEK293-T ATCC11268), являются одними из предпочтительных линий клеток-хозяев для транзиторной экспрессии гуманизированных и/или оптимизированных белков IgG. Трансфекцию осуществляют с использованием PEI (полиэтиленимина, MW 25000, линейный, Polysciences, USA, кат. № 23966) в качестве реагента для трансфекции. Стоковый раствор PEI получают, осторожно растворяя 1 г PEI в 900 мл воды категории для культивирования клеток при комнатной температуре (RT). Для облегчения растворения PEI раствор подкисляют добавлением HCl до pH 3-5 с последующей нейтрализацией с помощью NaOH до конечного pH 7,05. В конечном итоге, объем доводят до 1 л и фильтруют раствор через фильтр 0,22 мкм, аликвотируют и замораживают при -80°C до дальнейшего использования. После размораживания аликвоту можно снова замораживать до 3 раз при -20°C, но нельзя длительно хранить при -20°C. Клетки HEK293T культивируют с использованием патентованной бессывороточной среды для культивирования Novartis для трансфекции и выращивания клеток и бессывороточной среды для культивирования ExCell VPRO (SAFC Biosciences, USA, кат. № 24561C) в качестве среды для продукции/питательной среды. Клетки, полученные для транзиторной трансфекции, культивируют в суспензионной культуре. В случае маломасштабных (<5 л) трансфекций клетки выращивают во встряхиваемых колбах Corning (Corning, Tewksbury, MA) на орбитальном шейкере (100-120 об/мин) во влажной камере при 5% CO<sub>2</sub> (колбы для посевных культур). Клетки в посевных культурах необходимо поддерживать в фазе экспоненциального роста (при плотностях клеток от 5×10<sup>5</sup> до 3×10<sup>6</sup>/мл), и для трансфекций они должны демонстрировать жизнеспособность >90%. Плотности клеток вне этого диапазона будут приводить к лаг-фазе после разведения или сниженней эффективности трансфекций. В случае маломасштабной (<5 л) трансфекций отбирают аликвоту клеток из посевных культур и доводят до 1,4×10<sup>6</sup> клеток/мл в 36% конечного объема с помощью бессывороточной среды для культивирования Novartis. Раствор ДНК (раствор 1: 0,5 мг плазмида, экспрессирующей тяжелую цепь, и 0,5 мг плазмида, экспрессирующей легкую цепь, для трансфекций в 1 л) получают разбавлением ДНК до 1 мг/л (конечный объем) в 7% конечного объема культуры с последующим осторожным перемешиванием. Для предотвращения бактериальной контаминации этот раствор фильтруют с использованием фильтра 0,22 мкм (например, Millipore Stericup). Затем 3 мг/л (конечный объем) раствора PEI также разводят в 7% конечного объема культуры и осторожно перемешивают (раствор 2). Оба раствора инкубируют в течение 5-10 мин при комнатной температуре (RT). Затем раствор 2 добавляют в раствор 1 при осторожном перемешивании и инкубируют еще 5-15 мин при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекций добавляют к клеткам и продолжают культивирование клеток в течение 4-6 ч. В конечном итоге, оставшиеся 50% общего объема продукции получают добавлением бессывороточной среды для культивирования ExCell® VPRO. Культивирование клеток продолжают в течение одиннадцати дней после трансфекций. Культуру собирают посредством центрифугирования при 4500 об/мин в течение 20 мин при 4°C (Heraeus®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Rockford, IL). Полученный супернатант клеток стерилизуют фильтрацией через фильтр Stericup (0,22 мкм) и хранят при 4°C до дальнейшей обработки.

Очистку осуществляли с помощью системы для хроматографии "AKTA 100 explorer Air" при 4°C в охлаждаемой камере с использованием свежепропареной (0,25 M NaOH) колонки HiTrap ProtA MabSelect®SuRe, 5 мл. Колонку уравновешивали 5 объемами колонки (CV) PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), в затем стерилизованный фильтрацией супернатант (2 л) нагружали при 4,0 мл/мин. Колонку промывали 8 CV PBS для элюирования несвязавшегося образца и снова промывали 5 CV PBS. Антитело элюировали 5 CV 50 mM цитрата, 70 mM NaCl pH 3,2. Элюат собирали в 3 мл фракциях; фракции объединяли и доводили до pH 7 с помощью 1 M Трис-HCl, pH 10. Совокупности объединяли и стерилизовали фильтрацией (Millipore Steriflip, 0,22 мкм), измеряли OD 280 нм с помощью спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop), и вычисляли концентрацию белка с учетом данных о последовательности. Элюат тестировали на агрегацию (SEC-MALS) и чистоту (SDS-PAGE, LAL и MS). Для второго этапа очистки, при необходимости, совокупности, полученные при первой очистке, нагружали на свежепропаренную (0,5 M NaOH) SPX (Hi Load 16/60 Superdex 200 категории 120 мл (GE-Healthcare)). Колонку уравновешивали PBS и осуществляли эксперимент с использованием буфера PBS при 1 мл/мин, элюат собирали в 1,2 мл фракции и анализировали, как описано для первого этапа очистки.

#### Пример 3. Скрининг на антитела против cKIT.

#### Пэннинг HuCAL PLATINUM®.

Для селекции антител, распознающих cKIT человека, использовали множество стратегий пэннинга. Терапевтические антитела против белков cKIT человека получали посредством селекции клонов, имею-

ших высокие аффинности связывания, с использованием в качестве источника вариантов белков антител коммерчески доступную библиотеку фагового дисплея, библиотеку Morphosys HuCAL PLATINUM® (Morphosys, Munich DE). Фагмидная библиотека основана на концепции HuCAL® (Knappik et al. (2000), J. Mol. Biol. 296: 57-86), и в ней используют технологию CysDisplay® для экспонирования Fab на поверхности фага (Lohning, WO 01/05950). Для выделения антител против cKIT стандартные стратегии пэннинга осуществляли с использованием подходов твердофазного пэннинга, пэннинга в растворе, пэннинга целых клеток и дифференциального пэннинга целых клеток.

#### Твердофазный пэннинг против cKIT.

96-луночный планшет Maxisorp™ покрывали слитым белком cKIT человека или мыши/Fc в течение ночи при 4°C. Для каждого пэннинга приблизительно  $4 \times 10^{13}$  фаговых антител HuCAL PLATINUM® добавляли к каждому покрывающему антигену и инкубировали в течение 2 ч при RT на шейкере для планшетов для микротитрования. Затем неспецифически связавшиеся фаги вымывали с помощью нескольких этапов промывки и специфически связавшиеся фаги элюировали с использованием 25 mM DTT в 10 mM Трис/HCl, pH 8.

Элюат переносили в 14 мл бактерий E.coli и инкубировали для инфицирования фагом. Инфицированные бактерии ресусPENDИРОВАЛИ в среде 2xYT, переносили на чашки с агаром LB/Cam и инкубировали в течение ночи. Колонии соскребали с чашек и использовали для выделения фага, поликлональной амплификации выбранных клонов и продукции фага. Следующий раунд пэннинга начинали с очищенно-го фага.

Второй и третий раунд твердофазного пэннинга осуществляли по протоколу первого раунда, за исключением снижения количеств антигена и более жестких условий промывки.

#### Пэннинг с захватом против cKIT.

Для пэннинга с захватом слитые белки антиген cKIT/Fc мыши иммобилизовали на 96-луночном планшете Maxisorp™ с помощью иммобилизованного антитела козы против Fc мыши. При блокировании фага к блокирующему буферу добавляли γ-глобулин человека и мыши для избежания селекции антител против иммобилизованного антитела и части Fc мыши антигена. Покрытие антигеном и блокирование фага при пэннинге с захватом осуществляли, как описано для твердофазного пэннинга (см. выше).

#### Пэннинг в растворе с использованием магнитных частиц, связанных со стрептавидином.

Пэннинг в растворе осуществляли двумя разными способами ("классическим" и "альтернативным"). Для каждого пэннинга приблизительно  $4 \times 10^{13}$  фаговых антител HuCAL PLATINUM® блокировали равным объемом 2-кратного Chemiblocker/0,1% Tween20. Для удаления фага, связывающегося со стрептавидином или частицами, предсорбцию блокированных фаговых частиц осуществляли два раза, каждый раз с использованием 1 мг блокированных стрептавидиновых частиц.

а) "Классический" способ: биотинилированное mAb 16P23 инкубировали с белком ECD cKIT человека-His и добавляли к блокированным фаговым частицам. Антитело 16P23 является полученная для внутреннего пользования гибридома, и его использовали в различных протоколах скрининга в качестве иммобилизованного антитела для экспонирования различных доменов на ECD cKIT. Антитело 16P23 также использовали для связывания антитела. После инкубации комплексы фаг-антigen иммобилизовали с использованием стрептавидиновых частиц и фаговые частицы, связавшиеся со стрептавидиновыми частицами, собирали с использованием магнитного сепаратора.

б) "Альтернативный" способ: биотинилированное mAb 16P23 добавляли к стрептавидиновым частицам и смесь антитела и частиц инкубировали на ротаторе при RT в течение 30 мин. Частицы промывали и ресусPENDИРОВАЛИ в PBS, содержащем белок ECD cKIT человека-His. Затем, добавляли фаг и комплекс антитело-частица-антиген-фаг перемешивали на ротаторе еще в течение 1 ч при RT. После этого последнего этапа инкубации частицы иммобилизовали с использованием магнитного сепаратора и отбирали супернатанты.

Используя оба способа дисплея, неспецифически связавшийся фаг вымывали с помощью нескольких этапов промывки с использованием PBS/0,05% Tween20 и PBS. Специфически связавшийся фаг элюировали из стрептавидиновых частиц с использованием 25 mM DTT в 10 mM Трис/HCl, pH 8. Последующее инфицирование фагом и продукцию фага осуществляли согласно протоколу твердофазного пэннинга.

Второй и третий раунд пэннинга в растворе осуществляли по протоколу первого раунда, за исключением снижения количеств антигена и более строгих условий промывки.

#### Пэннинг целых клеток против cKIT.

Клетки-мишени, экспрессирующие антиген cKIT человека, мыши или крысы, использовали в качестве антигенов и приводили в контакт с HuCAL PLATINUM® фаг-антителами для пэннинга. Комплексы фаг-клетка промывали три раза в PBS/5% FCS. Элюирование специфически связавшегося фага из клеток-мишеней осуществляли с использованием 0,1 М глицин-HCl/0,5 М NaCl, pH 2,2. Последующее инфицирование фагом и продукцию фага осуществляли согласно протоколу твердофазного пэннинга. Второй и третий раунд пэннинга целых клеток осуществляли по протоколу первого раунда.

#### Дифференциальный пэннинг целых клеток против cKIT.

При дифференциальном пэннинге целых клеток селекцию осуществляли поочередно на клетках и очищенном белке. Раунды селекции на очищенном антигене осуществляли, как описано протоколе твердофазного пэннинга. Раунды селекции на клетках см. в разделе о пэннинге целых клеток против сKIT.

#### Пэннинг созревания.

Для получения специфических антител с повышенными аффинностями осуществляли пэннинг созревания (Prassler et al., Future Med. Immuno. 2009 1 (4): 571-583)). С этой целью секвенированные клонны, уже протестированные на специфическое связывание с сKIT, использовали для замены кассет LCDR3 или HCDR2. Затем осуществляли два раунда твердофазного пэннинга с использованием слитого белка сKIT человека и/или мыши/Fc, как описано в протоколе твердофазного пэннинга.

а) Для LCDR3 RapMAT®: Fab-кодирующие фрагменты полученной из фага ДНК вектора pMORPFBO® (Morphosys, Munich DE) ферментативно расщепляли и заменяли вставки кассетами созревания TRIM™ LCDR3 (Virnekaes et al., NAR 1994 22(25):5600-5607)). Затем, 1,25 мкг вектора для дисплея pMORPFBO® лигировали с фрагментом вставки, несущим диверсифицированные LCDR3.

б) Для HCDR2 RapMAT®: после 2-го раунда пэннинга Fab-кодирующие фрагменты полученной из фага ДНК вектора pMORPFBO® ферментативно расщепляли и заменяли вставки кассетами созревания TRIM™ HCDR2 (Virnekaes et al., выше). Затем, 1,25 мкг вектора для дисплея pMORPFBO® лигировали с фрагментом вставки, несущим диверсифицированные HCDR2.

Полученные библиотеки амплифицировали и подвергали двум раундам пэннинга с повышенной жесткостью и сниженной концентрацией антигена или изменениями антигена сKIT человека и мыши для идентификации клонов с улучшенной аффинностью.

#### Получение Fab-содержащих бактериальных лизатов для скрининга с помощью ELISA.

Для исходного скрининга и характеристации ночную культуру отдельных Fab-экспрессирующих клонов E.coli лизировали с использованием лизоцима, 4 мМ ЭДТА и 10 Ед./мкл бензоназы. Fab-содержащие лизаты E.coli использовали для скрининга с помощью ELISA, FACS и SET.

#### Скрининг Fab-содержащих необработанных бактериальных лизатов.

#### Скрининг с помощью ELISA.

Используя скрининг с помощью ELISA, отдельные клоны Fab из результатов пэннинга идентифицируют по связыванию с антигеном-мишенью. Fab тестируют с использованием Fab-содержащих необработанных лизатов E.coli.

#### ELISA для проверки экспрессии Fab.

Для подтверждения экспрессии Fab в полученных лизатах E.coli 384-луночные планшеты Maxisorp™ (Nunc, Sigma-Aldrich, St.Louis MO) покрывали антителом овцы против IgG человека, специфичным к Fd-фрагменту, разведенным 1:1000 в PBS. После блокирования 5% сухим обезжиренным молоком в PBS, содержащим 0,05% Tween20, добавляли Fab-содержащие лизаты E.coli. Затем связавшиеся HuCAL®-Fab-фрагменты детектировали посредством инкубации с F (ab)-2-специфичным антителом козы против IgG человека, конъюгированным с щелочной фосфатазой (разведенным 1:5000), с последующим добавлением флуоресцентного субстрата AttoPhos® (Roche, #11681982001, Mannheim, DE). Флуоресценция при 535 нм регистрировали с возбуждением при 430 нм. Скрининг ELISA на прямом покрытии антигеном 384-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали mFc-меченым белком ECD сKIT человека в концентрации 10 мкг/мл в PBS. После блокирования планшетов 5% сухим обезжиренным молоком в PBS добавляли Fab-содержащие лизаты E.coli. Связывание Fab детектировали с использованием F(ab)-2-специфичного антитела козы против IgG человека, конъюгированного с щелочной фосфатазой (разведенным 1:5000), с использованием флуоресцентного субстрата Attophos® (Roche, #11681982001, Mannheim, DE). Флуоресценцию при 535 нм регистрировали с возбуждением при 430 нм.

#### Связывание epitопа Fab BEL лизатами.

Для идентификации потенциальных связывающих лиганд конкурентов перед созреванием аффинности, осуществляли скрининг с помощью конкурентного ELISA с использованием лизатов Fab E.coli и антитела 16P23, известного связывающего лиганд конкурента. С этой целью, 384-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали mFc-меченым белком ECD сKIT человека и блокировали, как описано выше (Скрининг ELISA на прямом покрытии антигеном).

Добавляли mAb 16P23 в конечной концентрации 5 мкг/мл с последующей инкубацией с Fab-содержащими лизатами E.coli. В конечном итоге, связывание Fab детектировали с помощью конъюгированного с щелочной фосфатазой антитела против FLAG (Sigma A-9469, разведенного до 1:10000) с использованием флуоресцентного субстрата Attophos® (Roche, #11681982001). Флуоресценцию при 535 нм регистрировали с возбуждением с 430 нм.

#### Скрининг с помощью FACS.

При скрининге с помощью FACS из результатов пэннинга идентифицируют отдельные клоны Fab, связывающиеся с поверхностью клеток, экспрессирующих антиген. Fab тестируют с использованием Fab-содержащих необработанных лизатов E.coli.

#### Скрининг с помощью FACS осуществляли в формате 96- или 384-луночного планшета:

а) В формате 96-луночного планшета с использованием устройства BD FACS 100 мкл суспензии

клеток переносили на новый 96-луночный планшет (получая  $1 \times 10^5$  клеток/лунку). Планшет, содержащий целевую клеточную суспензию, центрифугировали и удаляли супернатант. Оставшийся клеточный осадок ресуспендировали и в соответствующие лунки добавляли 50 мкл Fab-содержащих экстрактов BEL. Планшет инкубировали на льду в течение 1 ч. После инкубации клетки центрифугировали и три раза промывали 200 мкл буфера для FACS (PBS, 3% FCS). После каждого этапа промывки клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали. Добавляли вторичное детекторное антитело (РЕ-конъюгированное антитело козы против IgG человека; Dianova, Hamburg, DE) и образцы инкубировали на льду, а затем промывали в соответствии с инкубацией Fab. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS на лунку и анализировали образцы с помощью устройства BD FACS.

b) В формате 384-луночного планшета с использованием устройства BD Calibur® HTS (BD Biosciences, San Jose, CA) 20 мкл суспензии клеток переносили в новый 384-луночный круглодонный планшет (получая  $4 \times 10^4$  клеток/лунку). Планшет, содержащий клеточную суспензию, центрифугировали и удаляли супернатант. Оставшийся клеточный осадок ресуспендировали и в соответствующие лунки добавляли 20 мкл Fab-содержащих экстрактов. Планшет инкубировали в течение 1 ч со встряхиванием при 4°C. После инкубации клетки центрифугировали и три раза промывали 40 мкл буфера для FACS (PBS, 3% FCS). После каждого этапа промывки клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали. Добавляли 4 0 мкл РЕ-конъюгированного детекторного антитела козы против человека и инкубировали образцы на льду, а затем промывали в соответствии с инкубацией Fab. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспендировали в 35 мкл буфера для FACS на лунку и образцы измеряли с использованием устройства BD FACS Calibur/HTS.

#### Определение аффинности.

Для определения  $K_D$  использовали мономерные фракции белка антитела (содержание мономера по меньшей мере 90%, анализируемое с помощью аналитического SEC; Superdex 75 PC3.2/30 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) для Fab, или Tosoh TSKgel G3000 SW<sub>XL</sub> (7,8 мм/30,0 см) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, DE) для IgG, соответственно).

Способ равновесного титрования раствора (SET) для определения  $K_D$  с использованием Sector Imager 6000 (MSD).

Определение аффинности в растворе, по существу, осуществляли как описано в литературе (Friquet et al., J. Immuno. Meth. 1985; 77:305-319). Для улучшения чувствительности и точности способа SET, его преобразовывали из классического ELISA в технологию на основе ECL (Haenel et al., Anal. Biochem. 2005 339(1):182-4). 1 мг/мл специфических к (Fab)<sub>2</sub>-фрагменту антител козы против человека (Dianova) метили MSD Sulfo-TAG™ NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) по инструкциям производителя. Планшеты MSD покрывали антигеном и на них переносили уравновешенные образцы. После промывки в планшет MSD добавляли 30 мкл на лунку MSD-sulfo-tag-меченого детекторного антитела (против (Fab)<sub>2</sub> человека) и инкубировали на шейкере. После промывки планшета MSD и добавления 30 мкл/лунку MSD Read Buffer T с поверхностно-активным веществом детектировали сигналы электрохемилуминесценции с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Данные оценивали с использованием программного обеспечения XLfit (IDBS), в котором используют специализированные модели аппроксимации. Для определения  $K_D$  молекул Fab использовали следующую модель аппроксимации (по (Haenel et al., Anal. Biochem 2005; 339(1): 182-184), модифицированную по (Abraham et al., J. Mol. Recogn 1996; 9:456-461)):

$$y = B_{\max} - \left( \frac{B_{\max}}{2[Fab]} \left( [Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

[Fab]<sub>t</sub>: используемая общая концентрация Fab;

x: используемая общая концентрация растворимого антигена (участков связывания);

$B_{\max}$ : максимальный сигнал Fab без антигена;

$K_D$ : аффинность.

Для определения  $K_D$  молекул IgG следующую модель аппроксимации (модифицированную по (Piehler et al., 1997)):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left( \frac{[IgG]}{2} - \frac{\left( \frac{x+[IgG]+K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x+[IgG]+K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]: используемая общая концентрация IgG;

x: используемая общая концентрация растворимого антигена (участков связывания);

$B_{\max}$ : максимальный сигнал IgG без антигена;

$K_D$ : аффинность.

### Экспериментальные условия.

Определение K<sub>D</sub> HuCAL® IgG против сcKIT, по существу, осуществляли следующим образом: сcKIT человека-Fc покрывали при 0,1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C на стандартных планшетах MSD/буфере для анализа в течение 1 ч при RT на планшетах MSD со стрептавидином. Затем планшеты MSD блокировали PBS с 3% BSA в течение 1 ч при RT. Планшеты со стрептавидином блокировали в течение ночи при 4°C с использованием PBS с 5% BSA перед покрытием антигеном. Для титрования использовали антиген сcKIT человека-His.

Затем, количественного анализировали концентрацию несвязавшегося Fab с помощью детекции ECL с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA). Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения XLfit (IDBS), в котором используют соответствующую модель аппроксимации для оценки аффинностей и, таким образом, идентификации клонов, наиболее улучшенных с помощью созревания.

### Биохимические анализы *in vitro* (анализ перекрестной реактивности и связывания доменов).

Очищенные IgG тестировали с помощью ELISA на связывание с полноразмерными белками ECD сcKIT человека, яванского макака и мыши, а также конструкциями доменов ECD сcKIT человека D1-3 и D4-5. С этой целью планшеты покрывали антигеном в концентрации 5 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Связывание IgG детектировали с помощью F(ab)<sub>2</sub> против человека или против мыши, конъюгированного с щелочной фосфатазой (разведенного 1:5000 в 1% MPBS), с использованием Attophos® в качестве субстрата. Флуоресценцию измеряли при возбуждении при 430 нм и эмиссии при 535 нм.

### Сортировка очищенных IgG по эпигенотипу.

Очищенные кандидаты IgG тестировали на конкуренцию с полученными для внутреннего пользования исследовательскими антителами, которые, как показано ранее, определяют отдельные "бины" на внеклеточном домене сcKIT. С этой целью планшеты Maxisorp™ покрывали IgG при постоянном количестве и тестировали на конкуренцию с повышающимися количествами конкурентного IgG в растворе. В качестве положительного контроля IgG покрытия анализировали на конкуренцию с самим собой в растворе. Все тестируемые IgG преинкубировали в 50-кратном избытке с гликобиотинилированным слизевым белком сcKIT человека-Fc в течение 1 ч при RT в растворе. Затем комплексы антиген/антитело добавляли к покрытым антителам и осуществляли детекцию связавшихся комплексов с помощью биотинилированного антигена. В целом, сигналы при высокой концентрации IgG можно получать только, когда IgG покрытия способны связываться с доступными эпигенотипами на антигене, различными для тестируемых IgG в растворе (т.е. неконкурирующее антитело). Наоборот, в случае конкурирующих антител, антител с частично перекрывающимися эпигенотипами или антител, блокирующих эпигенотип посредством стерического несоответствия, сигналы связывания при высокой концентрации IgG значительно снижались в отличие от контролей.

Соответствующие лунки планшетов Maxisorp™ покрывали с использованием разведения IgG 20 мкл/лунку в концентрации 1,2 мкг/мл в PBS, инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем 3 раза промывали PBST. Планшеты блокировали 90 мкл 3% BSA/PBS на лунку в течение 1 ч при RT и 3 раза промывали PBST.

### Определение EC<sub>50</sub> на клетках с помощью FACS.

Очищенные IgG тестировали в одной концентрации или титровали в FACS для определения значений EC<sub>50</sub> для связывания с поверхностью клеток, экспрессирующих сcKIT человека, мыши или крысы. С этой целью, клетки Mo7e, P815 или RBL-2H3 собирали с использованием Accutase® (Life Technologies, Carlsbad, CA) и разводили до 1×10<sup>6</sup>/мл в буфере для FACS. Все последующие этапы осуществляли на льду для предотвращения интернализации рецептора. Клеточную суспензию наносили на 96-луночный планшет с U-образным дном при 100 мкл/лунку. После центрифугирования при 210 g в течение 5 мин при 4°C удаляли буфер. Затем добавляли 100 мкл специфичных mAb, разведенных в буфере для FACS, на лунку в концентрации 15 мкг/мл или в экспериментах по титрованию в концентрациях серийного разведения антитела (пошаговое разведение 1:3, начальная концентрация 15 мкг/мл). После инкубации на льду в течение 1 ч клетки промывали три раза 150 мкл буфера для FACS. К клеткам добавляли 100 мкл/лунку вторичного PE-конъюгированного детекторного антитела козы против человека (разбавленное 1:200 в буфере для FACS) и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали три раза 150 мкл буфера для FACS. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспенсировали в 200 мкл буфера FACS на лунку и анализировали образцы с помощью устройства BD FACS.

### Биологические анализы *in vitro*.

#### Анализ SCF-зависимой пролиферации.

Анализы пролиферации осуществляли с использованием клеточной линии Mo7e (острый мегакарио-областический лейкоз человека, DSMZ № ACC 104), культивируемой в RPMI1640 со стабильным глутамином (PAN #P04-18500), 10% FCS и 10 нг/мл SCF (R&D кат. № 255-SC; Lot#CM2810061, R&D Corp, Berkeley CA).

В анализе SCF-зависимой пролиферации тестировали очищенные IgG или супернатанты культур клеток, содержащих IgG. В обоих вариантах экспериментальных условий клетки собирали, ресуспенди-

ровали в 50 мл "голодной среды" (среды для культивирования без SCF) в концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Затем клетки ресуспенсировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в "голодной среде" с 60 нг/мл SCF (2-кратной концентрации, конечная концентрация после добавления антитела составляет 30 нг/мл). Добавляли 50 мкл клеток ( $5 \times 10^4$  клеток/лунку) и 50 мкл 2-кратно концентрированных очищенных антител или неразбавленных супернатантов культур клеток на лунку белых 96-луночных плоскодонных планшетов с прозрачным дном. В качестве отрицательных и положительных контролей включали клетки без SCF и без антитела или клетки с SCF и без антитела. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при  $37^\circ\text{C}$  и, в конечном итоге, количества клеток определяли с использованием CellTiter-Glo® (Promega #G7571, Promega, Madison, WI) по инструкциям производителя.

#### Fab-ZAP ADC Piggyback Assay.

Для тестирования способности антител интернализоваться после связывания рецептора осуществляли анализ ADC, смешивая реагент Fab-ZAP (mAb козы против человека, соединенное с сапорином; ATS Biotechnology, кат. № IT-51-250, ATS Bio, San Diego, CA) с очищенными IgG или с супернатантами культур клеток, содержащими IgG. Цитотоксический потенциал тестировали с использованием линии злокачественных клеток CMK-11-5 (клеток острого мегакариобластического лейкоза, культивируемых в RPMI1640+10% FCS), т.к. эти клетки демонстрируют высокую экспрессию cKIT.

Клетки в культуре подсчитывали и разбавляли в среде до концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/мл. 50 мкл клеточной суспензии (5000 клеток/лунку) переносили в 96-луночные планшеты (TC-обработанные белые плоскодонные планшеты с прозрачным дном, Corning кат. № 3903, Corning, Tewksbury, MA). В отдельном планшете (96-луночный с V-образным дном, Nunc, кат. № 249946, Nunc Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) IgG разбавляли в среде.

Разбавляли супернатанты культур клеток, содержащие IgG, 1:125 и очищенные IgG до концентрации 0,4 нМ, получая общий объем 60 мкл/лунку. Добавляли равный объем раствора FabZAP в концентрации 5 нм и инкубировали планшет в течение 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ . 50 мкл коньюгатов антитело/Fab-ZAP переносили к клеткам CMK-11-5 (общий объем 100 мкл). В качестве контролей получали лунки только с клетками (=100% контроль жизнеспособности) и клетками, инкубированными только с Fab-ZAP (для проверки неспецифического уничтожения вторичного реагента). Конечная концентрация Fab-ZAP составляла 1,25 нМ. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Количества клеток определяли с использованием CellTiter-Glo® (Promega #G7571) по инструкциям производителя. Жизнеспособность нормализовали по контролю только с клетками.

#### Резюме.

При скрининге на антитела против cKIT осуществляли 2 различные стратегии.

#### Стратегия 1.

Кандидатов с перекрестной реактивностью человека/яванского макака (217 семейств HCDR3) подвергали селекции на высокую аффинность и после конверсии IgG клонны подвергали скринингу на функциональность в анализе CMK-11-5 FabZAP ADC и анализе пролиферации Mo7e. Учитывая функциональную активность и разнообразие, кандидатов подвергали селекции по экспрессии в исследовательском масштабе.

#### Стратегия 2.

Кандидатов с перекрестной реактивностью человека/яванского макака/мыши (5 семейств HCDR3) подвергали аффинному созреванию и после конверсии IgG кандидатов подвергали селекции по экспрессии.

Таким образом, 82 очищенных IgG-кандидатов из стратегии 1 и 2 подвергали тщательной характеристизации. Из этой совокупности 82, 26 IgG-кандидатов подвергали селекции на продукцию большего масштаба, коньюгации с токсином и последующему тестированию в качестве лекарственных коньюгатов антител в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

После тщательной характеристики 26 антител (14 кандидатов из стратегии 1 и 12 кандидатов из стратегии 2), принадлежащих к 16 различным семействам HCDR3, подвергали селекции а продукцию большего масштаба и тестированию в качестве коньюгата антитело-DM1. Кандидатов подвергали селекции по следующим критериям: 1) Активное уничтожение клеток, экспрессирующих cKIT дикого типа и мутантный cKIT, в анализе piggyback Fab-DM1 с EC50 в суб- и низконаномалярном диапазоне, 2) значения KD 24/26 IgG для cKIT яванского макака находятся в пределах 3-кратного диапазона относительно определенного для cKIT человека. Кроме того, 12/26 IgG перекрестно реагируют с cKIT мыши и крысы, экспрессируемым на клетках.

Выбранные кандидаты из этого скрининга можно относить к различным бинам эпитопов:

- 1) 19/26 IgG принадлежат к бину 1 или бину 6 (связывание с cKIT D1-3, лиганд-связывающие домены);
- 2) 6/26 IgG принадлежат к бину 8 (связывание с cKIT D4-5, домены димеризации);
- 3) 1/26 IgG принадлежит к бину 2, имеющему высокую аффинность к cKIT человека, но имеет лишь слабую аффинность к cKIT яванского макака. Примером антитела, полученного с помощью этого типа протокола скрининга, является антитело 20376.

Пример 4. Конструкции для белков ECD cKIT человека, яванского макака, мыши и крысы.

Внеклеточные домены cKIT человека, мыши и крысы генетически синтезировали с учетом аминокислотных последовательностей из баз данных GenBank или Uniprot (см. табл. 2 ниже). Матрицу кДНК cKIT яванского макака и 1 ECD генетически синтезировали с учетом информации об аминокислотных последовательностях, полученной с использованием мРНК из различных тканей яванского макака (например, Zyagen Laboratories; табл. 2 ниже). Все синтезированные фрагменты ДНК клонировали в соответствующие экспрессирующие векторы, например, вектор на основе hEFI-HTLV (pFUSE-mIgG2A-Fc2) с С-концевыми метками, способствующими очистке.

Таблица 2

Название	Описание	Регистрационный номер	SEQ ID NO
CKIT человека D1-5	<u>CKIT человека укороченный вариант 2, остатки 26-520-TAG</u> <u>QPSVSPGEPPPSIHPGKSDLIVRV GDEIRLLCTDPGVKWTFEILDETN ENKQNEWITEKAEATNTGKYCTCNK HGLNSNISYVFVRDPAKLFLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKG CQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSV KRAYHRLCLHCSVDOEGKSVLSEKF ILKVRPAFKAVPVVSVKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKREN SQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSAN VTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFV NDGENVDLIVEYEAFPKPEHQWY MNRTFTDKWEDYPKSENESNIRYVS ELHLTRLKGTEGGTYTFLVNSDVN AAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGM LQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRC SASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVO SSIDSSAFKHNGTVACKAYNDVGTK SAYFNFAFKEQIHPTLFTPRESHHH HHH</u>	NM_001093772	(SEQ ID NO.154)
CKIT человека D1-3	<u>CKIT человека укороченный вариант 1, остатки 26-311-TAG</u> <u>QPSVSPGEPPPSIHPGKSDLIVRV GDEIRLLCTDPGVKWTFEILDETN ENKQNEWITEKAEATNTGKYCTCNK HGLNSNISYVFVRDPAKLFLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKG CQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSV KRAYHRLCLHCSVDOEGKSVLSEKF ILKVRPAFKAVPVVSVKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKREN SQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSAN VTTTLEVVDKGGRSHHHHHHH</u>	NM_000222	(SEQ ID NO.155)
CKIT человека D4-5	<u>CKIT человека укороченный вариант 1, остатки 311-524-TAG</u> <u>GFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIV EYEAFPKPEHQWYIMNRTFTDKWE</u>	NM_000222	(SEQ ID NO.156)

	DYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGT EGGTYTFLVSNSDVNAIAFNVYVN TKPEILTYDRLVNGMLQCVAAAGFPE PTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDQ TLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKH NGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKG NNKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH		
CKIT яванского макака D1-5	<u>CKIT яванского макака,</u> <u>остатки 25-520-TAG</u>	Нет данных.	(см. ниже)
CKIT мыши D1-5	<u>CKIT мыши укороченный</u> <u>вариант 1, остатки 26-</u> <u>527-TAG</u>  sqpsaspgepsppsihpaqselive agdtlsltcidpdfvrwtfktyfne mvenkknewiqekaeatrtgtytcs nsngltssiyfvfrdpaklflvglp lfgedksdalvrcpltdpqvsnysl iecdgkslptdltfpvpnpkagitik nvkrayhrlcvrcaaqrdrgtwlhsd kftlkvraaikaipvvsvpetshll kkgdtftvvctikdvstsvnsmwlk mnpqpqhiaqvkhnswhrgdfnyer qetltissarvddsgvfmcyanltf gsanvtttlkvvekgfinispvknt tvfvtdgenvdlvveyeaypkpehq qwiymnrrtsankgkdyvksdnksni ryvnqlrltrkgteggtytfvsn sdasasvfnvnyvntkpeiltydrl ingmlqcvaegfpeptidwytfcga eqrcttpvspvdvqvqnvsvspfkg lvvqssidssvfrhngtveckasnd vgkssaffnfafkeqiqahltfpl evlfqqprsprgptikpcppckcpa pnllggpsvfifppkikdvlmisls pivotcvvvdvseddpdvqiswfvnn vevhtaqtqthredynstlrvsal piqhqdwmmsgkefkckvnnkdlpap iertiskpkgsvrqpvyyvlppee emtkkqvtlcmvtdmpediyyew tnngktelnykntepvlldsdgsyfm ysklrvekknwvernsyscsvvheg lhnhttksfsrtpgk	NM_001122733	(SEQ ID NO.157)
CKIT крысы D1- 5	<u>CKIT крысы, остатки 25-</u> <u>526-TAG</u> SQPSASPGEPSPPSIQPAQSELIVE AGDTIRLTCTDPAFVKWTFEILDVR	NM_022264	(SEQ ID NO.158)

	IENKQSEWIREKAEATHGKYTCVS GSSLRSSIYVFVRDPAVLFVLVGLPL FGKEDNDALVRCPPLTDQVSNYSLI ECDGKSLSPTDLKFVPNPKAGITIKN VKRAYHRLCIRCAAQREGKWMRSOK FTLKVRRAIAKAPIVVSVPETSHLLK EGDTFTVICTIKDVSTSVDSMWIKL NPQPQSKAQVKRNSWHQGDFNYERQ ETLTISSARVNDSGVFMCYANNTFG SANVTTTLKVVEKGFINIFPVKNTT VFVTDGENVDLVVEFAAYPKPEHQO WIYMNRTPTNRGEDYVKSDNQSNIR YVNEELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNS DVSASVTFDVYVNTKPEILTYDRML NGRLQCVAAGFPEPTIDWYFCTGAE QRCTVPVPPDVQIQNASVSPFGKL VVQSSIDSSVFRHNGTVECKASNAV GKSAFFNFAFKGNSKEQIQPHTLF TPRSLEVLFQGPGSPPLKECPPCAA PDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMISS PMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALPSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPPAAE EMTKKEFSLTCMITGFLPAEIADV TSNGRTEQNYKNTATVLDGDSYFM YSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEG LHNHLLTTKTISSRLGK		
--	--	--	--

Таблица 3  
Последовательности белка cKIT яванского макака

Конструкция	Аминокислотная последовательность в однобуквенном коде, подчеркнут сигнальный пептид	SEQ ID NO
cKIT яванского макака D1-5	MYRMQLLSCLIALSLALVNTSQPSVSPGEPS PPSIHPAKSELIVRVGNEIRLLCIDPGFVK WTFEILDETNENKQNEWITEKAЕATNTGKY TCTNKHGLSSSIYVFVRDPAKLFVLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTSYSLKGCGQKP LPKDLRFVPDPKAGITIKSVKRAYHRLCLH CSADQEGKSVLSDKFILKVRPAFKAVPVVS VSKASYLLREGEETVTCTIKDVSSSVYST WKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTL EVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIV EYEAFPKPEHQOWIYMNRTFTDKWEDYPKS ENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVS NSDVMASIIFNVYVNTKPEILTYDRLVNGM LQCVAAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVL PVDVQTLNASGPPFGKLVVQSSIDSSAFKH NGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQ IHPHTLFTPRTSHHHHHH	(SEQ ID NO. 159)

Экспрессия рекомбинантных белков cKIT.

Желаемые рекомбинантные белки cKIT экспрессировали в полученных из HEK293 клеточных линиях (293FS), ранее адаптированных к суспензионной культуре и выращиваемых в бессывороточной среде FreeStyle-293 (Gibco, кат. № 12338018). Маломасштабную и крупномасштабную продукцию белка осуществляли посредством транзиторной трансфекции и во множестве встраиваемых колб (Nalgene), до 1 л каждая, с 293Fectin (Life Technologies, кат. № 12347019) в качестве носителя плазмида. Тотальную ДНК и 293Fectin использовали в соотношении 1:1,5 (мас./об.). Соотношение ДНК и культуры составляло 1 мг/л. Супернатанты культур клеток собирали через 3-4 дня после трансфекции, центрифугировали и стерилизовали фильтрацией перед очисткой.

Пример 5. Очистка белка ECD cKIT человека, яванского макака, мыши и крысы и субдоменов cKIT 1-3 и 4-5.

Очистка меченого белка.

Рекомбинантные Fc-меченные белки внеклеточного домена cKIT (например, ECD cKIT человека-Fc, cKIT человека (субдомены ECD 1-3, 4-5)-Fc, cKIT яванского макака-mFc, cKIT крысы-mFc, cKIT мыши-mFc) выделяли из супернатанта культур клеток. Очищенный супернатант пропускали через колонку с протеин A-сефарозой, уравновешенную PBS. После промывки до базового уровня связавшийся материал

элюировали буфером для элюирования с низким pH Pierce Immunopure или 100 мМ глицина (рН 2,7) и незамедлительно нейтрализовали 1/8 элюирующего объема 1 М Трис, рН 9. Объединенный белок, при необходимости, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra емкостью 15 мл с порогами номинальной молекулярной массы 10 кДа или 30 кДа. Затем совокупности очищали посредством SEC с использованием колонки Superdex 200 26/60 для удаления агрегатов. Затем очищенный белок охарактеризовывали с помощью SDS-PAGE и SEC-MALLS (рассеяние лазерного излучения с кратными углами). Концентрацию определяли по поглощению при 280 нм с использованием теоретических коэффициентов поглощения, вычисляемых с учетом последовательности с помощью Vector NTI.

Пример 6. Связывание Ab против сKIT с субдоменами ECD сKIT.

Для облегчения определения участков связывания Ab против сKIT ECD сKIT человека подразделяли на субдомены 1-3 (лиганд-связывающий домен) и субдомены 4-5 (домен димеризации). Для определения того, какие субдомены связывались, использовали "сэндвич"-формат анализа ELISA. 1 мкг/мл ECD, разбавленных в 1-кратном фосфатно-солевом буфере, соответствующими субдоменами 1-3 сKIT, субдоменами сKIT 4-5 или полноразмерному ECD сKIT, покрывали 96-луночные планшеты Immulon 4-HBX (Thermo Scientific кат. № 3855, Rockford, IL) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали три раза промывочным буфером (1-кратным фосфатно-солевым буфером (PBS) с 0,01% Tween-20 (Bio-Rad 101-0781)). Планшеты блокировали 280 мкл/лунку 3% бычьего сывороточного альбумина, разбавленного в 1-кратном PBS, в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза промывочным буфером. Антилена получали в концентрации 2 мкг/мл в промывочном буфере с 5-кратными разведениями для 8 точек и добавляли на планшеты для ELISA в объеме 100 мкл/лунку в трех параллелях. Планшеты инкубировали на орбитальном шейкере при 200 об/мин в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты для анализа промывали три раза промывочным буфером. Вторичное антилело IgG козы против человека, специфичное к F(ab')-2-фрагменту, (H+L) (Jackson Immunoresearch кат. № 109-036-088, West Grove, PA) получали в соотношении 1:10000 в промывочном буфере и добавляли на планшеты для ELISA в объеме 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали с вторичным антилелом в течение 1 ч при комнатной температуре, встряхивая при 200 об/мин на орбитальном шейкере. Планшеты для анализа промывали три раза промывочным буфером. Для получения сигнала ELISA в планшеты добавляли 100 мкл/лунку субстрата Sure blue® TMB (KPL кат. № 52-00-03, Gaithersburg, MD) и позволяли им инкубироваться в течение 10 мин при комнатной температуре. Для остановки реакции в каждую лунку добавляли 50 мкл 1 Н соляной кислоты. Поглощение измеряли при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Molecular Devices SpectraMax M5. Для определения связывающего ответа каждого антилела усредняли измерения оптической плотности, получали значения стандартного отклонения и строили графики с использованием Excel. Связывающие домены каждого отдельного антилела против сKIT приведены в табл. 5 ниже.

Пример 7. Измерения аффинности Ab против сKIT.

Аффинность антилел против видовых ортологов сKIT, а также против сKIT определяли с использованием технологии SPR с использованием устройства Biacore® 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и сенсорных чипов CM5.

В кратком изложении, HBS-P (0,01 М HEPES, рН 7,4, 0,15 М NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20), дополненный 2% блокирующими буфером Odyssey® (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE), использовали в качестве подвижного буфера во всех экспериментах. Уровень иммобилизации и взаимодействия анализов измеряли в единицах ответа (RU). Осуществляли пробные эксперименты для тестирования и подтверждения выполнимости иммобилизации антилела против Fc человека (кат. № BR100839, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и захвата тестируемых антилел.

Для кинетических измерений осуществляли эксперименты, в которых антилела фиксировали на поверхности сенсорного чипа с помощью иммобилизованного антилела против Fc человека и определяли способность белков сKIT свободно связываться в растворе. В кратком изложении, 25 мкг/мл антилела против Fc человека при рН 5 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством присоединения через аминогруппу при скорости потока 5 мкл/мин на всех двух проточных кюветах для достижения 10500 RU. Затем 0,1-1 г/мл тестируемых антилел инъецировали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 1 мин. Как правило, поддерживали фиксированные уровни антилел ниже 200 RU. Затем, 3,125-50 нМ внеклеточных доменов (ECD) рецептора сKIT разбавляли в 2-кратной серии и инъецировали при скорости потока 40 мкл/мин в течение 3 мин в референсной и тестовой проточных кюветах. Таблица тестируемых ECD приведена ниже. Следовала диссоциация связывание в течение 10 мин. После каждого цикла инъекций поверхность чипа восстанавливали с использованием 3 М MgCl<sub>2</sub> при скорости потока 10 мкл/мин в течение 30 с. Все эксперименты осуществляли при 25°C и данные об ответах подвергали глобальной аппроксимации с простой моделью взаимодействия 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2® версии 2.0b (BioLogic Software) для получения показателей скорости прямой реакции ( $k_a$ ), скорости обратной реакции ( $k_d$ ) и аффинности ( $K_D$ ).

Таблица 4  
Изотип и источник ECD

Изотип ECD	Метка	Источник
Человек	C-концевая 6x His	NVS
Яванский макак	C-концевая 6x His	NVS
Мышь	C-концевая 6x His	Sino Biological Inc (кат. №: 50530-M08H)
Крыса	C-концевая mFc	NVS

В табл. 5 приведены связывание доменов и аффинность. Как показано в таблице, все антитела 9p3, NEG024, NEG027, NEG085, NEG086, NEG087 и 20376 реагируют с сcKIT человека на наномолярном уровне и имеют схожие аффинности с антителами, тестируемыми против ECD яванского макака. Однако только 20376 перекрестно реагировало с ECD мыши. Ни одно из тестируемых антител не реагировало перекрестно с сcKIT крысы.

Таблица 5

Ab	Связывание доменов	Аффинность к сcKIT человека (нМ)	Аффинность к сcKIT яванского макака (нМ)	Аффинность к сcKIT мыши (нМ)	Аффинность к сcKIT крысы (нМ)
9P3	d1-3	20	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG024	d1-3	1,31	1,15	не реагирует	не реагирует
NEG026	d1-3	не определено	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG027	d1-3	1,34	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG085	d1-3	8,4	6,14	не реагирует	не реагирует
NEG086	d1-3	1,44	1,34	не реагирует	не реагирует
NEG087	d1-3	1,13	1,39	не реагирует	не реагирует
20376	d1-3	9,1	4,8	2,5	не реагирует

#### Пример 8. Получение ADC.

##### Получение конгьюгатов DM1 одноэтапным способом.

Отдельные антитела против сcKIT подвергали диафильтрации в реакционный буфер (15 мМ фосфата калия, 2 мМ ЭДТА, pH 7,6) посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF#1) перед началом реакции коньюгации. Затем, антитело против сcKIT (приблизительно 5,0 мг/мл) смешивали с DM1 (5,6-кратный молярный избыток относительно количества антитела) и затем с SMCC (приблизительно 5,0-кратный избыток относительно количества антитела). Реакцию осуществляли при 20°C в 15 мМ буфере фосфата калия (pH 7,6), содержащем 2 мМ ЭДТА и 10% DMA, в течение приблизительно 16 ч. Реакцию гасили добавлением 1 М уксусной кислоты для доведения pH до 5,0. После доведения pH реакционную смесь фильтровали через многослойный (0,45/0,22 мкм) PVDF фильтр, очищали и подвергали диафильтрации в 20 мМ сукцинатный буфер (pH 5,0), содержащий 8,22% сахарозу с использованием тангенциальной поточной фильтрации (TFF#2). Пример инструментальных параметров для тангенциальной поточной фильтрации приведен в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Инструментальные параметры для тангенциальной поточной фильтрации

Параметр TFF	TFF#1 заданное значение	TFF#2 заданное значение
Объемная концентрация (Cb - г/л)	20	20
TMP (унт/дюйм <sup>2</sup> )	12-18	12-18
Скорость подачи (LMH)	324	324
Нагрузка мембранны (г/м <sup>2</sup> )	80-150	80-150
Диаобъемы	10	14
Буфер для диафильтрации	15 мМ фосфат калия, 2 мМ EDTA, pH 7,6	20 мМ сукцинат, 8,22% сахароза, pH 5,0
Температура (°C)	RT (20-25)	RT (20-25)

Конъюгаты, полученные описываемым выше способом, анализировали с помощью УФ-спектроскопии для определения нагрузки цитотоксическим средством (соотношение майтанзиноида и антитела, MAR); SEC-ВЭЖХ для определения мономеров конъюгата; и обращенно-фазовой ВЭЖХ или ВЭЖХ с экранированной гидрофобной фазой (Hisep) для определения процентной доли свободного майтанзиноида.

Получение конгьюгатов DM1 способом *in situ*.

Антитела против cKIT также можно конъюгировать способом *in situ* следующим образом. Антитела против cKIT конъюгировали с DM1 с использованием сульфосукцинимидил-4-(N-маленинимидометил)циклогексан-1-карбоксилатного (сульфо-SMCC) линкера. Получали стоковые растворы DM1 и сульфо-SMCC гетеробифункционального линкера в DMA. Смешивали сульфо-SMCC и DM1-тиол для проведения реакции в течение 10 мин при 25°C в DMA, содержащем 40% об./об. водного 50 мМ сукцинатного буфера, 2 мМ ЭДТА, pH 5,0, при соотношении DM1 и линкера 1,3:1 молярного эквивалента и конечной концентрации DM1 1,95 мМ. Затем осуществляли реакцию антитела с аликвотой реакционной смеси для получения соотношения молярных эквивалентов SMCC и Ab приблизительно 6,5:1 в конечных условиях конъюгации 2,5 мг/мл Ab в 50 мМ EPPS, pH 8,0 и 10% DMA (об./об.). Через приблизительно 18 ч при 25°C реакционную смесь для конъюгации очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной 10 мМ сукцинатом, 250 мМ глицином, 0,5% сахарозой, 0,01% Tween 20, pH 5,5.

Любой из способов применим в конъюгации антител. В таблице ниже приведен пример ADC против cKIT.

Таблица 7

Свойства DM1-конъюгированных антител

Ad	MAR	Мономер %	Выход %	Свободное лекарственное средство %
9P3	3,6	99		Не определено
NEG024	4	98	70	0,7
NEG026	4	98	71	1,2
NEG027	4	98	68	1,2
NEG085	3,5	99	88	0,7
NEG086	3,5	99	83	1,5
NEG087	3,6	99	90	1,1
20376	3,8	99	84	Не определено

Получение ADC с линкером SPDB.

Антитела против cKIT, например, антитело 9P3 (8 мг/мл), модифицировали с использованием N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)бутонаата (SPDB, 5,0-, 5,5- и 4,9-кратный молярный избыток, соответственно) в течение 120 мин при 25°C в 50 мМ буфере фосфата калия (pH 7,5), содержащем 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, и 5% DMA. Модифицированное Ab без очистки затем конъюгировали с DM4 (1,7-

кратный молярный избыток относительно несвязавшегося линкера) в конечной концентрации модифицированного антитела 4 мг/мл в 50 мМ буфере фосфата калия (рН 7,5), содержащем 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА и 5% DMA, в течение 18 ч при 25°C. Реакционную смесь для конъюгации очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной и элюированной 10 мМ сукцинатом, 250 мМ глицином, 0,5% сахарозой, 0,01% Tween 20, рН 5,5.

#### Получение ADC с линкером CX1-1.

Антитела против cKIT, например, антитело 9Р3 (5,0 мг/мл), смешивали с DM1 (7,15-кратный молярный избыток относительно количества антитела) и затем с CX1-1 (5,5-кратный избыток относительно количества антитела). Реакцию осуществляли при 25°C в 60 мМ буфере EPPS [4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновой кислоты] (рН 8,5), содержащем 2 мМ ЭДТА и 5% DMA, в течение приблизительно 16 ч. Затем реакционную смесь очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной и элюированной в 10 мМ сукцинат, 250 мМ глицина, 0,5% сахарозу, 0,01% Tween 20, рН 5,5.

Пример, в котором сравнивают эффективности *in vitro* антитела-MCC-DM1, антитела-SPDB-DM4 и антитела-CX1-1-DM1, представлен на фиг. 2.

#### Пример 9. Аффинность ADC относительно родительских антител.

Аффинность антител против cKIT после конъюгации с SMCC-DM1 определяли с помощью технологии Biacore с использованием устройства Biacore® T100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и сенсорных чипов CM5 с использованием методологии, схожей с описываемой в примере 7 выше.

Для оцениваемых антител получали схожие оценочные показатели аффинности для связывания с cKIT человека в случае SMCC-DM1-конъюгированных антител относительно родительских неконъюгированных антител, что позволяет предполагать, что конъюгация не влияет значительно на связывание антитела (табл. 8).

Таблица 8

Аффинности неконъюгированных и MCC-DM1-конъюгированных антител

	ECD cKIT человека (нМ)	
	Неконъюгированное	MCC-DM1
NEG	1, 3	11
NEG	4, 2	5, 2
NEG	1, 4	1, 8
20376	9, 1	11, 2

Пример 10. Активность 9Р3-MCC-DM1, 9Р3-SPDB-DM4 и 9Р3-CX1-1-DM1 на панели клеточных линий.

После конъюгации с MCC-DM1 линкером-полезной нагрузкой определяли способность лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию линий клеток AML, SCLC, GIST и меланомы. Линия клеток GIST-T1 любезно предоставлена Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan. Линии клеток GIST430 и GIST882 любезно предоставлены Dr. Jonathan Fletcher, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA.

В случае мелкоклеточного рака легких (SCLC) использовали клеточные линии NCI-H526 и NCI-H1048. NCI-H526 высоко экспрессирует cKIT, и ее получали из ATCC (CRL-5811, ATCC Manassas, VA). NCI-H1048 экспрессирует cKIT на более низком уровне, и ее также получали из ATCC (CRL-5853). CMK-11-5 является линией AML, экспрессирующей высокие уровни cKIT ((JCRB кат. № IFO50430, Japan), см. также Nagano et al., Int. J. Hematol. 1992; 56:67-78)). UKE-1 также является линией клеток AML и экспрессирует низкие количества cKIT. Клеточная линия UKE-1 любезно предоставлена Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany. Kasumi 1 получали из ATCC (CRL-2724). Kasumi-6 получали из ATCC (CRL-2775). MDA-MB-453 получали из ATCC (HTB-131). Линии NCI-H889 и NCI-H1930 приобретали в ATCC (CRL-5817 и CRL-5906, соответственно). Клетки He192.1.7 получали из Sigma-Aldrich (кат. № 92111706-1VL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Клетки M-07e и SKNO1 приобретали в DSMZ, ACC-104 и ACC-690 соответственно (DSMZ, Braunschweig, DE). Клеточную линию OCI-M1 также получали из DSMZ (ACC-529).

В кратком изложении, клетки культивировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в среде для культивирования по рекомендациям производителя. В день анализа клетки два раза промывали PBS (Cellgro, Corning, Tewksbury MA (кат. № 21-031-CV)) перед обработкой 0,1% трипсином-ЭДТА (внутренние технические службы) в течение 5 мин и ресуспенсировали в рекомендуемой среде для культивирования. Затем клетки подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3603, Corning, Tewksbury, MA) при плотностях 2000-10000 клеток/лунку в 100 мкл среды для культивирования клеток. Получали дублирующий планшет для измерения в день 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Также получали лунки только со средой в качестве отрицательных контролей. После этой инкубации 100 мкл/лунку реагента

Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Madison, WI) добавляли в планшеты дня 0, которые затем осторожно встряхивали в течение 2 мин, инкубировали в течении 10 мин и измеряли полученные интенсивности люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer Wallac Microbeta Trilux® (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые ADC серийно разводили до 3-кратного стокового раствора в соответствующей среде для культивирования клеток и добавляли 50 мкл 3-кратно разведенных ADC (конечная анализируемая концентрация 0,0002-68 нМ эквивалентов DM1) перед инкубацией в инкубатор для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. После этого периода инкубации определяли относительную жизнеспособность клеток посредством добавления реагента Celltiter Glo®, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% ингибиования)=(ADC обработанные необработанные)/(необработанные - день 0)\*100). Данные о % ингибиования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения GI<sub>50</sub>.

Как показано на фиг. 1, ADC против cKIT тестировали в анализе пролиферации с использованием панели линий клеток GIST (GIST T-1, GIST882, GIST430), SCLC (NCI-H526, NCI-H1048) и AML (Kasumi-6, Kasumi-1). Значения IC<sub>50</sub> и максимального уничтожения приведены в таблице. MDA-MB453 (линия злокачественных клеток молочной железы) не экспрессирует cKIT. IgG-MCC-DM1 является изотипическим контролем. Как показано на фиг. 1, все ADC против cKIT наномолярные-субнаномолярные IC<sub>50</sub> в семи используемых линиях. Это свидетельствует о том, что ADC против cKIT имеют широкий спектр показаний к применению, и их можно использовать в любом случае, когда опухоль экспрессирует соответствующие уровни cKIT.

Также оценивали способность антитела против cKIT (9P3), конъюгированного через линкер-полезную нагрузку SPDB-DM4 и CX1-1-DM1, как показано на фиг. 2. Эти исследования, осуществленные, как описано выше, показали, что оцениваемые ADC против cKIT также являлись мощным ингибитором клеточной пролиферации при использовании SPDB-DM4 или CX1-1-DM1, что позволяет предполагать, что их способность успешно доставлять токсин для уничтожения клеток не ограничена MCC-DM1. На фиг. 1 и 2 представлены ADC против cKIT, являющиеся эффективными в наномолярном-субнаномолярном диапазоне.

Кроме того, фиг. 3 представляет собой график GI<sub>50</sub> ADC против cKIT относительно cKIT уровня рецептора и показаний (AML, GIST, меланома и SCLC). Как показано на фиг. 3, ADC против cKIT эффективны для всех представленных показаний.

Пример 11. Активность ADC cKIT-MCC-DM1 *in vitro* в отношении клеточных линий GIST, SCLC и AML.

После конъюгации с MCC-DM1 линкером-полезной нагрузкой определяли способность лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию линий клеток AML, SCLC и GIST. Список клеток, используемых в этих экспериментах, по поставщику см. В примере 10 выше.

В кратком изложении, клетки культивировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде для культивирования по рекомендациям производителя. В день анализа клетки два раза промывали PBS (Cellgro, кат. № 21-031-CV, Corning Tewksbury, MA) перед обработкой 0,1% трипсином-ЭДТА (внутренние технические службы) в течение 5 мин и ресусцидировали в рекомендуемой среде для культивирования. Затем клетки подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3603, Corning, Tewksbury, MA) при плотности 5000 клеток/лунку для клеток AML и SCLC и 10000 клеток/лунку для клеток GIST в 100 мкл среды для культивирования клеток. Получали планшет для параллельного измерения в день 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. После этой инкубации в планшеты дня 0 добавляли 100 мкл/лунку реагента Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Promega, Madison, WI), затем осторожно встряхивали их в течение 2 мин, инкубировали в течение 10 мин, и измеряли полученную интенсивность люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer Wallac Microbeta® Trilux (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые ADC серийно разводили до 3-кратного стокового раствора в соответствующей среде для культивирования клеток и добавляли 50 мкл 3-кратно серийно разведенных ADC (конечная концентрация для анализа 0,0002-68 нМ эквивалентов DM1) перед инкубацией в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение от 5 до 8 дней. После этого периода инкубации, определяли относительную жизнеспособность клеток с помощью добавления реагента Celltiter Glo®, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% максимального воздействия (A<sub>MAX</sub>) = (необработанные обработанные наибольшей концентрацией ADC)\*100).

Данные % ингибиования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения GI<sub>50</sub>. Эти данные представлены на фиг. 4-9. Как показано на графиках, коньюгат IgG-MCC-DM1 используют в качестве контроля. Все из тестируемых ADC имеют более высокую активность, чем контрольное антитело. Как показано на кривых на фиг. 4-9, ADC против cKIT, например, антитела NEG085, NEG024 и 20376, являются очень эффективными в снижении клеточной пролиферации и, таким образом, будут эффективными в лечении GIST, AML и SCLC.

Пример 12. Количественный анализ плотности поверхностного рецептора сcKIT на клеточных линиях с помощью FACS (сортинга клеток с активацией флуоресценцией).

В качестве стандартов использовали частицы Quantum Simply Cellular Beads (Bangs Laboratories, Inc. кат. № 815, Fishers, IN). Емкость связывания антител частицами стандарта находится в диапазоне от 0 до приблизительно 310000. Частицы или пятьсот тысяч клеток центрифугировали и промывали два раза 100 мкл/образец буфера для FACS (PBS, 0,2% BSA, 0,1% NaAz). После каждого этапа промывки частицы или клетки центрифугировали и осторожно центрифугировали. После промывок добавляли буфер для FACS и в соответствующие лунки добавляли 10 мкг/мл APC-антитело мыши против CD117 человека (BD Pharmigen кат. № 550412, BD Biosciences, San Jose, CA) или 10 мкг/мл изотипического контроля APC-IgG к мыши (BD Pharmigen кат. № 554681) до конечного объема 100 мкл/образец.

Затем суспензии клетки-антитело инкубировали на льду в течение 1 ч. После инкубации клетки центрифугировали и два раза промывали 100 мкл буфера для FACS. После каждого этапа промывки частицы или клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали.

Нежизнеспособные клетки удаляли ресуспендированием в 100 мкл/образец буфера для FACS, содержащего 7-AAD (BD Pharmigen кат. № 559925). Образцы инкубировали на льду в течение 10 мин и анализировали с помощью BD FACS Canto II® (BD Biosciences, San Jose, CA). Геометрическое среднее сигнала на образец определяли с использованием программного обеспечения Flow Jo® и плотности антигена определяли, как описано в руководстве Quantum Simply Cellular manual. Анализы чувствительности клеточной к ADC *in vitro* и плотности рецептора в клеточной линии осуществляли с помощью TIBCO Spotfire 4.0.

Эта плотность рецептора показана в виде Y-оси фиг. 3. Анализ плотности рецептора применим в этом аспекте в качестве исходного биомаркера для стратификации пациентов. Например, на фиг. 3 высокая плотность рецептора коррелирует с эффективностью GI50 ADC против сcKIT, показанной в виде X-оси. Анализ плотности рецептора применим в клинических условиях для определения того, каким пациентам необходимо вводить терапевтическое средство ADC против сcKIT.

Пример 13. Карттирование эпитопов сcKIT для антитела 9Р3 с помощью масс-спектрометрии с дейтериевым обменом (HDx-MS).

При масс-спектрометрия с дейтериевым обменом (HDx-MS) измеряют захват дейтерия амидным оставом белка. Эти измерения чувствительны к доступности растворителя амида и изменениям сети водородных связей амидов остава. HDx-MS часто используют для сравнения белков в двух разных состояниях, таких как аро- и лиганд-связанное, и она сопряжена с быстрым расщеплением пепсином. В таких экспериментах можно локализовывать области, как правило от 10 до 15 аминокислот, демонстрирующие дифференциальный захват дейтерия для двух разных состояний. Защищенные напрямую участвуют в связывании лиганда или связывание антитела с лигандом влияет на них аллостерически.

В этих экспериментах захват дейтерия внеклеточным доменом сcKIT (SEQ ID NO: 160, см. ниже) измеряли в отсутствие и присутствие терапевтического mAb, 9Р3. Области в сcKIT, демонстрирующие снижение захвата дейтерия после связывания антитела, вероятно, включены в эпитоп; однако, благодаря природе измерения также можно детектировать изменения, удаленные относительно участка прямого связывания (аллостерические эффекты). Как правило, области, имеющие наибольшую степень защиты, участвуют в прямом связывании, хотя это не всегда может быть так. Для разграничений событий прямого связывания и аллостерических эффектов необходимы ортогональные измерения (например, рентгеноструктурная кристаллография, аланиновый мутагенез).

Таблица 9

## Конструкция внеклеточного домена сcKIT

SEQ ID NO: 160
ДЛИНА: 503 аминокислоты
TYPE: Protein
ОРГАНИЗМ: Человек
QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITE KAEATNTGKYTCTNKHGLNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYKGEDNDTLVRCPPLTDPEVTN YSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVQEGKSVLSEKFILKVR PAFKAVPVVSVSKASYLLREGEETVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTQLQEKYNSWHHG DFNYERQATLTIS SARVN DSGVFM CYAN NTFG SANVTT LEVVDKG FINIFPMINTTVFV NDGENV D L I V E Y A F P K P E H Q W I Y M N R T F T D K W E D Y P K S E N E S N I R Y V S E L H L T R L K G T E G G T Y T F L V S N S D V N A A I A F N V Y V N T K P E I L T Y D R L V N G M L Q C V A A G F P E P T I D W Y F C P G T E Q R C S A S V L P V D V Q T L N S S G P P F G K L V V Q S S I D S S A F K H N G T V E C K A Y N D V G K T S A Y F N F A F K E Q I H P H T L F T P R S H H H H H

Эксперименты по картированию эпитопа сcKIT осуществляют на платформе Waters Synapt® G2

HDx-MS, включающей роботизированную систему LEAP®, систему nanoACQUITY® UPLC и масс-спектрометр Synapt® G2. В этом способе контрольные эксперименты в трех параллелях осуществляют следующим образом. 300 пмоль (1,4 мг/мл) антигена сcKIT разводят в 110 мкл 95% дейтерированном буфере PBS (рН 7,4) и инкубируют при комнатной температуре на настольном ротаторе в течение 25 мин (%D=85,5%). Дейтериевый обмен тушат разбавлением 1:1 холодным буфером для тушения (6 М мочевина и 1М TCEP, рН 2,5) на льду в течение 5 мин. После тушения пробирку переносят на систему LEAP (термобокс устанавливают на при 2°C) и подвергнутый тушению образец инъецируют с помощью системы LEAP в систему UPLC для анализа. Система UPLC включает колонку с иммобилизованным пепсином 2,1 мм × 30 мм (Life Technologies 2-3131-00), поддерживаемую при 12°C. Для разделения используют 8-минутный градиент от 2 до 35% ацетонитрила и колонку Waters UPLC CSH C18 1,0×100 мм. Затем, осуществляют эксперименты в трех параллелях с использованием антитела. 300 пмоль антитела 9Р3 иммобилизуют на частицах агарозы с протеином G (Thermo Scientific кат. № 22851) с использованием стандартных способов. В кратком изложении, антитело центрифигируют для удаления буфера для хранения. Затем 200 мкл буфера PBS (рН 7,4) и 300 пмоль сcKIT добавляют к иммобилизованному Ab и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации комплекс центрифигируют и промывают 200 мкл буфера PBS и снова центрифигируют. Для дейтериевого обмена 200 мкл дейтерированного PBS добавляют к комплексу антиген-антитело для инкубации при комнатной температуре в течение 25 мин (%D=85,5%). Затем удаляют дейтериевый буфер и незамедлительно добавляют 125 мкл ледяной буфер для тушения. После тушения в течение 5 мин колонку центрифигируют и элюат переносят в заранее охлажденный сосуд для ВЭЖХ. Образец анализируют с использованием той же встроенной установки для расщепления пепсином/LC-MS, что и в контрольном эксперименте.

Результаты этих измерений представлены на фиг. 10 и 11. На фиг. 10 показаны скорректированные относительно фона различия между контролем и образцом, связавшимся с антителом 9Р3, разделенные на стандартную ошибку измерения. На этом графике более отрицательное значение свидетельствует о более высокой степени защиты в указанной области после связывания антитела 9Р3 с антигеном сcKIT. После связывания 9Р3 с сcKIT авторы настоящего изобретения наблюдали наиболее значимые степени защиты в следующих двух областях сcKIT: VFVRDPAKLFL (область 1, 109-119 (SEQ ID NO: 161)) и HCSVDQEGKSVLSE (область 2, 185-198 (SEQ ID NO: 162)). Область 1 содержит остатки 109-119 и является частью доменов D1 и D2. Область 2 содержит остатки 185-198 и является частью домена D2. На фиг. 11 авторы настоящего изобретения картировали две наиболее защищенные области (см. фиг. 10) на кристаллической структуре внеклеточного домена сcKIT (PDB ID 2e9w). Кроме того, авторы настоящего изобретения также метили участки связывания SCF на сcKIT как участки I, II, и III с использованием значений, указанных в литературе (Yuzawa et al., Cell 2007; 130: 323-334). На фиг. 11 представлены два ключевых результата. Во-первых, области 1 и 2 расположены очень близко в кристаллической структуре, даже при том, что они находятся далеко друг от друга в пространстве первичной последовательности. Это наблюдение позволяет предполагать, что обе области потенциально могут являться частью эпитопа и, в таком случае, эпитоп для 9Р3 является прерывистым. Во-вторых, области 1 и 2 удалены от участков связывания SCF, представленных в литературе. Это является важным наблюдением, т.к. позволяет предполагать, что антитело 9Р3 не препятствует напрямую связыванию лиганда. Фактически, антитело может стерически препятствовать связыванию лиганда и/или димеризации рецептора после связывания лиганда. В раздельных конкурентных анализах с использованием ELISA и FACS авторы настоящего изобретения наблюдали частичное блокирование связывания SCF с сcKIT с помощью 9Р3, таким образом, вероятно, имеет место частичное стерическое препятствие. В заключение, данные HDx-MS свидетельствуют о том, что эпитоп для антитела 9Р3 состоит из прерывистого эпитопа, удаленного от участков связывания SCF. Ожидают, что NEG024, NEG085, NEG086, NEG027 и NEG087 будут иметь тот же механизм действия.

Пример 14. Способность ADC против сcKIT действовать в качестве агонистов оценивали с использованием клеточной линии Mo7e, экспрессирующей сcKIT дикого типа, и клеточной линии GIST T-1, экспрессирующей мутантный сcKIT.

Для оценки потенциальных агонистических свойств ADC против сcKIT  $2 \times 10^6$  клеток GIST T-1 (любезно предоставленных Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan) или Mo7e (DSMZ, ACC-104) подвергали сывороточному голоданию в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> (DMEM для GIST T-1 и RPMI для Mo7e, дополненная 0,1% FBS) в 6-луночном планшете (NUNC кат. № 14067). Клетки обрабатывали 10 нг/мл rh-SCF (R&D, кат. № 255-SC, R&D, Berkeley, CA), 5 мкг/мл NEG085-MCC-DM1, NEG024-MCC-DM1 и 20376-MCC-DM1 в течение 15 мин при 37°C. Одну лунку обозначали как необработанную (UT). Клетки собирали в 1 мл PBS. Клеточные осадки лизировали на льду в течение 60 мин в 30 мкл лизирующего буфера: 20 mM Трис-HCl; pH7,5, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 15% глицерина, ингибиторы протеазы и фосфатазы. Затем лизаты центрифугировали в течение 40 мин при 12000 об/мин при 4°C. 20 мкг каждого образца кипятили в течение 10 мин при 75°C и нагружали на 12-луночный гель NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies, NP0322BOX, Carlsbad, CA). После переноса белка на мембранны для блоттинга, их блокировали в TBST-5% молоке при комнатной температуре в течение 1 ч и затем обрабатывали первич-

ными антителами в течение ночи при 4°C. На следующий день блоты промывали в TBST (4×5 мин). Блоты инкубировали с вторичным антителом (HRP-конъюгированным антителом козы против кролика, 1:30000, Santa Cruz) в течение 1 ч при комнатной температуре. Блоты промывали в TBST (4×5 мин) и проявляли.

Первичными антителами, используемыми для вестерн-блоттинга, являлись α-cKIT, Tyr703 (Cell Signaling Technology кат. № 3073, Beverly, MA), α-cKIT Tyr721 (NOVUS, кат. № NBP1-51412, Novus, Littleton, CO), AKT Ser473 (Cell Signaling Technology кат. № 9271), AKT (Cell Signaling Technology кат. № 4691), ERK Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology кат. № 9101), ERK (Cell Signaling Technology кат. № 9102) и GAPDH (Cell Signaling Technology кат. № 3683).

Как показано на фиг. 12, антитела cKIT против NEG085, NEG024 и 20376 могут опосредовать фосфорилирование cKIT в отсутствие лиганда (SCF). Однако, нижележащие пути передачи сигнала не подвергаются воздействию, т.к. сигнал не передается на фосфо-ERK или фосфо-АКТ.

Пример 15. Опосредованная Ab против cKIT интернализация поверхностного cKIT на клетках GIST-T1, измеряемая с помощью проточной цитометрии.

Кинетику опосредованной антителом против cKIT интернализации оценивали с помощью обработки монослоя клеток антителом с использованием способа температурного сдвига и считывания данных проточной цитометрии. Клетки GIST-T1 (любезно предоставленные Dr. Takanori Taguchi, Kochi U., Japan) высевали при 2,5×10E5 клеток/лунку в пять обработанных 12-луночных планшетов для культивирования ткани (BD Falcon 353043). Клетки инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующий день удаляли среду и заменяли ее 450 мкл свежей среды. Антитела против cKIT NEG085, 20376 и изотипический контроль получали в 10-кратной концентрации 10 мкг/мл в соответствующей среде для культивирования клеток и добавляли 50 мкл тестируемого антитела против cKIT или изотипического контроля на лунку с конечной концентрацией 10 мкг/мл. Все клетки инкубировали в течение 1 ч на льду, затем два раза промывали 1 мл 1-кратного фосфатно-солевого буфера (PBS) и ресусPENDИРОВАЛИ в 500 мкл среды для культивирования клеток. Планшеты № 2-5 переносили в 37°C и собирали в моменты времени 30 мин, 2 ч, 4 и 24 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В планшет № 1 добавляли 100 мкл буфера для диссоциации клеток (Gibco кат. № 13150-016, Life Technologies, Carlsbad, CA) (контроль связывания при 4°C) и инкубировали при 37°C до открепления клеток. Клетки нейтрализовали 100 мкл среды и переносили в обработанный 96-луночный планшет для культивирования ткани с V-образным дном (Costar 3894). Клетки центриФУГИРОВАЛИ и два раза промывали буфером для FACS (1-кратный фосфатно-солевой буфер, 2% эмбриональная телячья сыворотка, 0,1% азид натрия). Получали вторичное Ab козы против IgG человека, конъюгированное с фикоэритрином (Invitrogen H10104, Life Technologies, Carlsbad, CA), в соотношении от 1 до 100 в буфере для FACS.

К клеткам добавляли вторичное антитело при 100 мкл/лунку и инкубировали с клетками на льду в течение 45 мин. В конце периода инкубации клетки центриФУГИРОВАЛИ и три раза промывали буфером для FACS. Клетки фиксировали 100 мкл/лунку 1% параформальдегида и хранили при 4°C в темноте. Повторяли этапы диссоциации клеток, инкубации с вторичным антителом и фиксации для клеток, инкубированных при 37°C, в различные моменты времени. На следующий день все образцы анализировали с использованием оборудования BD FACSCanto II® с использованием системы HTS (BD Biosciences, San Jose, CA). Образцы анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo для получения значений геометрического среднего флуоресценции для канала фикоэритрина. Фиг. 13A представляет собой график % исходного связывания поверхности клеток относительно геометрического среднего-PE связывания при 4°C/геометрического среднего-PE момента времени при 37°C×100. Как показано на фиг. 13A, оба антитела NEG085 и 20376 связывались с cKIT на поверхности клеток и быстро интернализовались в клетку. Это свидетельствует о том, что описываемые ADC против cKIT будут быстро интернализоваться, таким образом, эффективно доставляя токсин в клетку.

В другом эксперименте по интернализации оценивали влияние NEG085 на уровень рецептора cKIT на клетки костного мозга человека. Нормальные CD34+ клетки костного мозга человека (All Cells, кат. №ABM022F, Emeryville, CA) размораживали и промывали 10 мл среды StemPro®-34 SFM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA). Клетки ресусPENDИРОВАЛИ в 1,25 мл среды StemPro-34 SFM при 4×10<sup>5</sup> клеток/мл и поровну разделяли по двум пробиркам. Одну пробирку не обрабатывали, а другую обрабатывали 10 мкг/мл NEG085, и обе инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. 100 мкл клеточной суспензии собирали в каждый момент времени (0, 15, 30, 60, 120 и 240 мин) из каждой пробирки и помещали в холодную пробирку для сбора для прекращения интернализации. Клетки промывали 3 мл ледяного буфера для окрашивания FBS и ресусPENDИРОВАЛИ в 100 мкл буфера для окрашивания FBS. В каждую пробирку добавляли 5 мл 104D2-BV421 (антитела мыши против IgG1 к человеку, Biolegend, San Diego CA) и инкубировали на льду в течение 1 ч. После еще одной промывки буфером для окрашивания FBS измеряли общее количество рецепторов cKIT с помощью проточной цитометрии, оценивая среднюю интенсивность флуоресценции BV421 с помощью FACS Canto II® (BD Biosciences, San Jose, CA).

Как показано на фиг. 13B, cKIT быстро интернализуется после связывания NEG085, при этом основной объем интернализации происходит быстро (15 мин), а затем количество cKIT на поверхности

продолжает неуклонно снижаться до конечной точки 4 ч.

Пример 16. Оценка способности NEG085-MCC-DM1 модулировать деградацию сKIT в клеточной линии, экспрессирующей сKIT дикого типа (NCI-H526), или клеточной линии, экспрессирующей мутантный сKIT (GIST-T1).

Накануне ночью  $5 \times 10^6$  клеток GIST-T1 (любезно предоставленных Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan) или NCI-H526 (ATCC CRL-5811) высевали в среды для выращивания (DMEM, 10% FBS для GIST T-1 и RPMI, 10% FBS для NCI-H526) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали 100 мМ циклогексимида (CHX) (кат. № 090M4009, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) в среде без метионина (GIBCO: DMEM, 21013-024; RPMI, A14517-01, Life Technologies, Carlsbad, CA). Клетки обрабатывали 5 мкг/мл ADC (NEG085-MCC-DM1), 10 нг/мл rh-SCF (R&D, 255-SC) или и ADC, и rh-SCF в течение 1, 4 или 6 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали через 1, 4 и 6 ч после обработки в 1 мл PBS. Клеточные осадки лизировали на льду в течение 60 мин в 50 мкл лизирующего буфера (20 мМ Трис-HCl; pH7,5, 137 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 15% глицерина, ингибиторы протеазы и фосфатазы). Затем лизаты центрифугировали в течение 40 мин при 12000 об/мин при 4°C. Пять мкг каждого образца кипятили в течение 10 мин при 75°C и нагружали на 15-луночный гель NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (NP0323BOX Life Technologies, Carlsbad, CA). После переноса белка на мембранны для блоттинга, их блокировали в TBST-5% молоке при комнатной температуре в течение 1 ч и затем обрабатывали антителом против сKIT (Cell Signaling Technology кат. № 3074, Beverly, MA) в течение ночи при 4°C. На следующий день blotы промывали в TBST (4×5 мин). Блот инкубировали с вторичным антителом (антитело козы против кролика, конъюгированное с HRP 1:30,000, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) в течение 1 ч при комнатной температуре. Блот промывали в TBST (4×5 мин) и проявляли. Первичными антителами, используемыми для вестерн-блоттинга, являлись антитело против сKIT (Cell Signaling Technology кат. № 3074) и GAPDH (Cell Signaling Technology кат. № 3683). На фиг. 14 А/В показана динамика деградации рецептора сKIT, опосредуемая NEG085-MCC-DM1. Деградация являлась быстрой, при этом ее уровни становились низкими/неопределяемыми через 6 ч. Необходимо отметить, что деградация рецептора сKIT происходила быстрее, чем у SCF, при наличии NEG085-MCC-DM1 в клетках GIST T1, экспрессирующих мутантный рецептор сKIT (панель 14А). Кроме того, NEG085-MCC-DM1 не блокирует связывание рецептора сKIT с SCF, так как добавление NEG085-MCC-DM1 и SCF обеспечивает более быструю деградацию, как показано на фиг. 14В. Если бы NEG085-MCC-DM1 являлся блокатором лиганда, то не наблюдали бы различий между NEG085-MCC-DM1 и NEG085-MCC-DM1 с SCF.

Пример 17. Неконъюгированное NEG085 и 20376 не ингибирует пролиферацию SCF-зависимой клеточной линии Mole.

Для оценки потенциальных антагонистических свойств неконъюгированных антител и способности лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию сKIT-экспрессирующую клеточную линии, Mo7e (DSMZ, кат. № ACC-104, Braunschweig, DE) выращивали в присутствие или отсутствие лиганда сKIT, фактора стволовых клеток (SCF), для выживания. Клетки Mo7e выращивали с 10 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека ГМ-КСФ (R&D Systems кат. № 215-GM, Minneapolis, MN) или 10 нг/мл фактора стволовых клеток человека SCF (R&D Systems кат. № 255-SC) перед высеванием в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3904, Corning, Tewksbury, MA) при плотности 5000 клеток/лунку в 100 мкл среды для разведения. Получали планшет для параллели для измерения дня 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. После этой инкубации добавляли дополнительные 50 мкл среды для разведения, а затем 90 мкл/лунку реагента Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Madison, WI) в каждую лунку планшета, обозначенного как "день 0". Планшеты для анализа осторожно встряхивали в течение 20 мин и измеряли полученную интенсивность люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer 1450 Microbeta TriLux® (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые неконъюгированные Ab и ADC получали в 3-кратной концентрации; 30 мкг/мл в соответствующей среде для культивирования клеток и 5-кратно серийно разводили с получением 8 точек. Также получали лунки только со средой, служащие в качестве отрицательных контролей. Добавляли 50 мкл 3-кратно серийно разведенных антител или ADC (конечная концентрация для анализа 0,0009-68 нМ) перед инкубацией в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. После этого периода инкубации определяли относительную жизнеспособность клеток посредством добавления реагента Celltiter Glo, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% ингибирования=(обработанные ADC или Ab)/(необработанные)\*100). Данные % ингибирования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения IC<sub>50</sub>.

Как показано на фиг. 15 и 16, неконъюгированные антитела против сKIT не ингибировали клеточную пролиферацию. Как показано на фиг. 15, NEG085-MCC-DM1 сравнивают с неконъюгированным NEG085, NEG024 и 20376. Как четко показано на графике, NEG085-MCC-DM1 ингибирует пролиферацию клеток Mo7e при низкой концентрации, в то время как неконъюгированные антитела не обладают этим эффектом. Контроль IgG-MCC-DM1 обладает большим антипопулятивным эффектом, чем не-

конъюгированное NEG085, NEG024 или 20376.

Также на фиг. 16 показано, когда в эксперименте используют ГМ-КСФ, а не SCF, для устранения эффекта интернализации в отношении рецептора cKIT, которым обладает лиганд SCF. Результат, представленный на фиг. 16, соответствует тому, что, как показано на фиг. 15, неконъюгированное антитело NEG085 не оказывает отрицательного воздействия на клеточную пролиферацию, аналогично неконъюгированному контролльному IgG. В целом, результаты, представленные на фиг. 15 и 16, свидетельствуют о том, что снижение клеточной пролиферации является результатом конъюгации антител против cKIT с токсином.

Пример 18. Оценка активности ADCC *in vitro*.

Способность неконъюгированных антител против cKIT (NEG085, 20376) опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность определяли в отношении клеток Uke-1 (клеток-мишеней; любезно предоставленных Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany) при совместной инкубации с клетками NK3.3 (клетками-киллерами или эффекторными клетками; любезно предоставленными Jacky Kornbluth из Saint Louis University). В кратком изложении, клетки Uke-1 окрашивали ацетоксиметиловым сложным эфиром кальцеина (кальцеин-AM; Sigma-Aldrich кат. № 17783-5MG, St. Louis, MO), два раза промывали, отбирали пипеткой в 96-луночный планшет для микротитрования (96-луночный, с U-образным дном, из прозрачного пластика; Corning Costar, кат. № 650 160, Tewksbury, MA) в концентрации 5000 клеток на лунку и преинкубировали в течение 10 мин с серийными разведениями указанных выше антител и белков (от 50,000 до 0,003 мкг на мл) перед добавлением эффекторных клеток NK3.3 на 1 ч при соотношении эффектора с мишенью 20 к 1. Для вычисления антитело-специфичного лизиса клеток-мишеней осуществляли параллельную инкубацию клеток-мишеней только без антитела или эффекторных клеток, служащих в качестве базового уровня и отрицательного контроля, в то время как положительный контроль или максимальный лизис или 100% специфичного лизиса определяли посредством лизиса клеток-мишеней только с 1% раствором Triton-X 100. В качестве дополнительного положительного контроля использовали MabCampath® (Sanofi, Paris, FR), распознавающее CD52 на клетках Uke-1. После совместной инкубации мишени и эффекторных клеток планшет для микротитрования центрифугировали и переносили аликвоту супернатанта в другой планшет для микротитрования (96-луночный, плоскодонный, черный с прозрачным дном; (Corning Costar, кат. № 3904, Tewksbury, MA) и определяли концентрацию свободного кальцеина в растворе с использованием счетчика флуоресценции (счетчика множества меток Victor 3®, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Результаты представлены на фиг. 17. Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) является механизмом опосредованного клетками иммунитета, посредством которого эффекторная клетка лизирует клетку-мишень, с которой связаны специфические антитела. В этом эксперименте MabCampath®, а также антитела против cKIT 20376 и NEG085 являются неконъюгированными антителами IgG1 человека. Как показано на фиг. 17, только антитело MabCampath опосредовало уничтожение клеток-мишеней посредством ADCC. 20376 и NEG085 являлись неспособными индуцировать ADCC даже в более высоких концентрациях. В связи с этим, любое уничтожение клеток, наблюдаемое при использовании ADC, например, NEG085-MCC-DM1, не является результатом механизма ADCC.

Пример 19. Способность NEG085 и 20376 вызывать апоптоз тучных клеток исследовали с использованием первичных тучных клеток человека.

Культивировали первичные тучные клетки человека из периферической крови человека способами, описываемыми в Saito et al., Nature Protocols 2006; 1 (4): 2178-2183. Тучные клетки, находящиеся в жидкой культуре минимум в течение одной недели, инкубировали с увеличивающимися концентрациями (0,05-100 нМ) Ab против cKIT человека, NEG085 и 20376, или изотипическим контролльным IgG, в присутствие 1,6 нМ rhSCF (Genscript, кат. № Z00400, Piscataway, NJ) в течение 48 ч при 37°C перед добавлением реагента Caspase-Glo® 3/7 (Promega, кат. № G8093, Madison, WI) для измерения апоптоза. После 30 мин инкубации при RT регистрировали люминесценцию с помощью спектрофотометра для чтения планшетов BioTek Synergy (BioTek, Winooski, VT).

Так как cKIT экспрессируется на тучных клетках, любые терапевтические антитела против cKIT не должны вызывать истощение тучных клеток. На фиг. 18 показан анализ апоптоза с использованием первичных тучных клеток человека после обработки Ab против cKIT человека или изотипическим контролльным Ab в присутствие 1,6 нМ rhSCF. Первичные тучные клетки человека инкубировали с увеличивающимися концентрациями антител против cKIT NEG085 и 20376 или изотипического контролльного IgG. Как показано на фиг. 18, неконъюгированные антитела NEG085 и 20376 не приводили к апоптозу первичных тучных клеток человека *ex vivo*.

Пример 20. Способность NEG085 и 20376 опосредовать дегрануляцию тучных клеток определяли с использованием первичных тучных клеток человека.

Культивировали первичные тучные клетки человека из периферической крови человека способами, описываемыми Saito et al. (выше). Тучные клетки, находящиеся в жидкой культуре минимум в течение одной недели, предварительно обрабатывали 5% Ag-специфичным IgE JW8 (партия для внутреннего пользования ACE 27283), 95% неспецифическим моноклональным IgE человека (Abbiotec, кат. №

12030635, San Deigo, CA) и 10 нг/мл rhIL-4 (R&D Systems кат. № 204-IL, Minneapolis, MN) в течение 5 дней при 37°C. Затем клетки инкубировали с увеличивающимися концентрациями (0,05-100 нМ) изотипического контрольного IgG, Ab против cKIT человека, 20376 и NEG085, Ab против IgE, LE27, или антигена NIP(5)BSA в присутствие Fc-специфического Ab козы против IgG человека (H+L) (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-008-JIR, West Grove, PA) в течение 90 мин при 37°C. Затем клетки центрифугировали и переносили супернатанты в 96-луночные черные планшеты перед добавлением субстрата β-гексозаминаидазы.

После 90 мин инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением трис-основания (Sigma, кат. № T1503-500G, pH 12, St. Louis, MO) и регистрировали интенсивность флуоресценции с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Envision®.

Как и в предыдущем эксперименте в примере 19, важно оценивать любое отрицательное воздействие антител против cKIT на тучные клетки. Если в предыдущем эксперименте исследовали апоптоз тучных клеток, то эти эксперименты направлены на дегрануляцию тучных клеток. Как показано на фиг. 19, положительные контроли NIP(5) и LE27 демонстрировали высокие уровни дегрануляции тучных клеток. В отличие от этого, антитела против cKIT NEG085 и 20376 не индуцировали дегрануляцию первичных тучных клеток человека ex vivo.

Пример 21. Точная модуляция фармакодинамического маркера in vivo с помощью ADC против cKIT.

Проводили исследования для оценки способности ADC против cKIT NEG027-MCC-DM1 модулировать фармакодинамические маркеры in vivo, включающие анализ колоколизации антитела NEG027 с фармакодинамическим (PD) событием митотического блока в ксенотрансплантате опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Целью этих исследований являлась оценка степени и длительности ареста клеточного цикла G2/M.

Наличие ADC косвенно определяли с помощью детекции антитела IgG человека (представляющего собой NEG027 у мыши) в опухоли с использованием иммуногистохимического подхода. Аффинно очищенное антитело кролика против IgG человека (H+L) получали из Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 309-005-082, West Grove, PA). Антитело реагировало с целой молекулой IgG человека и легкими цепями других иммуноглобулинов человека с минимальной перекрестной реактивностью с белками сыворотки мыши. В кратком изложении, способ ИHC включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 32 мин при комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315, Ventana, Tucson, AZ) в течение 32 мин.

Накопление рН3-положительных ядер, оцениваемое с помощью иммуногистохимии, использовали в качестве маркера ареста G2/M. Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим фосфопептидом, соответствующим остаткам, окружающим Ser10 гистона H3 человека (рН3), получали из Cell Signaling Technology (Danvers, MA, кат. № 9701). В кратком изложении, способ ИHC включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное антитело разбавляли до 1:50 и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 мин.

Для оценки индуцированных ADC против cKIT изменений PD маркера в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1 самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток в суспензии, содержащей 50% Matrigel™ (BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Мыши случайным образом предписывали введение однократной i.v. дозы NEG027-MCC-DM1 (2,5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2,5 мг/кг) или трис-забуференного физиологического раствора (TBS; 5 мл/кг) при достижении опухолью объема от 300 до 500  $\text{mm}^3$  (n=3/группу). С помощью иммуноокрашивания на IgG человека определяли локализацию NEG027, и она коррелировала с областями большей плотности иммуноокрашивания рН3 (типичные изображения представлены на фиг. 20), подтверждая колоколизацию антитела с фармакодинамическим эффектом. В соответствии с ожидаемым механизмом действия полезной нагрузки майтанизина, NEG027-MCC-DM1 вызывал значительное, зависящее от времени повышение процентной доли клеток, положительных по рН3, с пиками через 33 и 48 ч после введения дозы относительно неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 или обработанного PBS контроля с возвращением сигнала к базовому уровню приблизительно через неделю (типичные изображения представлены на фиг. 21, график представлен на фиг. 22). Также оценивали зависящие от времени изменения в расщепленной каспазе 3. В этих исследованиях поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим амино-концевым остаткам, смежным с (Asp 175) в каспазе-3 человека, получали из EMD Milli-

рого (кат. №PC679). Способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное антитело разбавляли до 20 мкг/мл и инкубировали в течение 32 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 мин.

Аналогично pH3, также наблюдали зависящие от времени изменения в расщепленной каспазе 3 (типичные изображения представлены на фиг. 21, график представлен на фиг. 22). Эти данные свидетельствуют о том, что ADC против cKIT NEG027-MCC-DM1 способно вызывать сильные клеточные PD эффекты *in vivo*, соответствующие механизму действия полезной нагрузки майтанзиноида.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухоли GIST T1 представлена для визуализации профиля окрашивания в этой модели ксенотрансплантата (фиг. 21). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической C-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 мин.

Пример 22. Эффективность ADC против cKIT *in vivo* в отношении гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) у мышей.

Противоопухолевую активность ADC оценивали на нескольких моделях ксенотрансплантатов опухолей. Дозозависимую противоопухолевую активность и фармакокинетику (PK) ADC против cKIT человека, перекрестно не реагирующего с cKIT мыши, NEG027-MCC-DM1 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл.

Мышей включали в исследование через 10 дней после имплантации при среднем объеме опухоли 207  $\text{mm}^3$ . После случайного включения в одну из пяти групп ( $n=9$ /группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS, наполнителя для ADC (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2,5 мг/кг) или NEG027-MCC-DM1 (0,625, 1,25 или 2,5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю. Контроль IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 2,5 мг/кг. NEG027-MCC-DM1 в дозе 0,625 демонстрировал статистически значимую эффективность по сравнению с группой введения TBS, однако, дозы 1,25 и 2,5 мг/кг вызывали даже большую эффективность, индуцируя схожую остановку роста объема опухоли при измерениях штангенциркулем, хотя при гистологической оценке не выявляли наличие опухолевых клеток. Вместо смеси соединительной ткани, жировая ткань и сегменты периферических нервов и поперечнополосатых мышц являлись основными тканевыми компонентами на этих срезах. Это подтверждает гистологическое регрессирование опухоли (фигуры 23-26).

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1, 24 ч и 4, 7, 11 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряли общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляли детекцию с HRP-конъюгированным антителом против IgG человека перед считыванием на соответствующем спектрофотометре для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1, с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с помощью HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. PK пропорциональна дозе с приблизительным временем полужизни в сыворотке семь дней (фигуры 23-24).

Т.к. однократная доза NEG027-MCC-DM1 0,625 мг/кг вызывала лишь задержку роста опухоли GIST T1, таким образом, предоставляя динамический диапазон для оценки различающихся активностей ADC, этот уровень дозы выбирали для оценки эффективности набора близкородственных ADC, также полученных из исходного ADC 9P3-MCC-DM1 мыши. Самкам мыши SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 10 дней после имплантации при среднем объеме опухоли 195  $\text{mm}^3$ . После случайного распределения по группам ( $n=8$ /группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (8 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG085-MCC-DM1 (0,625 мг/кг), NEG08 6-MCC-DM1 (0,625 мг/кг), NEG087-MCC-DM1 (0,625 мг/кг), NEG024-MCC-DM1 (0,625

мг/кг) или NEG026-MCC-DM1 (0,625 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 27-29). Контрольное IgG1-MCC-DM1, даже в высокой дозе 10 мг/кг, являлось неактивным. ADC против сKIT, вводимые в дозе 0,625 мг/кг, статистически не отличались друг от друга. В группах, которым вводили NEG085-MCC-DM1 и NEG024-MCC-DM1, наблюдали наименьшие объемы опухолей в самом узком диапазоне.

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1, 24 ч и 3, 7, 10, 14 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM соответственно. Для оценки параметров РК сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей РК антитела измеряют общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляли детекцию с HRP-конъюгированным антителом против IgG человека перед считыванием на соответствующем спектрофотометре для считывания планшетов. При анализе РК конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1, с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с помощью HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. Эти ADC демонстрировали схожие уровни воздействия на сыворотку (фигура 30).

Пример 23. Эффективность ADC против сKIT *in vivo* в отношении мелкоклеточного рака легких у мышей.

Противоопухоловую активность набора ADC оценивали в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H1048 с умеренным иммуноокрашиванием на сKIT, при котором наблюдали большую гетерогенность по сравнению с ксенотрансплантатами опухоли GIST T1 (фиг. 21-фиг. 30). NEG085-MCC-DM1 сравнивали с набором ADC против сKIT, являющихся сильными антагонистами передачи сигнала сKIT, ни один из которых не связывается с сKIT мыши. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование 15 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 120  $\text{mm}^3$ . Всем исследуемым группам вводили однократную внутривенную дозу 2 мг/кг. После случайного распределения по группам ( $n=8/\text{группу}$ ) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2 мг/кг), NEG024-MCC-DM1, NEG085-MCC-DM1 и NEG086-MCC-DM1. Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 31, 32). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. NEG085-MCC-DM1 имел тенденцию в сторону эффективности при низком ДТ/ДС 9%, но статистически не отличался от наполнителя в этой дозе 2 мг/кг. NEG024-MCC-DM1 и NEG026-MCC-DM1 являлись значимо эффективными.

Противоопухоловую эффективность ADC против сKIT также оценивали на модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H1048, оценивали дозозависимую противоопухоловую активность NEG085-MCC-DM1. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 11 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 150-200  $\text{mm}^3$ . После случайного распределения по группам ( $n=8/\text{группу}$ ) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (2,5, 5 и 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 33, 34). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным, как и доза 2,5 мг/кг NEG085-MCC-DM1. Однако дозы 5 и 10 мг/кг являлись значимо эффективными.

Противоопухоловую активность двух ADC против сKIT оценивали во второй модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких с более высокими уровнями сKIT, аналогичными ксенотрансплантатам опухоли GIST T1 (типичные фотографии представлены на фиг. 21, и графики представлены на фиг. 35). Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $6 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 6 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 150  $\text{mm}^3$ . После случайного распределения по группам ( $n=9/\text{группу}$ ) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (8 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG024-MCC-DM1 (2,5, 5 и 10 мг/кг) и перекрестно реагирующего с с-Kit мыши ADC 20376-MCC-DM1 (10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 35 и 36). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. 20376-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг исходно приводил к регрессированию опухоли, однако после исходного регрессирования наблюдали рецидив опухоли. Наблюдали значительную дозозависимую эффективность трех доз NEG024-MCC-DM1 с непрерывным длительным регрессированием при дозе 10 мг/кг, при этом опухоли начинали повторно расти через 60 дней, что позволяет предполагать, что в случае 20376-MCC-DM1 может потребоваться больше однократной дозы, вводимой в этом исследовании. Воздействие на сыворотку дозы 10 мг/кг

20376-MCC-DM1 и NEG024-MCC-DM1 являлось приблизительно эквивалентным.

Пример 24. Эффективность ADC против cKIT *in vivo* в отношении острого миелогенного лейкоза у мышей.

Дозозависимую противоопухолевую активность ADC против cKIT мышного 9P3-MCC-DM1 и 9P3-SPDB-DM4 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли острого миелогенного лейкоза Kasumi-1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самкам мышей SCID-beige подкожно в правый бок трансплантировали 2-3 фрагмента фрагментированных тканей опухоли Kasumi-1 размером 1  $\text{мм}^3$  с Matrigel™ (BD Biosciences). Мышей с опухолями Kasumi-1 включали в исследование через 21 день после имплантации со средним объемом опухоли 150  $\text{мм}^3$ . После случайного распределения в одну из восьми групп (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу PBS (200 мкл), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (10 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) и 9P3-SPDB-DM4 (1 или 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли три раза в неделю (фиг. 37). Контрольный IgG1-SPDB-DM4 не являлся значимо активным в дозе 10 мг/кг. Наблюдали регрессирование роста опухоли при использовании 9P3-SPDB-DM4 в дозах 5 и 10 мг/кг.

Таблица 10

Эффективность Kasumi-1

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли	Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ( $\Delta T/\Delta C$ ) (%)	Процентная доля потери массы тела (%)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
PBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	6,36	8/8
IgG-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	98	3,06	8/8
9P3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	11	-0,62	8/8
9P3-SPDB-DM4	1 мг/кг	однократная i.v. доза	65	-0,05	8/8
9P3-SPDB-DM4	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-83	-1,72	8/8

Пример 25. Эффективность ADC против cKIT *in vivo* в отношении мастоцитоза у мышей.

Противоопухолевую активность ADC против cKIT мышного 9P3-MCC-DM1 и 9P3-SPDB-DM4 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли HMC-1.2, экспрессирующей мутантный cKIT. Клеточная линия HMC-1.2 любезно предоставлена Dr. Joseph Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, MN. Самкам бестимусных мышей Foxn-1 подкожно имплантировали 3, 5 и  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в средах DMEM без FBS. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 100 мкл.

Мышей, несущих опухоли HMC-1.2, включали в это исследование через 33 дня после имплантации со средним объемом опухоли 100  $\text{мм}^3$ . После случайного распределения в одну из трех групп (n=4/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу PBS (200 мкл), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли три раза в неделю (фиг. 38). Регрессирование опухоли наблюдали для 9P3-SPDB-DM4 и 9P3-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг.

Таблица 11  
Исследование HMC-1

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли	Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ( $\Delta T/\Delta C$ ) (%)	Процентная доля потери массы тела (%)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
PBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	13,49	4/4
9Р3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	6	7,71	4/4
9Р3-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-40	3,25	4/4

Пример 26. Эффективность *in vivo* перекрестно реагирующего с cKIT мыши ADC против cKIT 20376-MCC-DM1.

Дозозависимую противоопухолевую активность и фармакокинетику (PK) ADC против cKIT человека, перекрестно реагирующего с cKIT мыши, 20376-MCC-DM1 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 10 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 200  $\text{mm}^3$ . После случайного распределения в одну из пяти групп (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG085-MCC-DM1 (0,625 мг/кг) или 20376-MCC-DM1 (0,625, 2,5, 5 или 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 39-41). Контрольный IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 10 мг/кг. 20376-MCC-DM1 также являлся неэффективным, в то время как NEG085-MCC-DM1 в дозе 0,625 демонстрировал низкую эффективность, хотя также статистически не значимую. 20376-MCC-DM1 в дозах 2,5, 5 и 10 мг/кг являлся значимо эффективным.

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1, 24 ч и 4, 7, 11 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряют общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специальным) и осуществляли детекцию с использованием HRP-конъюгированного антитела против IgG человека перед считыванием с помощью соответствующего спектрофотометра для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с 1 молекулой DM1 с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с использованием HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. При использовании ADC 20376-MCC-DM1, перекрестно реагирующего с cKIT мыши, PK не являлась пропорциональной дозе по причине того, что связывание ADC с cKIT мыши в нормальных тканях влияло на воздействие (опосредуемое тканями распределение лекарственного средства), и, таким образом, наблюдают четкое различие концентраций 20376-MCC-DM1 и ADC NEG085-MCC-DM1, не реагирующего перекрестно с cKIT мыши, в сыворотке (фиг. 40). Этим объясняют различие в эффективности между двумя ADC в низкой дозе 0,625 мг/кг. При более высоких дозах ткань эффект опосредуемого тканями распределения лекарственного средства является менее выраженным, и становится очевидной эффективность в модели ксенотрансплантата опухоли GIST T1 у мышей.

Пример 28. Эффективность ADC против cKIT с линкером/полезной нагрузкой SPDB-DM4 *in vivo* в отношении гастроинтестинальных стромальных опухолей.

Дозозависимую противоопухолевую активность ADC 9Р3 мыши (из которого получали NEG024 и

NEG085) с MCC-DM1 (нерасщепляемым) и SPDB-DM4 (расщепляемым) линкерами/полезными нагрузками сравнивали в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 18 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 170  $\text{мм}^3$ . После случайного распределения по группам (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неконьююгированного антитела мыши 9P3 (10 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (10 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (5 и 10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (2,5 и 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигуры 42, 43). Ни контрольные неспецифические ADC IgG1, ни неконьююгированное 9P3 не являлись эффективными. Все ADC 9P3 являлись эффективными при тестируемых уровнях доз; однако в группе, которой вводили 2,5 мг/кг 9P3-SPDB-DM4, они являлись немного менее эффективными, чем в других группах.

Дозависимую противоопухолевую активность ADC 9P3 мыши (из которых получали NEG024 и NEG085) с MCC-DM1 (нерасщепляемым) и SPDB-DM4 (расщепляемым) линкерами/полезными нагрузками сравнивали во второй модели ксенотрансплантата гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST430, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 11 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 200  $\text{мм}^3$ . После случайного распределения по группам (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неконьююгированного антитела мыши 9P3 (10 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (5 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигуры 44, 45). Ни один из контрольных неспецифических IgG1 ADC не являлся эффективным. Однако, оба ADC 9P3 являлись схоже эффективными при тестируемых уровнях доз.

#### Пример 29. Состав.

Лекарственной формой для клинического исследования (CSF) ADC является лиофилизатом в сосуде, содержащем 50 мг MCC-DM1 против cKIT, 16,2 мг сукцинат натрия, 410,8 мг сахарозы и 1 мг полисорбат 20 (без учета перенаполнения 10% для обеспечения исключения указанного содержимого). После восстановления лиофилизата с помощью 5 мл воды для инъекций получают раствор, содержащий 10 мг/мл MCC-DM1 против cKIT, 20 mM сукцинат натрия, 240 mM сахарозу и 0,02% полисорбата 20 при pH 5,0.

Для последующего внутривенного введения полученный раствор, как правило, будут дополнитель но разбавлять раствором носителя для получения готового к использованию раствора ADC для инфузий.

В случае CSF выбирали концентрацию ADC 10 мг/мл с учетом предварительного тестирования стабильности. Выбирали концентрацию сахарозы 240 mM для получения изотонического состава, для поддержания аморфной структуры уплотненного осадка лиофилизата и для обеспечения стабилизации белка.

Важные аналитические способы определения стабильности для выбора наиболее стабильного состава включали, помимо прочего, эксклюзационную хроматографию для определения уровней агрегации, тестирование невидимых невооруженным взглядом частиц вещества, определение свободного токсина и тестирование активности.

Предварительное исследование показало, что полисорбат 20 в концентрации 0,02% обеспечивает достаточную стабилизацию против механического напряжения. Исследования стабильности жидкой и лиофилизированной форм в условиях реального времени и условиях ускоренного исследования стабильности (25°C и 40°C) показали, что состав с сукцинатом, pH 5,0, обеспечивает лучшую общую стабильность при хранении. Особенно важно в этом составе то, что можно достигать лучшего баланса среди всех тестируемых составов между агрегацией и высвобождением свободного токсина. Через три месяца при 40°C не определяли значимого повышения продуктов деградации.

Пример 30. Точная модуляция фармакодинамического маркера In vivo с помощью ADC против cKIT.

Осуществляли исследования для оценки способности ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 модулировать фармакодинамические маркеры in vivo, включающие исследование колокализации антитела NEG085 с фармакодинамическим (PD) событием митотического блока в ксенотрансплантате опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Целью этих исследований являлась оценка степени и длительности ареста клеточного цикла G2/M.

Накопление фосфо-гистон H3 (pH3)-положительных ядер, оцениваемое с помощью иммуногистохимии, использовали в качестве маркера ареста G2/M. Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим фосфопептидом, соответствующим остаткам, окружающим Ser10 гистона H3 человека (pH3) получали из Cell Signaling Technology (Danvers, MA, кат. № 9701). В кратком изложении, способ ИС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ).

Первичное антитело разбавляли 1:50 и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 мин.

Для оценки индуцируемых ADC изменений PD маркера в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток в суспензии, содержащей 50% Matrigel™ (BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей случайным образом распределяли для введения однократной i.v. дозы NEG085-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или трис-буфера (10 mM Трис-HCl, 80 mM NaCl, 3,5% сахарозы, 0,01% Tween 20, pH 7,5) при достижении опухолями объема от 200 до 300  $\text{mm}^3$  (n=3/группу).

В соответствии с ожидаемым механизмом действия полезной нагрузки майтанзиноида NEG085-MCC-DM1 приводил к значительному, зависящему от времени повышению процентной доли клеток, положительных по рН3, и, таким образом, аресту клеточного цикла. Позитивность по рН3 достигала пика через 1-2 дня после введения дозы относительно неспецифического изотипического IgG1-MCC-DM1 или обработанного Трис-буфером контроля с падением сигнала через четыре дня после обработки (типичные изображения представлены на фиг. 46, и график представлен на фиг. 47).

Пример 31. Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) у мышей.

Противоопухолевую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на двух моделях ксенотрансплантатов опухолей GIST. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухолях GIST T1 и GIST430 представлены для визуализации профиля окрашивания в этих моделях ксенотрансплантатов (фиг. 48А и 49А, соответственно). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической С-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИИС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 мин.

Для исследования эффективности с использованием GIST T1 мышей включали в исследование через 18 дней после имплантации со средним объемом опухоли  $\sim 118\text{-}234 \text{ mm}^3$ . После случайного распределения в одну из пяти групп (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу Трис-буфера (наполнитель для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (1,25, 2,5 или 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 48В и 48С). Контрольный IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 5 мг/кг. Мышам, которым вводили NEG085-MCC-DM1 в дозах 1,25, 2,5 и 5 мг/кг, имели опухоли, демонстрирующие процент среднего изменения объема опухоли по сравнению с контролем, которому вводили Трис-буфер, ( $\Delta T/DC$ ) 63, 11 и 12%, соответственно, и совокупность этих данных представлена в табл. 12. Введение NEG085-MCC-DM1 являлось хорошо переносимым на всех уровнях доз.

Таблица 12

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши в день 38

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ( $\Delta T/\Delta C$ ) (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $mm^3 \pm SEM$ )	Среднее изменение массы тела ( $\% \pm SEM$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	1132±331	4,8±2,3	9/9
IgG-SMCC-DM1 изотипический контроль	5 мг/кг	однократная i.v. доза	75	849±281	5,5 ± 1,6	9/9
NEG085-MCC-DM1	1,25 мг/кг	однократная i.v. доза	63	712±225	2,1±2,2	9/9
NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	11	128±85	-0,7±1,0	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	12	140±63	1,6±1,2	9/9

Для исследования эффективности с использованием GIST 430 мышей включали в исследование через 12 дней после имплантации со средним объемом опухоли 125-200  $mm^3$ . После случайного распределения по группам (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу Трис-буфера (наполнителя для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг),

неконъюгированного антитела NEG085 или NEG085-MCC-DM1 (2,5, 5 или 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 49В и 49С). Контрольный IgG1-MCC-DM1 и неконъюгированное NEG085 являлись неактивными в дозе 10 мг/кг. NEG085-MCC-DM1 в дозе 2,5 и 5 мг/кг не являлось значимо активным (ЛТ/ЛС 78% и 56%, соответственно), как и сравниваемый иматиниб (ЛТ/ЛС 47%), исходно вводимый в дозе 100 мг/кг, со снижением дозы до 80 мг/кг по причине плохой переносимости на уровне дозы 100 мг/кг у мышей SCID-beige. Доза 10 мг/кг являлась значимо эффективной (ЛТ/ЛС 19%), как графически изображено на фиг. 49В и представлено в табл. 13. Введение NEG085-MCC-DM1 являлось хорошо переносимым на всех уровнях доз.

Таблица 13

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST430 мыши в день 28

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ( $\Delta T/\Delta C$ ) (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $mm^3 \pm SEM$ )	Среднее изменение массы тела ( $\% \pm SEM$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель контроль	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	864±103	-0,3±1,3	8/8
IgG-MCC-DM1 изотипический контроль	10 мг/кг	однократная i.v. доза	124	1070±98	1,9±0,8	8/8
Неконъюгированное NEG085	10 мг/кг	однократная i.v. доза	88	760±119	3,9±1,7	8/8
NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	78	674±83	4,8±0,6	8/8
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	56	485±70	5,5±1,8	8/8
NEG085-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	19	167±42	1,5±1,8	8/8
Иматиниб	100 мг/кг	Twice daily PO	47	408±65	1,5±0,7	6/8

Пример 32. Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении мелкоклеточного рака легких у мышей.

Противоопухоловую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на модели ксе-

нотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H526. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали  $10 \times 10^6$  клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухоли NCI-H526 представлена для визуализации профиля окрашивания в этой модели ксенотрансплантата (фиг. 50А). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической С-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИИС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-коньюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 мин.

Мышей включали в исследование через шесть дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 180  $\text{mm}^3$ . После случайного распределения по группам ( $n=9$ /группу) мышам вводили однократную i.v. дозу Трис-буфера (наполнителя для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (1,25, 2,5 и 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 50В и 50С). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. NEG085-MCC-DM1 в дозе 1,25 мг/кг исходно индуцировал прекращение роста объема опухоли с последующим повторным ростом опухоли. Введение 2,5 и 5 мг/кг являлось значимо эффективным, вызывая регрессирование опухоли (регрессирование 74 и 96% соответственно), и это показано на фиг. 50В и представлено в табл. 14. При введении этих доз наблюдали повторный рост опухолей приблизительно через 3 недели после введения однократной дозы. Все введения NEG085-MCC-DM1 являлись хорошо переносимыми.

Таблица 14

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 мыши в день 28

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела ( $\% \pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	1165±159	4,9±0,9	9/9
IgG1-MCC-DM1 изотипический контроль	5 мг/кг	однократная i.v. доза	109	-	1274±282	6,4±1,3	9/9
NEG085-MCC-DM1	1,25 мг/кг	однократная i.v. доза	8	-	99±57	-0,2±0,8	8/9 1 мышь с большой опухолью исключали из исследования в день 16"
NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-73,96	-139±25	-1,6±1,1	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-95,76	-174±10	3,8±1,5	9/9

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1, 24 ч и 5, 1, 9, 14, 21 и 28 дней после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряли общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывают антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляют детекцию с использованием HRP-коньюгированного антитела против IgG человека перед считыванием с помощью соответствующего спектрофотометра для считывания планшетов. При анализе PK коньюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1 с помощью колориметрического ELISA. В этом формате, планшеты покрывают антителом против майтанизина и определяют его с помощью HRP-коньюгированного антитела против IgG человека. В этом исследовании с использованием дозозависимая эффективность NEG085-MCC-DM1 коррелировала с дозозависимым воз-

действием общего антитела и ADC на сыворотку, измеряемым с помощью ELISA с антителом против общего антитела и антителом против майтанзина (фиг. 51А и 51В соответственно).

Пример 33. Эффективность ADC против cKIT *in vivo* в отношении острого миелогенного лейкоза у мышей.

Противоопухолевую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на модели системного первичного ксенотрансплантата AML (острого миелогенного лейкоза) KAMLX5343, разработанной в Novartis. Самкам мышей NSG системно имплантировали (с помощью инъекции в хвостовую вену)  $5 \times 10^6$  клеток в фосфатно-солевом буфере. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Мышей включали в исследование через 43 дней после имплантации со средней лейкемической нагрузкой приблизительно 14,8% CD45-положительных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). После случайного распределения по группам ( $n=6$ /группу) мышей оставляли без введения или вводили им ARA-C (цитарабин) интраперитонеально ежедневно в течение 6 дней или NEG085-MCC-DM1 (10 мг/кг) внутривенно один раз каждые две недели. Лейкемическую нагрузку измеряли с помощью проточной цитометрии. Еженедельно у всех исследуемых животных собирали кровь через хвостовую вену. Лизировали эритроциты и оставшиеся РМВС окрашивали с использованием антитела против hCD45 (eBioscience, San Diego CA, кат. № P/N 17-9459-42). Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACS Canto (BD Biosciences) (фиг. 52А). Массу тела измеряли два раза в неделю (фиг. 52В). ARA-C, хоть и эффективный у трех животных, являлся высокотоксичным, вызывая потерю массы тела >20% у других трех животных. Введение NEG085-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг приводило к замедлению прогрессирования опухоли, включая краткое регрессирование после второй дозы (фиг. 52А). Введение NEG085-MCC-DM1 являлось значимо эффективным по сравнению с необработанным контролем, как показано на фиг. 52 и в табл. 15. Введение NEG085-MCC-DM1 хорошо переносилось (фиг. 52В).

Таблица 15  
NEG085-MCC-DM1 в модели системного первичного ксенотрансплантата AML KAMLX5343 в день 71

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (%) CD45-положительных PBMC $\pm$ SEM)	Среднее изменение массы тела (с днем 67, % $\pm$ SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Необработанный	0 мг/кг	N/A	100	-	77,3 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 1,8	6/6
ARA-C (цитарабин)	50 мг/кг	Ежедневно в течение 6 дней, интраперитонеально	-	-52.5%	-6,6 $\pm$ 2,1	2,3 $\pm$ 2,3	3/6 (3 мыши не переносили введение, и их исключали из исследования после 6 дней введения)
NEG085-MCC-DM1	10 мг/кг	Каждые 2 недели, внутривенно	48,3	-	37,4 $\pm$ 5,4	1,8 $\pm$ 1,6	6/6

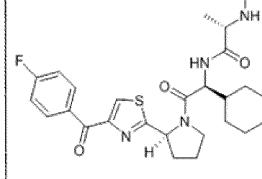
Пример 34. NEG085-MCC-DM1 в комбинированном лечении.

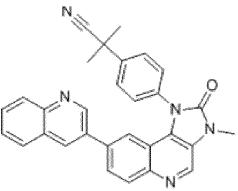
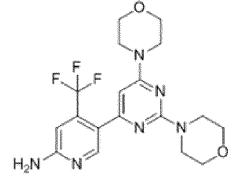
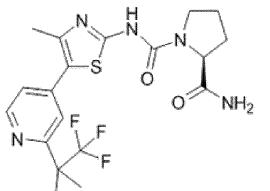
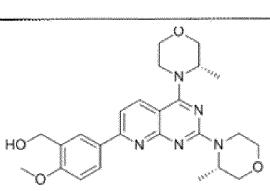
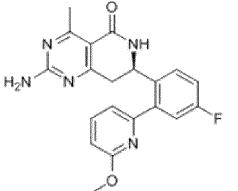
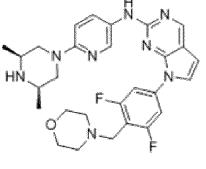
NEG085-MCC-DM1 тестировали в комбинации с низкомолекулярными ингибиторами с использованием различных доз-матриц. Вычисляли относительное ингибирование жизнеспособности клетки для каждой комбинации доз. Используя программное обеспечение Chalice (Zalucus, Cambridge MA) или приложение ComboExplorer (Novartis, Basel CH), сравнивали ответ на комбинацию с отдельными средствами с учетом широко используемой модели Loewe для аддитивности дозы лекарственного средства по отношению к самому себе (Lehar et al. Nat. Biotechnol. (2009), 27: 659-666; Zimmermann et al., Drug Discov. Today (2007), 12: 34-42). Избыточное ингибирование по сравнению с аддитивностью можно построить в виде полной схемы доза-матрица для визуализации концентраций лекарственного средства, когда имеет место синергия. Синергичные комбинации приводят к появлению областей избыточного ингибирования в дозе-матрице. В табл. 16 представлены данные для нескольких NEG085-MCC-DM1/комбинаций. "Аддитивность" наблюдали, когда комбинация приводила к тому же ингибиторному ответу в отношении жизнеспособности клеток при сравнении с ответом при использовании отдельного средства. Указывали

"синергию", когда ингибирование жизнеспособности клеток являлось большим, чем ответ отдельного средства, сравниваемого с ним самим. Альтернативно, "аддитивность" указывали при величине по шкале Loewe менее 5 и "синергию" указывали при величине по шкале Loewe более 5.

Жизнеспособность клеток определяли, измеряя содержание АТФ в клетках с использованием люминесцентного анализа CellTiter Glo (Promega, Madison, WI). За один день до добавления лекарственного средства 250-500 клеток GIST из 2 разных клеточных линий помещали в 384-луночные планшеты (Greiner, Monroe, NC) в 20 мкл среды для выращивания. Клетки GIST430 содержат двойную мутацию в cKIT, делающую их частично резистентными к Glivec® (Imatinib). Клетки GIST882 имеют одиночную мутацию в cKIT и являются чувствительными к Glivec® (Imatinib). Затем клетки инкубировали в течение 120 ч с различными концентрациями EG085-MCC-DM1 в качестве отдельного средства, соединениями отдельного средства или комбинациями NEG085-MCC-DM1/соединение перед добавлением реагента CellTiter Glo в каждую лунку и регистрацией люминесценции с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Envision (Perkin Elmer, Waltham MA). Значения люминесценции использовали для вычисления ингибирования жизнеспособности клеток относительно обработанных DMSO клеток (0% ингибирования).

Таблица 16

Мишени соединений	NEG085-MCC-DM1 в комбинации с:	Структура	Линия клеток GIST430	Линия клеток GIST882
RTKi	Glivec®	Иматиниб	Синергия	Аддитивность
RTKi	Sutent®	Сунитиниб	Аддитивность	Аддитивность
IAP?	NVP-LCL161		Синергия	Синергия

семейство PI3K	NVP-BEZ235		Аддитивность	Синергия
все PI3Ki	NVP-BKM120		Аддитивность	Синергия
PI3K	NVP-BYL719		Синергия	Синергия
mTOR <i>i</i> (cat.)	NVP-CCG168		Аддитивность	Аддитивность
mTOR <i>i</i> (allo.)	Afinitor®	Эверолимус	Синергия	Синергия
HSP90 <i>i</i>	NVP-HSP990		Аддитивность	Аддитивность
JAK2	NVP-BVB808		Аддитивность	Аддитивность

В заключение, антитела против сKIT, представленные в настоящем описании, имеют синергическое действие при использовании в комбинации с другими молекулами, что приводит к большему количеству вариантов лечения. Например, NEG085-MCC-DM1 можно вводить совместно с ингибитором IAP (например, NVP-LCL161) в качестве терапии для достижения синергического действия.

Пример 35. Картрирование зптипов NEG985.

Ограниченный протеолиз *in situ*.

Получали белок домена 1 (D1)-домена 3 (D3) внеклеточного домена (ECD) сKIT человека (регист-

рационный номер NM\_000222) с остатками Q26-G331 (N130S, N145S - эти изменения приводят к недостаточности гликозилирования для экспрессии белка в негликозилированной форме). Смешивали ECD D1-D3 cKIT человека и Fab NEG08S в равных молярных отношениях и подвергали этапу конечной гель-фильтрации, уравновешенной 20 mM Трис-HCl, pH 7,5 и 100 mM NaCl, и концентрировали до 20 мг/мл. Трипсин добавляли к образцу для кристаллизации белкового комплекса для получения разведения 1:100 мас./мас. Смесь протеаза/образец инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед началом эксперимента по кристаллизации.

#### Кристаллизация.

Дифрагирующие кристаллы комплекса ECD cKIT/Fab NEG085 получали непосредственно из Protein Complex Suite F5 (0,1 M NaCl, 0,1M Трис, pH 8,0, 8% PEG 20k; Qiagen) при 4°C и после незначительной оптимизации своими силами получали кристаллы, дифрагирующие до 5 Å. Кристаллы, используемые для сбора данных, выращивали при 4°C, уравновешивая равные объемы белка (20 мг/мл) и резервуарного раствора (0,1M NaCl, 0,1M Трис, pH 8,0, 10% PEG 20k) способом диффузии паров в сидячей капле. Перед сбором данных кристаллы подвергали криопротекции в резервуарном растворе, содержащем 30% глицерин, и мгновенно охлаждали в жидким азоте.

#### Сбор данных.

Данные собирали с помощью отдельного кристалла, до 100K с использованием детектора ADSC QUANTUM 315 detector (ADSC, Poway CA) и синхротронного излучения ( $\lambda=1,0000 \text{ \AA}$ ) с каналом пучка 5.0.2 Advanced Light Source. Кристаллы ECD cKIT/Fab NEG085 дифрагировали до разрешения 3,1 Å и принадлежали к группе симметрии C2 с параметрами базисной клетки  $a=213,76 \text{ \AA}$ ,  $b=117,48 \text{ \AA}$ ,  $c=171,92 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=118,47^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$ . Кристалл содержит четыре копии комплекса ECD cKIT/Fab NEG085 в асимметричной клетке с вычисленным содержанием растворителя of 66%. Данные обрабатывали с использованием autoPROC (Global Phasing Ltd, Cambridge UK).

#### Определение и уточнение структуры.

Структуру комплекса ECD cKIT/Fab NEG085 разрешали при разрешении 3,1 Å посредством молекулярного замещения с помощью PHASER (McCoy et al., J. Appl. Crystallogr. 2007; 40(4): 658-74) с использованием опубликованной кристаллической структуры ECD cKIT (номер PDB ID: 2EC8) (Yuzawa et al., Cell 2007; 130 (2):323-34) и Fab против  $\alpha 1\beta 1$  интегрина I (номер PDB ID: 1MHP) (Karplusas et al., J. Mol. Biol. 2003; 327 (5):1031-41) в качестве исходных моделей. Петли CDR Fab-фрагмента NEG085 реконструировали вручную в COOT (Emsley and Cowtan, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2004; 60 (12): 2126-32) с использованием составной карты исключения имитации отжига, реализуемой в Phenix (Adams et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2010; 66(2): 213-21). Последующие раунды построения и уточнения с помощью программы Phenix.refine осуществляли до конвергенции.

#### Результаты. Структуры D1-D2 cKIT человека в комплексе с Fab-фрагментом NEG085.

Совместная структура D1-D3 cKIT/Fab NEG085 демонстрирует, что NEG085 распознает и связывается с внеклеточным мембранным дистальным доменом cKIT посредством специфического взаимодействия с большим количеством остатков, содержащихся в доменах 1, 2 и линкерными остатками между ними. Таким образом, эпитоп cKIT, распознаваемый NEG085, можно определять как:

остатки домена 1 cKIT: R49, V50;

остатки домена 2 cKIT: Q152, G153, H185 и петля Q190-E198;

линкер между доменом 1 и 2: D113-L117.

NEG085 связывается с D1-D2 cKIT с использованием всех CDR (H1-H3 и L1-L3) (фиг. 53). Фиг. 53 является представлением 3,1-Å кристаллической структуры комплекса D1-D2 cKit/Fab NEG085, на котором показаны тяжелые цепи Fab (показаны темно-серым), легкие цепи Fab (показаны белым) и домены D1-D2 cKit (показаны светло-серым). Эпитопы и паратопы показаны черным. Поверхность NEG085/cKIT погружает всего  $\sim 1890 \text{ \AA}^2$  доступной для растворителя области поверхности (1211  $\text{\AA}^2$  и 679  $\text{\AA}^2$  из Н-цепи и L-цепи, соответственно). Эпитоп центрирован в области линкера D1-D2 cKIT D113-L117 (SEQ ID NO: 163) и петли Q190-E198 (SEQ ID NO: 164), эти остатки выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием в табл. 2, SEQ ID NO: 155. Необходимо отметить, что эти эпитопы являются прерывистыми в первичной последовательности, но расположены очень близко друг к другу в кристаллической структуре. Эти эпитопные взаимодействия дополнены периферическими взаимодействиями с R49, V50, Q152, G153 и H185 (фиг. 53). Межмолекулярные взаимодействия между D1-D2 cKIT и Fab NEG085 исследовали с использованием PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel and Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372(3):774-97). Эти данные представлены в табл. 17.

Наложение cKIT в комплексе димерного cKIT/передачи сигнала SCF (Yuzawa et al. Cell 2007; 130 (2):323-34) и комплекса CKIT/NEG085 демонстрирует, что NEG085 и SCF, вероятно, не конкурируют друг с другом за связывание с cKIT. NEG085 связывается с эпитопом, отличающимся от связывающих эпитопов, ответственных за связывание с SCF. Таким образом, связывание NEG085 с cKIT не будет напрямую конкурировать с ассоциацией с SCF.

Таблица 17

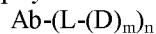
L-цепь NEG085		Kit D1-D2		Расстояние (Å)
<b>Водородные связи и солевые мостики</b>				
Ser31	OG	Arg49	NH2	3,6
Tyr32	OH	Gln190	NE2	2,5
Arg53	NH2	Asp113	OD1	3,2
Gly91	O	Lys193	NZ	2,9
Arg92	NH1	Glu191	OE2	3,0
Arg92	NH1	Glu191	OE1	3,1
Arg92	O	Lys193	NZ	3,1
Leu94	N	Lys193	NZ	3,5
Trp95		Lys193		Cation-pi
<b>ван-дер-ваальсовы взаимодействия</b>				
Tyr50		Pro114		
Tyr53		Val150, Pro114		
Arg93		Lys193		
H-цепь NEG085		Kit D1-D2		Расстояние (Å)
<b>Водородные связи и солевые мостики</b>				
Tyr33	OH	Ser194	N	3,1
Tyr33	OH	Ser194	O	2,4
Asn52	ND2	Ser194	OG	3,2
Tyr59	OH	Gly192	O	3,2
Tyr59	OH	Ser194	N	3,1
Tyr101	OH	Glu198	OE2	2,6
Gly103	O	Leu117	N	3,4
Gly103	N	Leu196	O	3,0
Thr105	N	Pro114	O	2,9
Trp107	NE1	Gln190	OE1	3,1
Trp107	NE1	Lys193		Cation-pi
<b>ван-дер-ваальсовы взаимодействия</b>				
Tyr53		Leu196		
Pro54		Gln152, Gly153		
Ser57		Ser194		
Tyr59		Lys193		
Tyr102		His185, Leu196, Ser197, Lys199		
Thr104		Pro114		
Thr105		Pro114, Gln190		
Tyr106		Pro114, Ala115		
Trp107		Ser194, Val195		

Остатки VH и VL Fab NEG085 нумеруют в зависимости от линейной аминокислотной последовательности. Остатки cKIT нумеруют на основе регистрационного номера NM\_000222. Межмолекулярные взаимодействия исследовали с использованием PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel and Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372 (3):774-97).

Следует понимать, что примеры и аспекты, представленные в настоящем описании, предназначены исключительно для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения с их учетом будут очевидны специалистам в этой области и предназначены для включения в сущность и область настоящей заявки и объем формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственный коньюгат антитела формулы



или его фармацевтически приемлемая соль;

где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14, и

специфически связывающимся с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155);

L является линкером;

D является остатком лекарственного средства;

m является целым числом от 1 до 8 и

n является целым числом от 1 до 10.

2. Лекарственный коньюгат антитела по п.1, где указанное n является 3 или 4.

3. Лекарственный коньюгат антитела по п.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в VFVRDPAKLFL (область 1, 109-119 (SEQ ID NO: 161)) и HCSVDQEGKSVLSE (область 2, 185-198 (SEQ ID NO: 162)).

4. Лекарственный коньюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека или одноцепочечным антителом (scFv).

5. Лекарственный коньюгат антитела по любому из пп.1-4, где указанный линкер (L) выбран из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, заряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.

6. Лекарственный коньюгат антитела по п.5, где линкер получают из перекрестносшишающего реагента, выбранного из группы, состоящей из N-сукцинимидил-3-(2-пиридинилдитио)пропионата (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)пентаноата (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)бутаноата (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридинилдитио)-2-сульфобутаноата (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилодоацетата (SIA), N-сукцинимидил(4-йodoацетил)аминобензоата (SIAB), маленинимид PEG NHS, N-сукцинимидил 4-(маленинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(маленинимидометил)циклогексанкарбоксилата (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оата (CX1-1).

7. Лекарственный коньюгат антитела по п.6, где указанный линкер получают из перекрестносшишающего реагента N-сукцинимидил-4-(маленинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC).

8. Лекарственный коньюгат антитела по любому из пп.1-7, где указанный остаток лекарственного средства (D) выбран из группы, состоящей из ингибитора V-ATФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауринстатаина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов

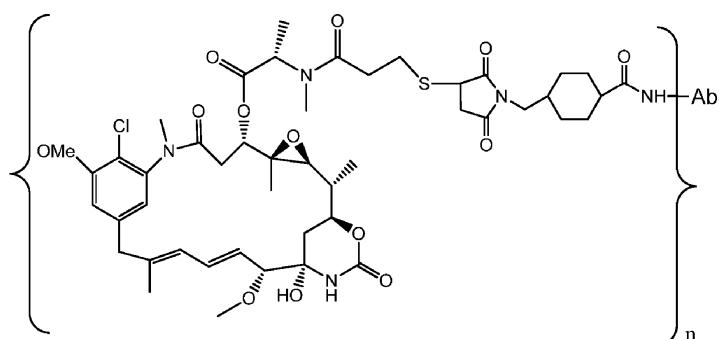
протеасом, ингибиторов реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

9. Лекарственный конъюгат антитела по п.8, где остаток лекарственного средства является майтанзином.

10. Лекарственный конъюгат антитела по п.9, где майтанзином является N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзином (DM1) или N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанзином (DM4).

11. Комбинация лекарственного конъюгата антитела по любому из пп.1-10 с терапевтическим средством, указанным в табл. 16.

12. Лекарственный конъюгат формулы



или его фармацевтически приемлемая соль;

где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14, и специфически связывается с cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155), где конъюгат включает n первичных аминов; и где n является целым числом от 1 до 10.

13. Лекарственный конъюгат антитела по п.12, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в VFVRDPAKLFL (область 1, 109-119 (SEQ ID NO: 161)) и HCSVDQEGKSVLSE (область 2, 185-198 (SEQ ID NO: 162)).

14. Лекарственный конъюгат антитела по п.12, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека или одноцепочечным антителом (scFv).

15. Лекарственный конъюгат антитела по п.12, где указанное n является целым числом от 2 до 8.

16. Лекарственный конъюгат антитела по п.12, где указанное n является целым числом от 3 до 4.

17. Комбинация лекарственного конъюгата антитела по любому из пп.12-16 с терапевтическим

средством, указанным в табл. 16.

18. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования, содержащая лекарственный конъюгат антитела по любому из пп.1-10, 12-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

Активность ADC против c-Kit на панели клеточных линий

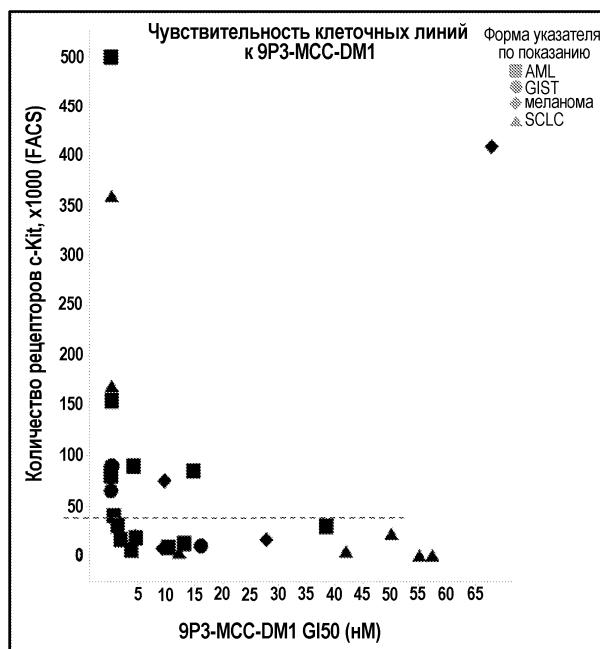
ADC	GIST T-1		GIST882		GIST430		NCI-H526		NCI-H1048		Kasumi-6		Kasumi-1		MDA-MB-453 (c-Kit-отрицат.)	
	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %												
IgG-MCC-DM1	13.622	82	>68	27	33.121	53	35.738	99	12.141	98	19.200	78	8.300	99	11.383	95
NEG024-MCC-DM1	0.021	72	0.721	66	0.038	53	0.074	99	0.737	98	5.262	78	8.493	99	22.772	92
NEG085-MCC-DM1	0.009	76	0.471	71	0.036	59	0.026	99	0.547	98	0.637	80	4.824	99	46.827	90
NEG086-MCC-DM1	0.013	74	0.430	69	0.056	54			0.828	98	0.522	80	4.223	99	16.922	91
NEG087-MCC-DM1	0.008	78	0.411	70	0.046	57			1.503	98	3.242	80	6.073	99	45.431	90
20376-MCC-DM1	0.051	69	1.000	69	0.038	54	0.074	99	1.340	97	1.505	79	1.329	100	2.690	95

Фиг. 1

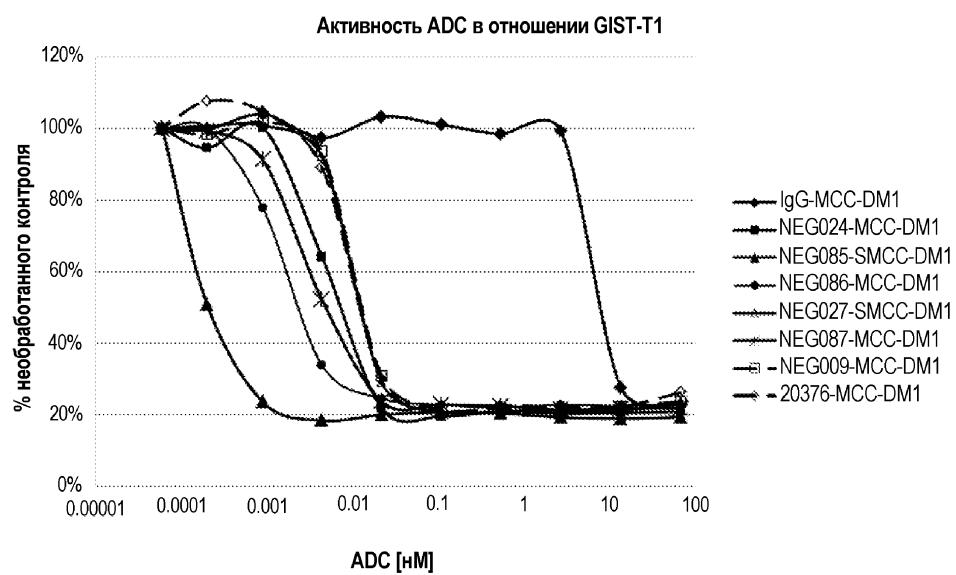
Сравнение различных линкеров/токсинов на множестве клеточных линий

Клеточная линия	Показание	9P3-MCC-DM1 G150 (нМ)	9P3-MCC-DM1 Amax (%)	9P3-SPDB-DM4 G150 (нМ)	9P3-SPDB-DM4 Amax (%)	9P3-CX1-1-DM1 G150 (нМ)	9P3-CX1-1-DM1 Amax (%)	Статус cKit
CMK11-5	AML	0.05	91	0.07	92	не определено	не определено	WT
HeI92.1.7	AML	0.61	95	1.26	94	7.6	95	WT
Kasumi-1	AML	4	100	0.83	100	0.02	100	N822K/ WT
Kasumi-6	AML	1.29	92	0.91	94	не определено	не определено	WT
M-07e	AML	0.08	100	0.11	99	не определено	не определено	WT
OCI-M1	AML	0.11	99	0.13	100	не определено	не определено	WT
SKN01	AML	3.6	99	1.6	99	5.2	100	N822KN/ 822K
UKE-1	AML	1.8	99	5.6	100	не определено	не определено	WT
GIST T1	GIST	0.02	75	0.045	75	не определено	не определено	Ex11del
GIST430	GIST	0.08	60	0.17	65	0.04	55	Ex11del, Ex13
NCI-H526	SCLC	0.05	98	0.17	98	не определено	не определено	WT
NCI-H889	SCLC	0.15	86	1.47	84	не определено	не определено	Amp
NCI-H1048	SCLC	4.3	99	2.77	100	1.45	100	WT
NCI-H1930	SCLC	0.09	87	0.3	88	не определено	не определено	Amp

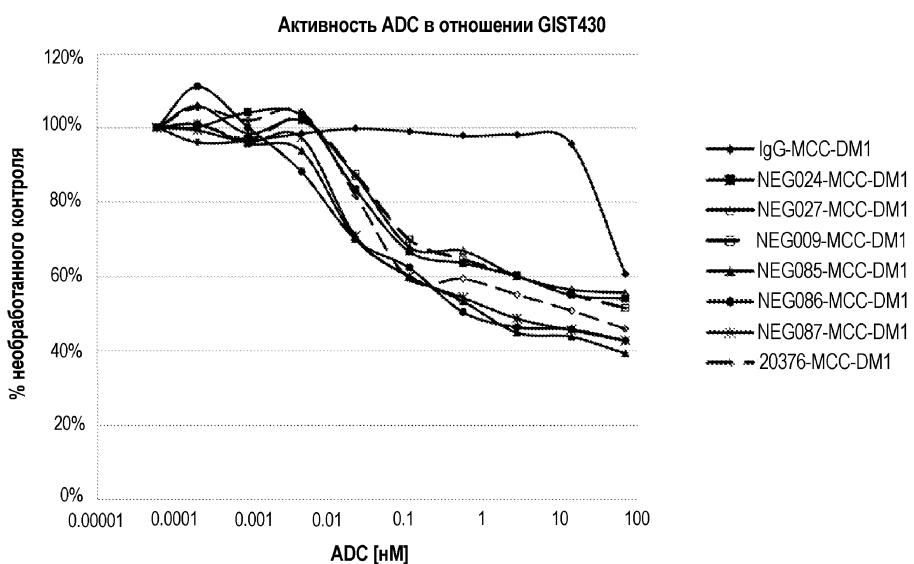
Фиг. 2

Чувствительность к ADC против c-Kit по показаниям

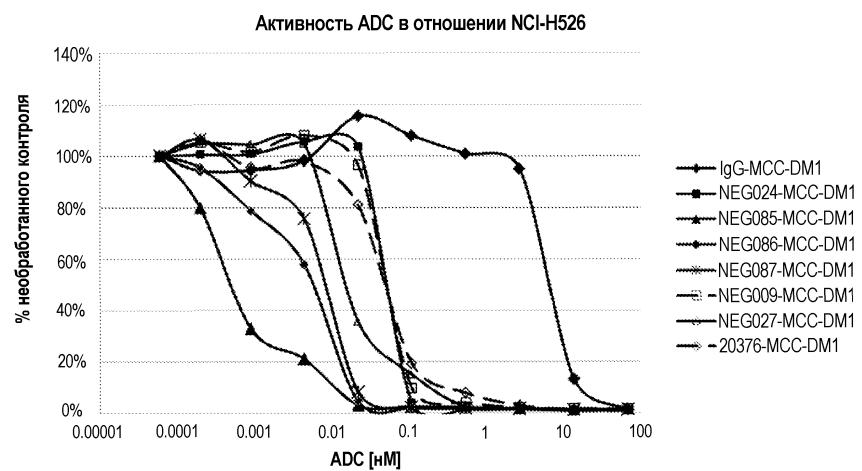
Фиг. 3

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток GIST T1

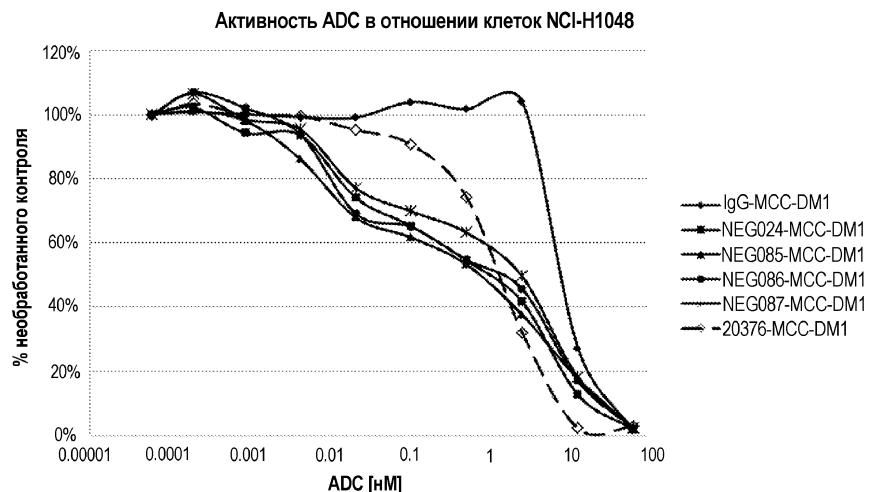
Фиг. 4

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток GIST 430

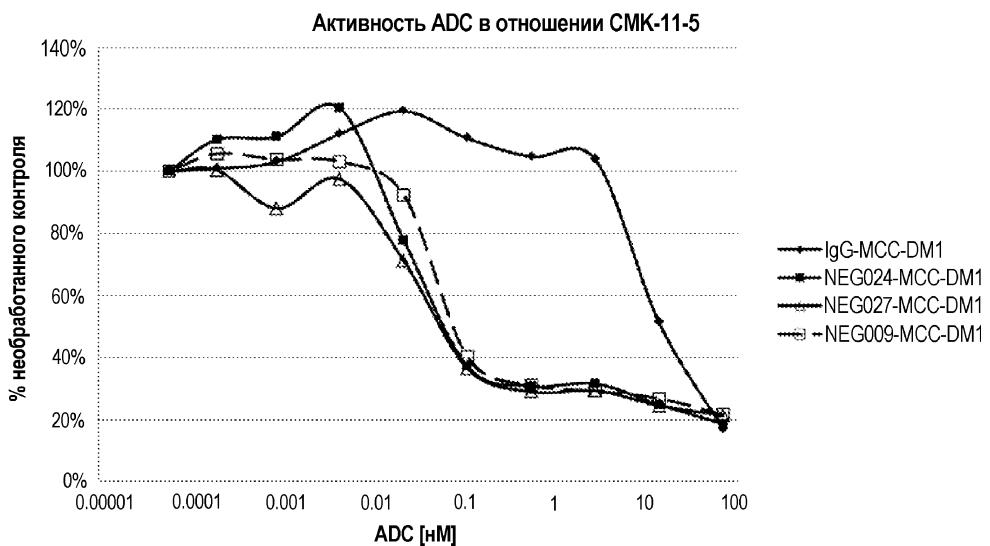
Фиг. 5

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток NCI-H526 (мелкоклеточного рака легких (SCLC))

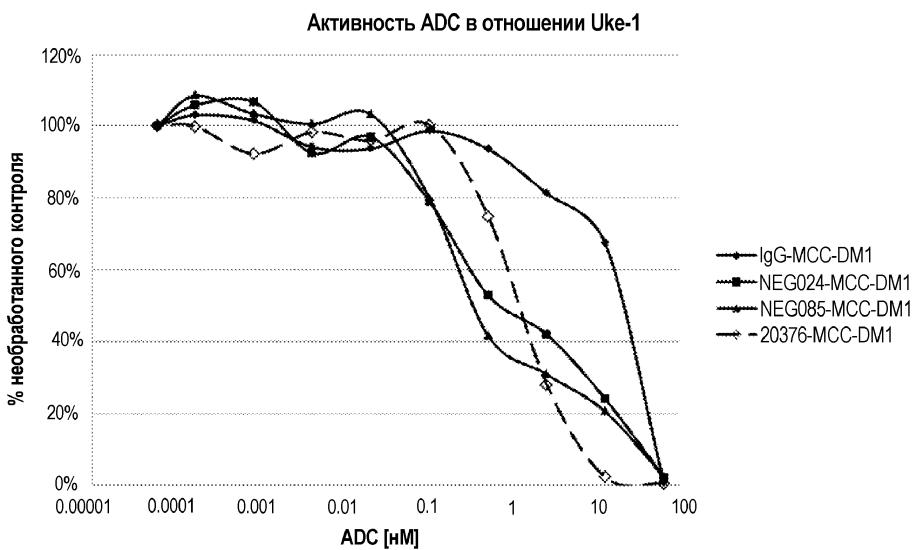
Фиг. 6

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток NCI-H1048

Фиг. 7

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток CMK-11-5

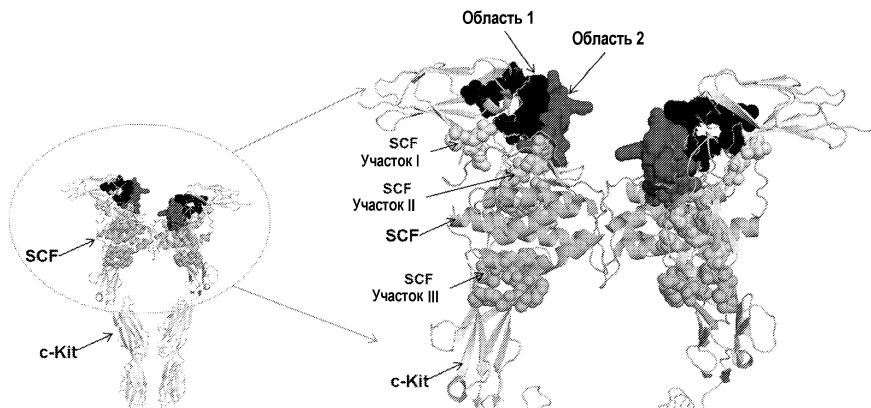
Фиг. 8

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток Uke-1

Фиг. 9

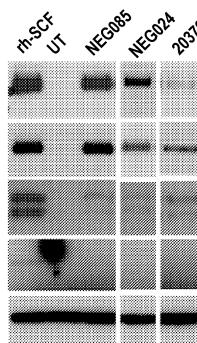
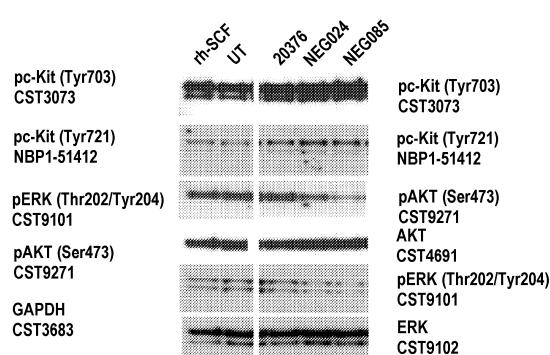
Картирование связывания антитела против c-Kit с рецептором c-kit

Фиг. 10

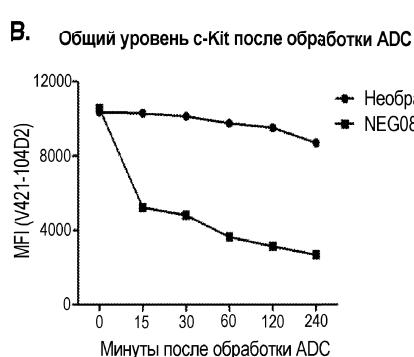
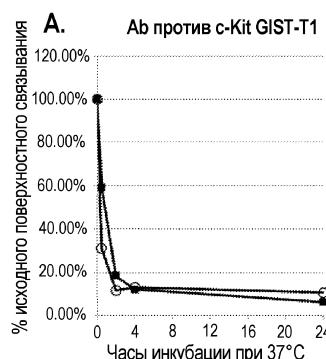
Картирование областей взаимодействия ADC против c-Kit

Фиг. 11

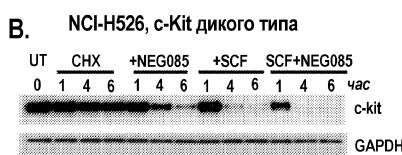
ADC против c-Kit могут опосредовать фосфорилирование c-Kit, но не нижележащих путей, в клетках, экспрессирующих c-Kit дикого типа. ADC против c-Kit не влияют на передачу сигнала в клетках, экспрессирующих мутантный c-Kit.

**A. Mo7e, c-Kit дикого типа****B. GIST T1, мутантный c-Kit**

Фиг. 12

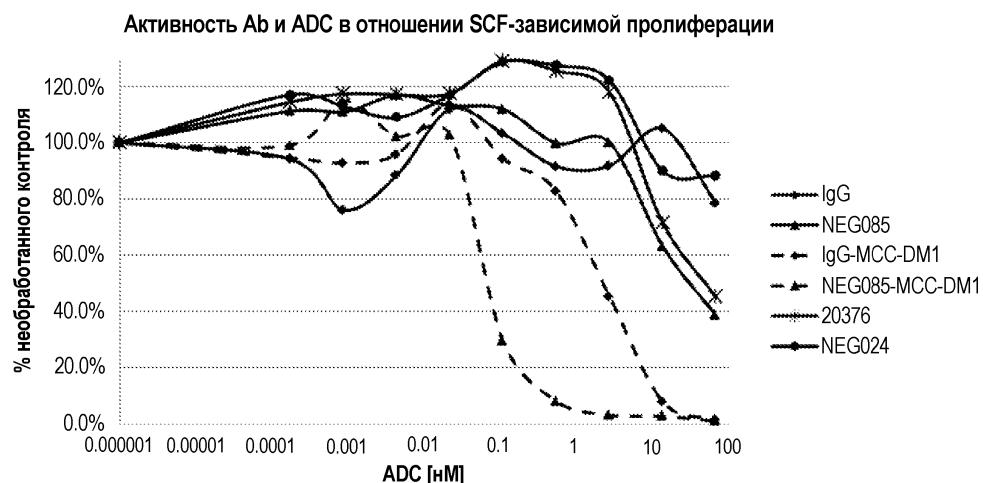
NEG085 и 20376 опосредуют быструю internalизацию c-Kit на клетках

Фиг. 13

NEG085-MCC-DM1 повышает деградацию c-Kit

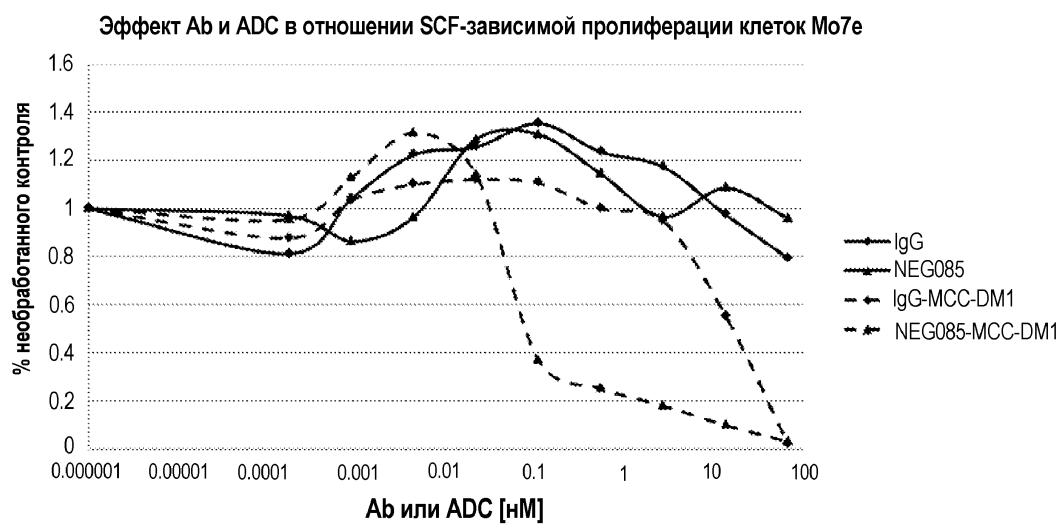
Фиг. 14

Активность NEG085, NEG024, 20376 в анализа пролиферации в SCF-зависимой клеточной линии Mo7e



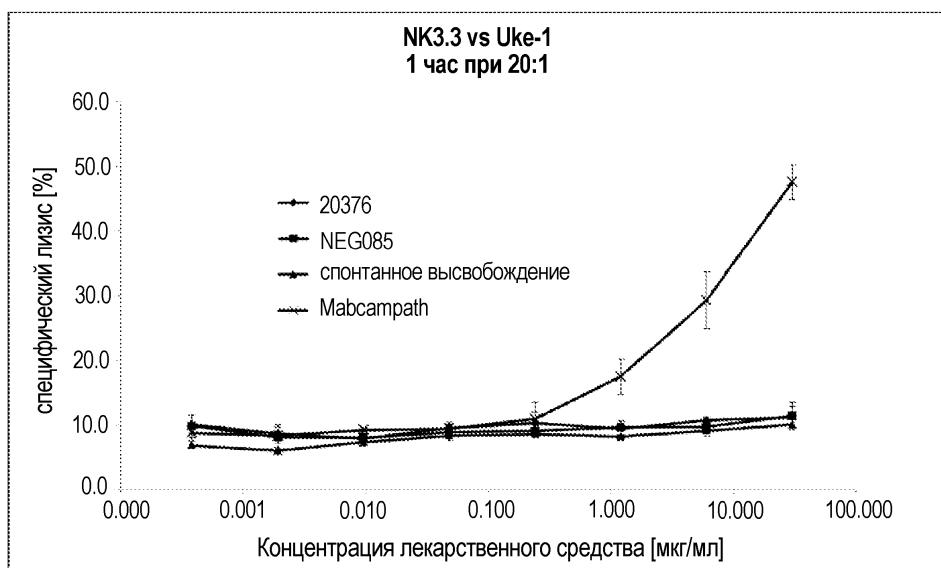
Фиг. 15

Активность NEG085 в анализа пролиферации в клеточной линии Mo7e, обработанной ГМ-КСФ



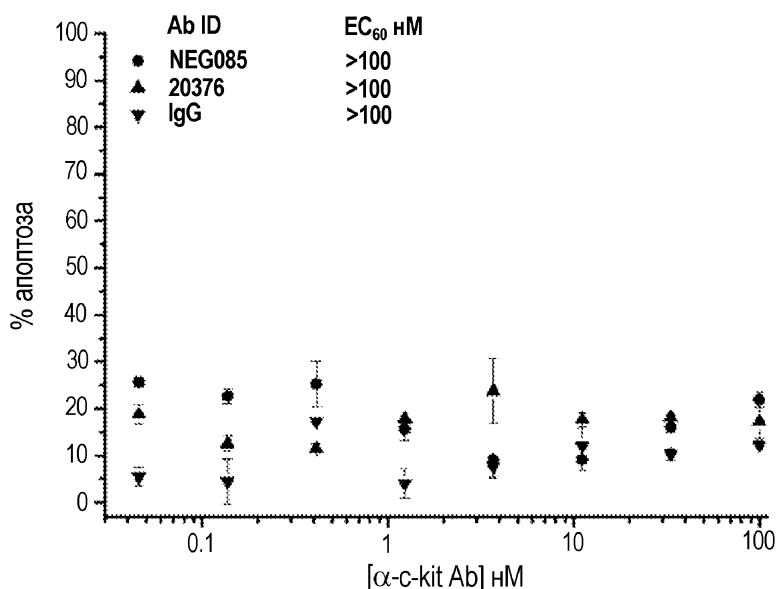
Фиг. 16

NEG085 и 20376 не опосредуют ADCC in vitro



Фиг. 17

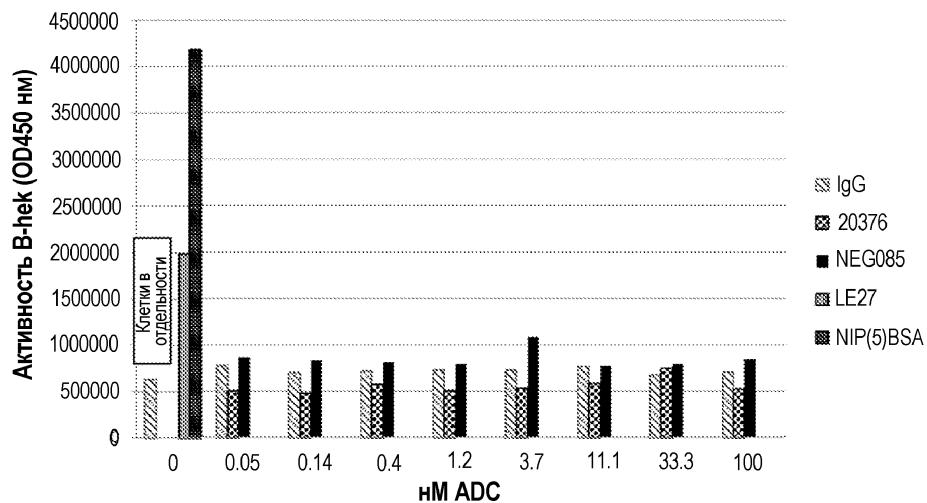
Антитела против c-Kit не приводят к апоптозу первичных тучных клеток человека



Фиг. 18

NEG085 и 20376 не опосредуют дегрануляцию тучных клеток в первичных тучных клетках человека ex vivo

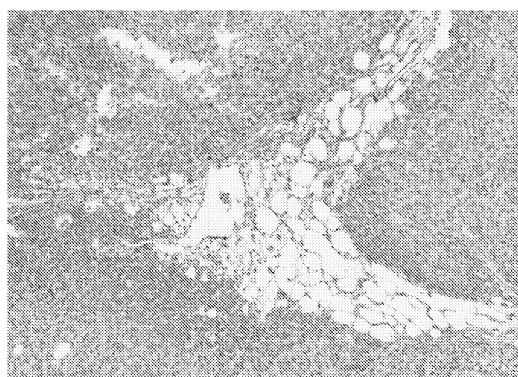
**Дегрануляция тучных клеток [активность  $\beta$ -гексозамиnidазы]**



Фиг. 19

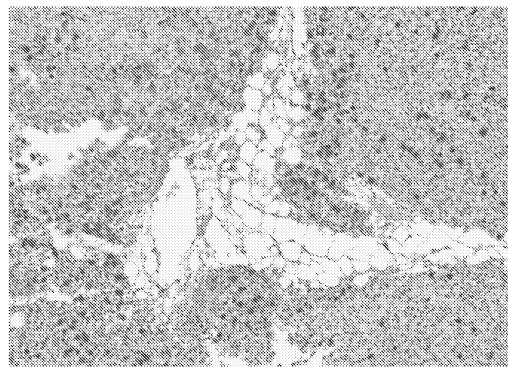
Ко-локализация IgG1 и митотического блока NEG027-MCC-DM1  
в модели ксенотрансплантата GIST T1

IgG человека

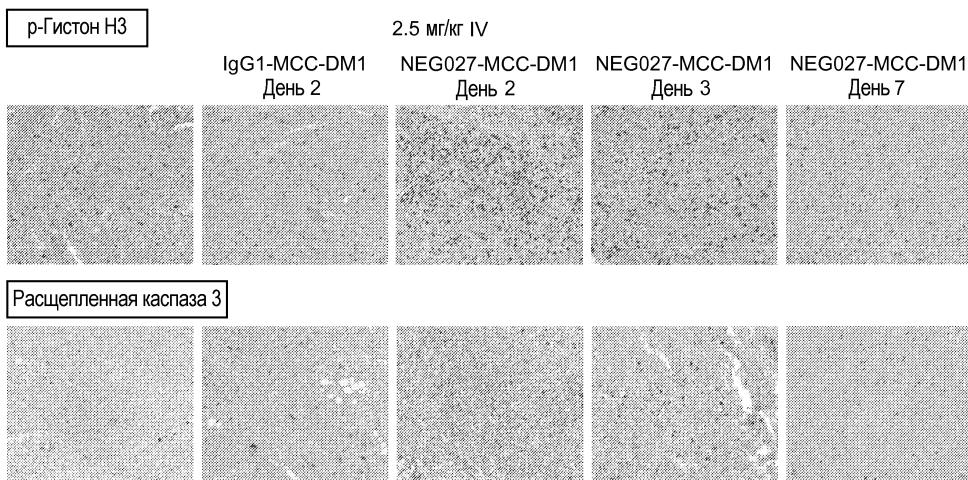


Фиг. 20А

p-Гистон H3



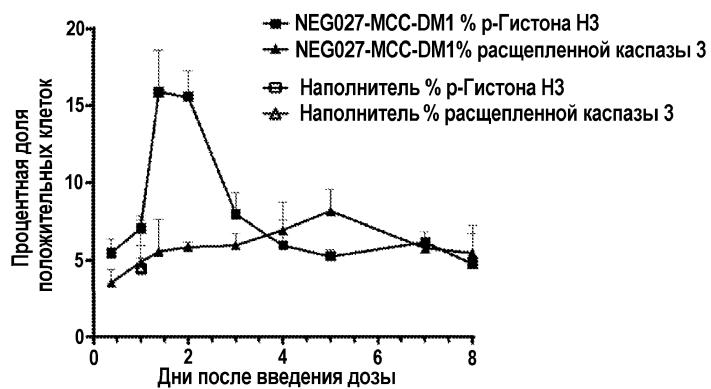
Фиг. 20В

Митотический блок (р-гистон H3) и апоптоз (каспаза 3) после однократной дозы ADC против с-Kit

Фиг. 21

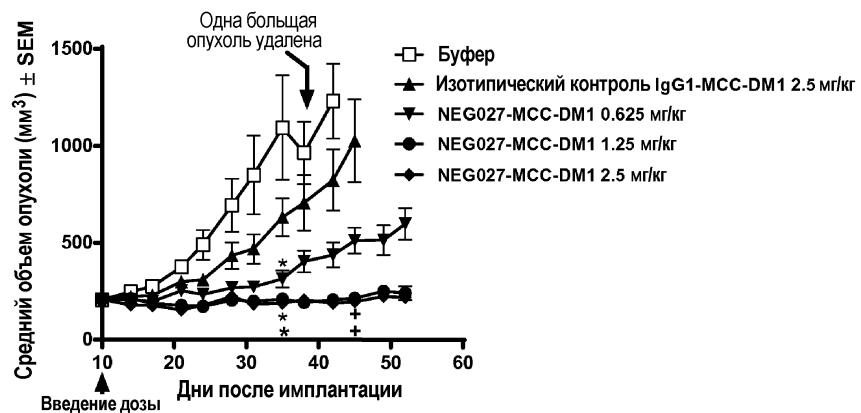
Индукция митотического блока и апоптоза через 8 дней  
после введения однократной дозы ADC против с-Kit

Однократная I.V. доза 2,5 мг/кг NEG027-MCC-DM1

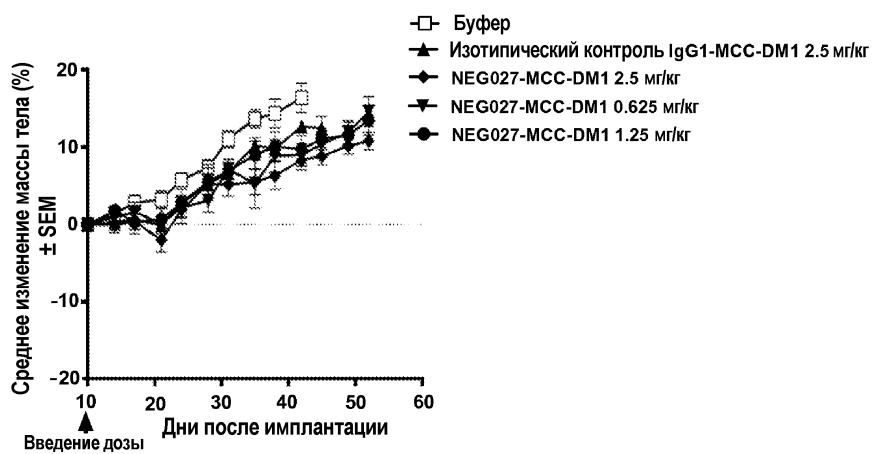


Фиг. 22

## (A) Эффективность доза-ответ в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

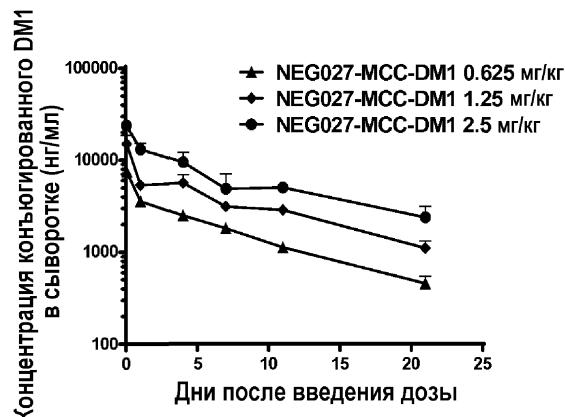


## (B) Изменение массы тела в течение лечения

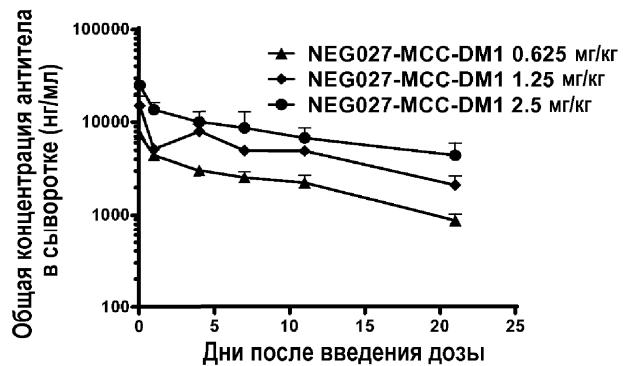


Фиг. 23

(A) ELISA с антителом против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1



(B) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1



Фиг. 24

Ответ на дозу NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

(Верхняя таблица) Таблица данных для дня 35 ( $p<0,05$  по сравнению с наполнителем, ANOVA/тест Тьюки)  
(Нижняя таблица, таблица данных для дня 45 ( $p<0,05$  по сравнению с Grp 2 (контроль IgG-DM1), ANOVA/метод Данниа)

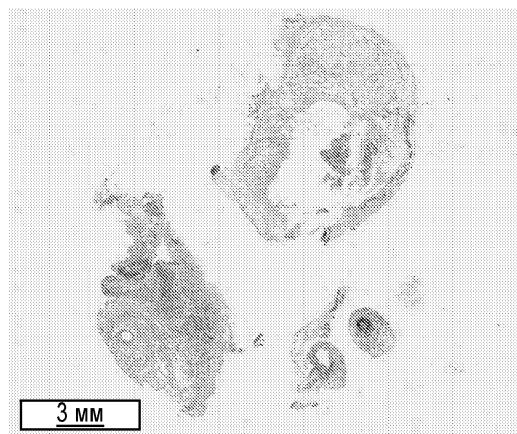
Группа	Лекарственное средство	Доза	Схема	Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
1	TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	890 $\pm$ 270	13.7 $\pm$ 1.2	9/9
2	IgG5-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	47*	-	417 $\pm$ 95	10.2 $\pm$ 1.0	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	12*	-	109 $\pm$ 39	5.3 $\pm$ 3.2	9/9
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 мг/кг	однократная i.v. доза	0*	-	4 $\pm$ 15	9.0 $\pm$ 1.8	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	-*	-8.71	-18 $\pm$ 21	5.5 $\pm$ 1.6	9/9

Группа	Лекарственное средство	Доза	Схема	Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем IgG (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
1	TBS	0 мг/кг		Снижение	Снижение	0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0.0	9/9
2	IgG5-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-	811 $\pm$ 214	12.5 $\pm$ 1.5	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	50	-	301 $\pm$ 62	10.4 $\pm$ 1.7	8/9 (одну исключали из исследования в день 38)
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 мг/кг	однократная i.v. доза	21*	-	8 $\pm$ 19	11.1 $\pm$ 1.4	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	20*	-	-14 $\pm$ 28	8.8 $\pm$ 1.1	8/9 (одну исключали из исследования в день 38)

Фиг. 25

Дозозависимая эффективность NEG027-MCC-DM1 в GIST T1

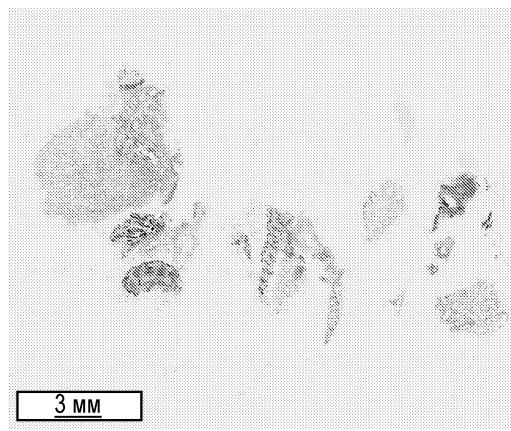
Совокупность опухолей группы 4



Фиг. 26А

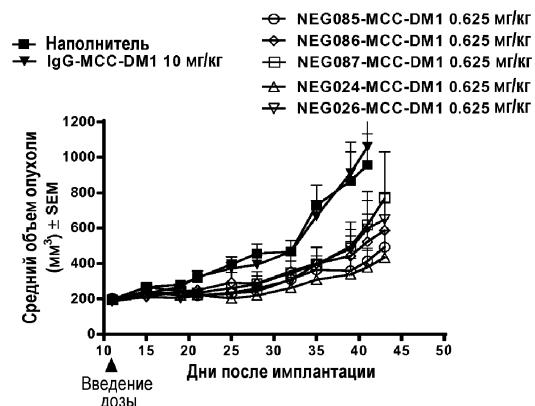
Дозозависимая эффективность NEG027-MCC-DM1 в GIST T1

Совокупность опухолей группы 5



Фиг. 26В

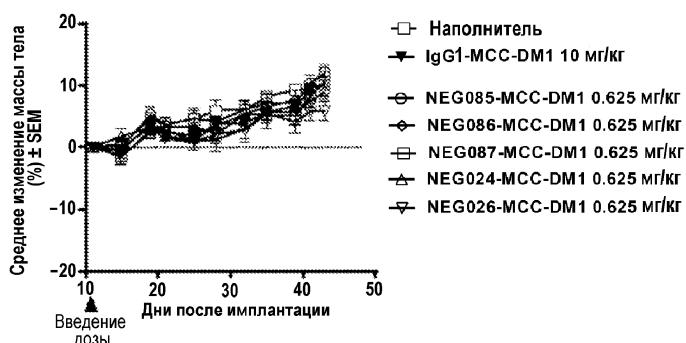
## (A) Эффективность при дозе 0,625 мг/кг в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши



## (B) Изменение объема опухоли по сравнению с контролем (% T/C)

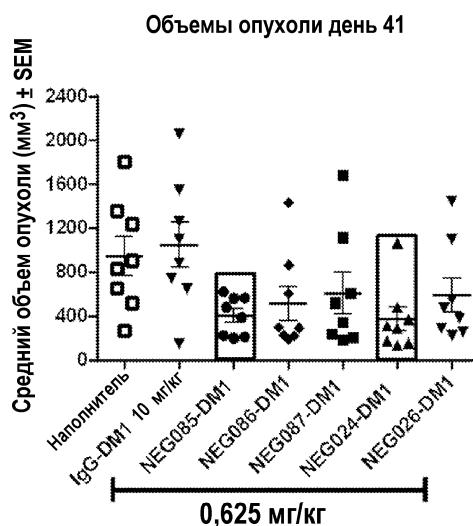
ADC	% $\Delta T / \Delta C$ (D41)
IgG1-DM1	114
NEG085-DM1	28
NEG086-DM1	43
NEG087-DM1	56
NEG024-DM1	23
NEG026-DM1	54

## (C) Изменение массы тела в течение лечения



Фиг. 27

День 41 после введения однократной дозы ADC против c-Kit  
в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши



Фиг. 28

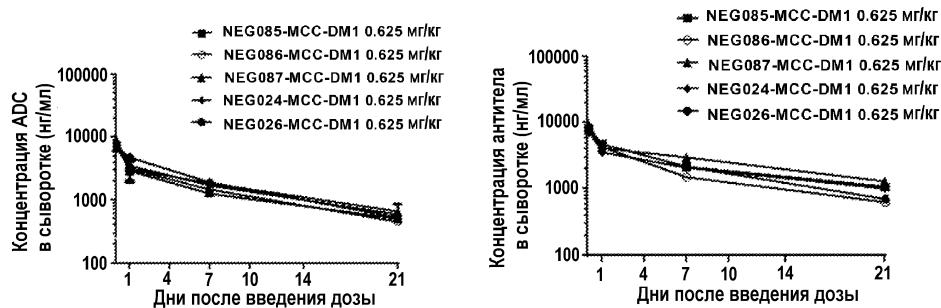
## Исследование эффективности ADC против c-Kit (низкой дозы) в модели GIST T1 у мышей SCID-beige

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	757 $\pm$ 175	9.3 $\pm$ 1.0	8/8
IgG-SMCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	114	861 $\pm$ 206	9.1 $\pm$ 1.0	8/8
NEG085-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	28	210 $\pm$ 56	10.3 $\pm$ 1.3	8/8
NEG086-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	43	325 $\pm$ 146	7.4 $\pm$ 1.4	8/8
NEG087-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	56	423 $\pm$ 188	8.4 $\pm$ 2.1	8/8
NEG024-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	23	176 $\pm$ 104	9.6 $\pm$ 2.0	8/8
NEG026-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	54	410 $\pm$ 166	5.7 $\pm$ 1.4	8/8

Фиг. 29

(A) РК антитела против c-Kit в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (левая панель представляет собой ELISA с антителом против DM1)

(B) Правая панель представляет собой ELISA с антителом против IgG1



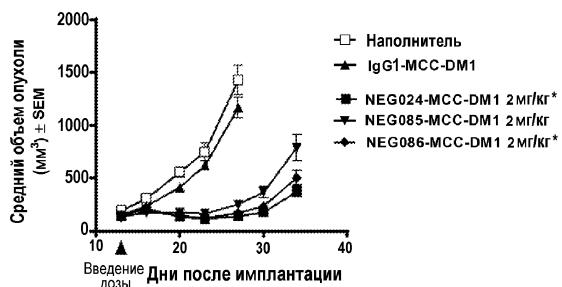
Фиг. 30

(A) Активность NEG085, NEG024 и NEG086 в модели SCLC

(B) Изменение массы тела в течение лечения

(C) Экспрессия c-Kit в образце опухоли

## Эффективность в модели SCLC NCI-H1048

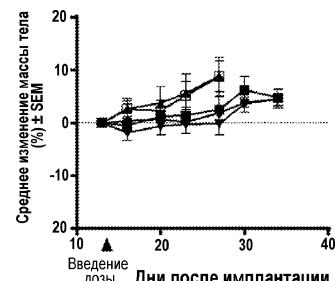


\*P&lt;0.05, ANOVA/LSD-метод Фишера

## Экспрессия c-Kit в NCI-H1048



## Масса тела



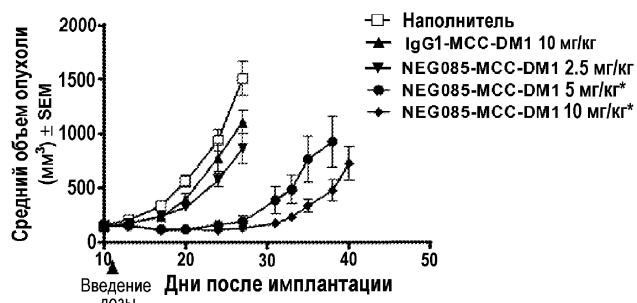
Фиг. 31

## Исследование эффективности ADC против c-Kit в SCLC NCI-H1048

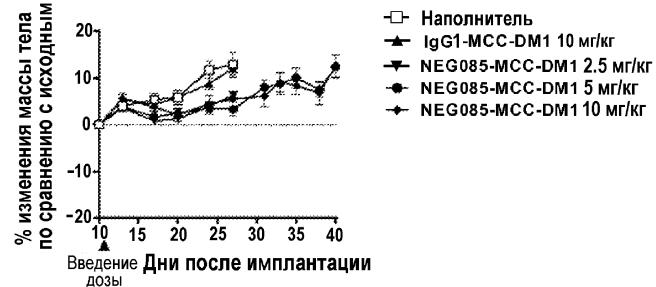
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	$1234 \pm 125$	$8.8 \pm 3.7$	8/8
IgG1-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	82	-	$1013 \pm 91$	$8.8 \pm 2.9$	8/8
NEG024-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-2.16*	$-3 \pm 18$	$2.5 \pm 2.4$	8/8
NEG085-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	9	-	$114 \pm 42$	$-0.2 \pm 2.1$	8/8
NEG086-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	4*	-	$44 \pm 22$	$1.8 \pm 0.7$	8/8

Фиг. 32

## (A) Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC)

 $*P<0.05$ , ANOVA/тест Тьюки

## (B) Изменение массы тела в течение лечения



Фиг. 33

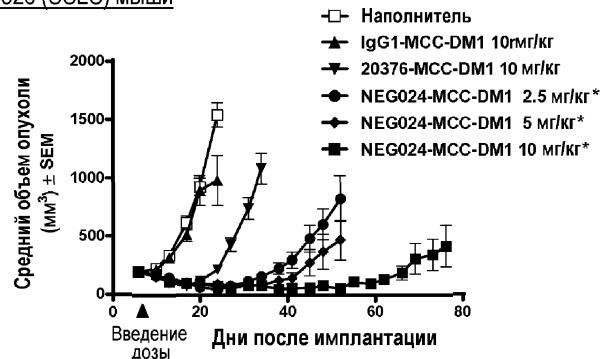
## Исследование эффективности NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC) мыши

## Таблица данных для дня 27

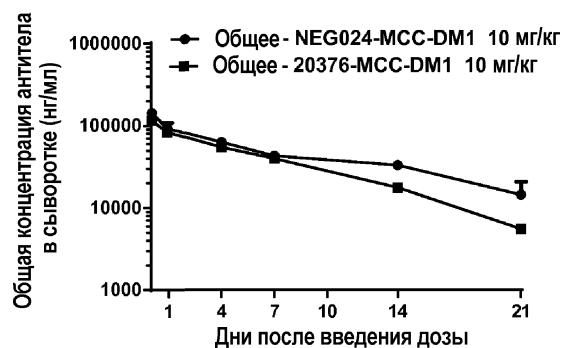
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	$1347 \pm 164$	$12.9 \pm 2.6$	8/8
IgG1-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	72	-	$963 \pm 113$	$12.0 \pm 1.3$	8/8
NEG085-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	53	-	$716 \pm 141$	$6.3 \pm 1.7$	8/8
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	3*	-	$37 \pm 55$	$6.0 \pm 1.8$	8/8
NEG085-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-14.92*	$-23 \pm 14$	$5.5 \pm 1.7$	8/8

Фиг. 34

(A) Эффективность 20376 и NEG024 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLC) мыши

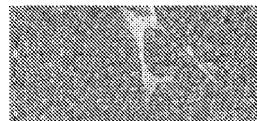


(B) Концентрация антитела в сыворотке после введения дозы



(C) ИИС для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли H526

ИИС c-Kit в опухоли H526

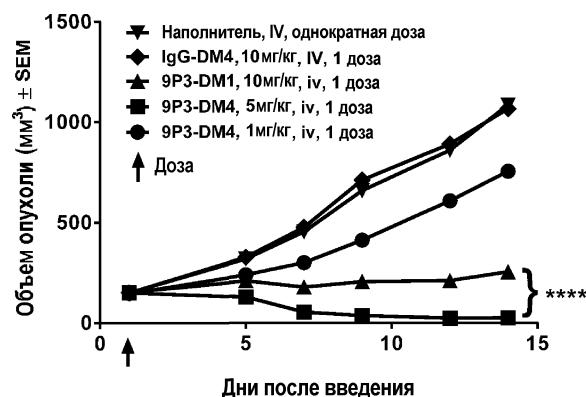


Фиг. 35

ADC против c-Kit в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких (SCLC) (\*p < 0.05, ANOVA/метод Данна)

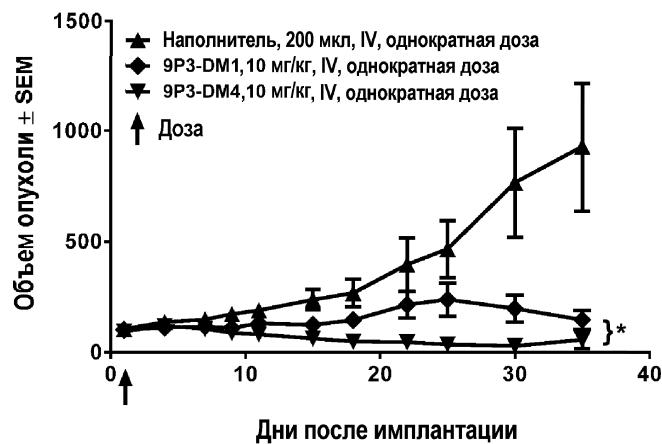
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм³ ± SEM)		
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	1338±107	13.5 ± 3.6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	57	-	766±208	6.6 ± 0.7	9/9
20376-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	1	-	18±28	4.1 ± 1.9	9/9
NEG024-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-76.14*	-148±17	3.0 ± 1.1	9/9
NEG024-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-52.94*	-106±15	3.3 ± 1.1	9/9
NEG024-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-63.04*	-123±14	-0.1 ± 2.2	9/9

Фиг. 36

Эффективность в модели ксенотрансплантата AML (Kasumi-1)

Контроль по сравнению с исследуемыми группами: Значимые различия измеряли с использованием одностороннего ANOVA, апостериорного теста множественных сравнений Тьюки, ( $^{***}p<0,0001$ )

Фиг. 37

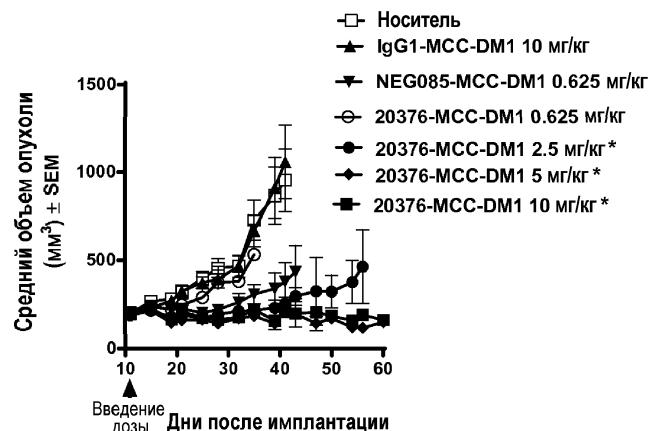
Эффективность в модели ксенотрансплантата мастоцитоза HMC-1 мыши

Контроль по сравнению с исследуемыми группами: Значимые различия измеряли с использованием одностороннего ANOVA, апостериорного теста множественных сравнений Тьюки, ( $^{*}p<0,05$ )

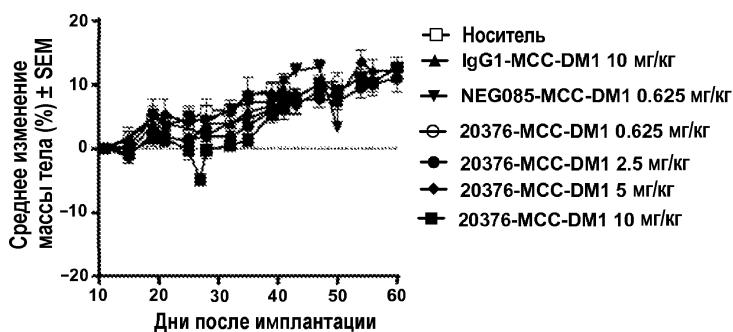
Фиг. 38

Эффективность перекрестно реагирующего 20376-MCC-DM1 мыши  
в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

A – Дозировка и объем опухоли

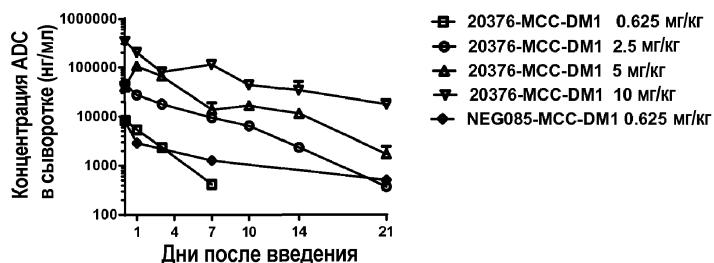


B – Изменение массы тела в течение лечения

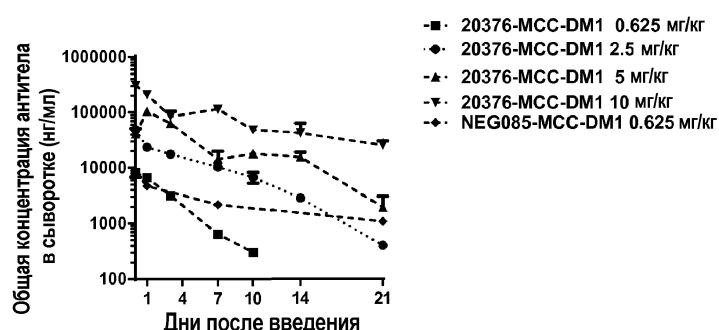


Фиг. 39

(А) Эффективность перекрестно реагирующего 20376-MCC-DM1 мыши  
в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши – РК



(Б) Концентрация антитела в сыворотке после введения



Фиг. 40

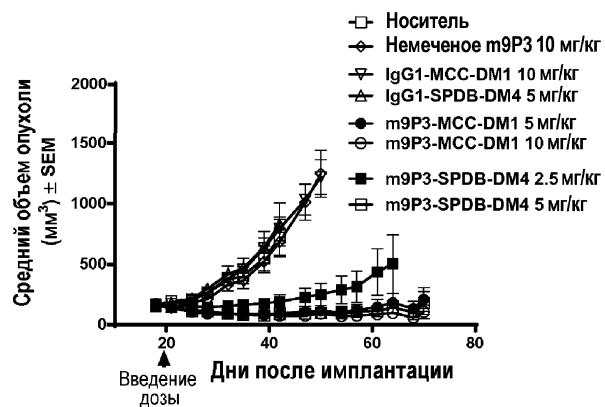
## Исследование дозозависимой эффективности в GIST T1 у мышей SCID-beige (таблица данных 41)

Таблица данных для дня 27

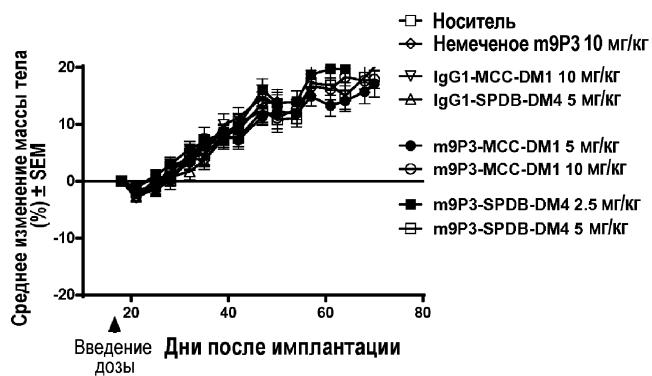
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0 мг/кг	одночротная IV доза	100	757 $\pm$ 175	9.3 $\pm$ 1.0	8/8
IgG-SMCC-DM1	10 мг/кг	одночротная IV доза	114	861 $\pm$ 206	9.1 $\pm$ 1.0	8/8
NEG085-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	одночротная IV доза	28	210 $\pm$ 56	10.3 $\pm$ 1.3	8/8
20376-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	одночротная IV доза	51	385 $\pm$ 106	8.1 $\pm$ 1.0	8/9 (одну мышь исключали из исследования)
20376-SMCC-DM1	2.5 мг/кг	одночротная IV доза	9*	66 $\pm$ 41	7.2 $\pm$ 1.6	9/9
20376-SMCC-DM1	5 мг/кг	одночротная IV доза	4*	34 $\pm$ 62	7.5 $\pm$ 1.2	9/9
20376-SMCC-DM1	10 мг/кг	одночротная IV доза	3*	22 $\pm$ 16	6.1 $\pm$ 1.5	8/9 (одну мышь исключали из исследования)

Фиг. 41

(А) Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши  
(не наблюдали эффективность при использовании неконьюгиированного антитела)



(Б) Изменение массы тела в течение лечения



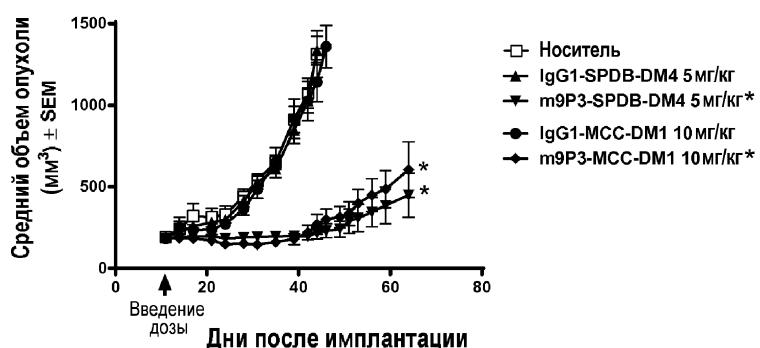
Фиг. 42

Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (немеченое/MCC-DM1/SPDB-DM4)  
 (Таблица данных для дня 42,  $p<0.05$ , ANOVA/тест Тьюки)

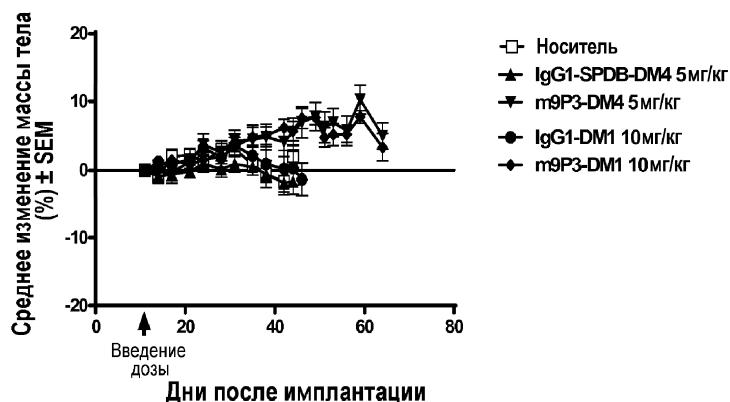
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	554 $\pm$ 148	9.5 $\pm$ 2.2	8/8
Немеченое 9P3	10 мг/кг	однократная i.v. доза	95	-	525 $\pm$ 103	9.0 $\pm$ 1.9	8/8
IgG1-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	113	-	624 $\pm$ 96	11.1 $\pm$ 1.9	9/9
IgG1-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	119	-	657 $\pm$ 176	10.0 $\pm$ 1.3	9/9
9P3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-55.80	-97 $\pm$ 23	10.2 $\pm$ 1.1	9/9
9P3-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-43.84	-74 $\pm$ 28	7.2 $\pm$ 1.1	9/9
9P3-SPDB-DM4	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-43.24	-67 $\pm$ 14	7.6 $\pm$ 2.0	9/9
9P3-SPDB-DM4	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	7	-	36 $\pm$ 58	9.6 $\pm$ 1.6	9/9

Фиг. 43

(A) Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST 430  
 при сравнении SPDB-DM4 и MCC-DM1



(B) Изменение массы тела в течение лечения

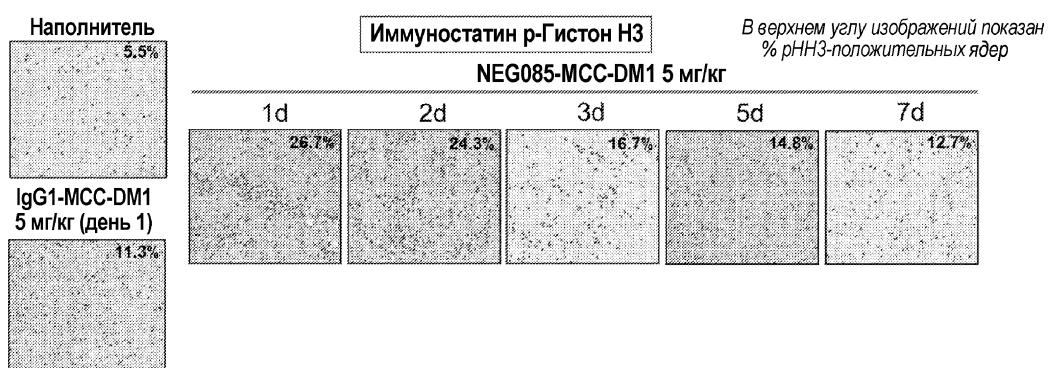


Фиг. 44

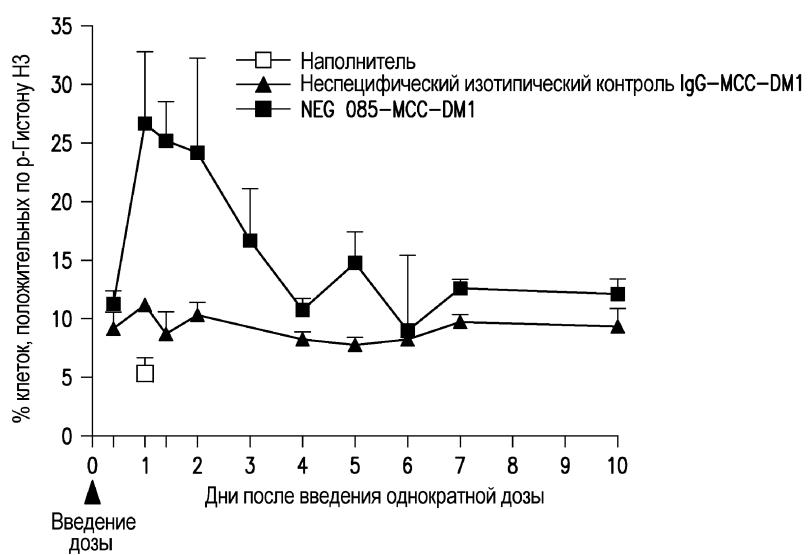
Эффективность в модели GIST430 мыши SCID-beige

Лекарственное средство	Доза (мг/кг)	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ( $\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ )	Среднее изменение массы тела (% $\pm \text{SEM}$ )	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0	однократная i.v. доза	100	-	1127 $\pm$ 161	2.1 $\pm$ 1.7	8/9 (кахексия с опухолями более крупного размера)
IgG1-SPDB-DM4	5	однократная i.v. доза	101	-	1139 $\pm$ 91	-1.6 $\pm$ 1.9	9/9
9P3-SPDB-DM4	5	однократная i.v. доза	3*	-	34 $\pm$ 38	5.6 $\pm$ 2.0	9/9
IgG1-MCC-DM1	10	однократная i.v. доза	85	-	959 $\pm$ 112	0.3 $\pm$ 2.5	9/9
9P3-MCC-DM1	10	однократная i.v. доза	7*	-(22% в день 24)	80 $\pm$ 51	5.7 $\pm$ 1.4	9/9

Фиг. 45

Митотический блок (p-Гистон H3) после однократной дозы ADC против c-Kit NEG085-MCC-DM1

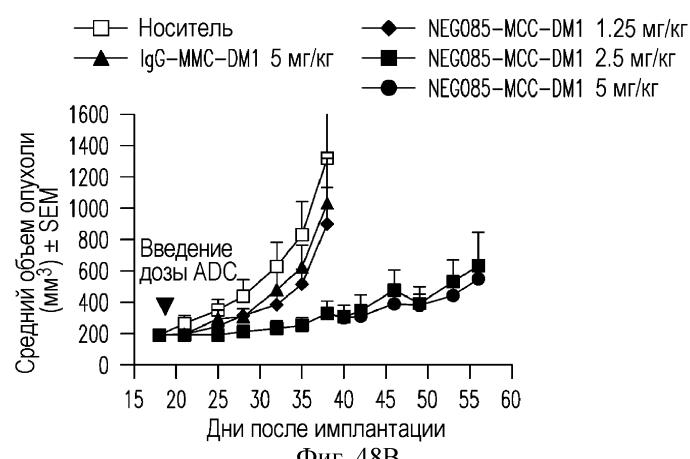
Фиг. 46

Митотический блок (p-Гистон H3) через 10 дней после однократной дозы ADC против c-Kit NEG085-MCC-DM1

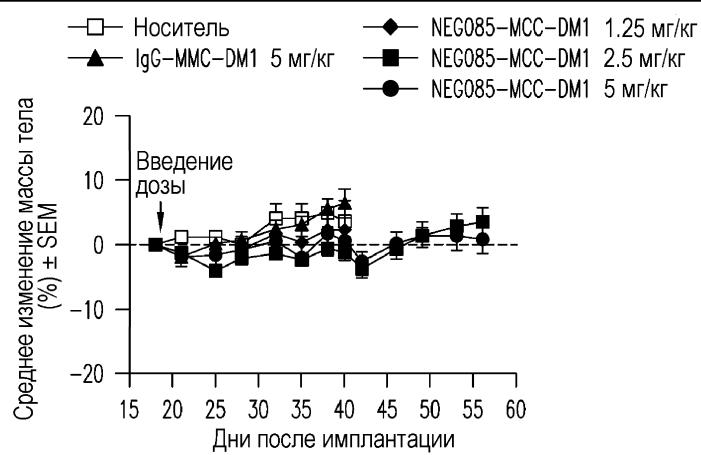
Фиг. 47

IHC для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли GIST T1

Фиг. 48А

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1

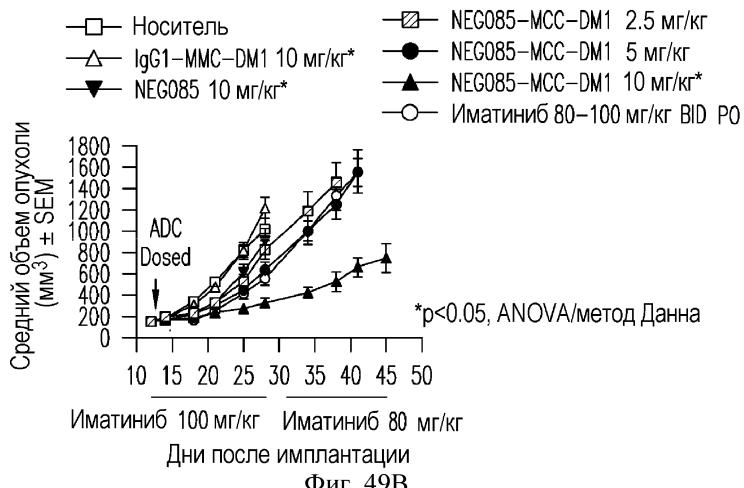
Фиг. 48В

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1

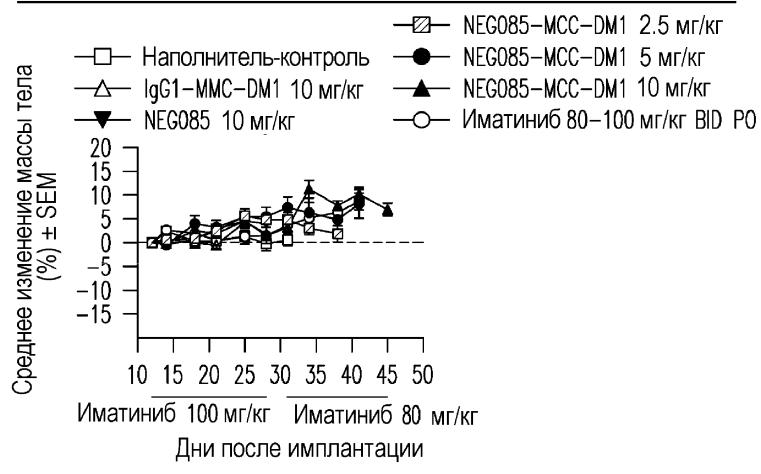
Фиг. 48С

IHC для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли GIST430

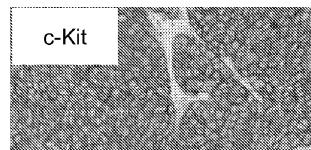
Фиг. 49А

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST430

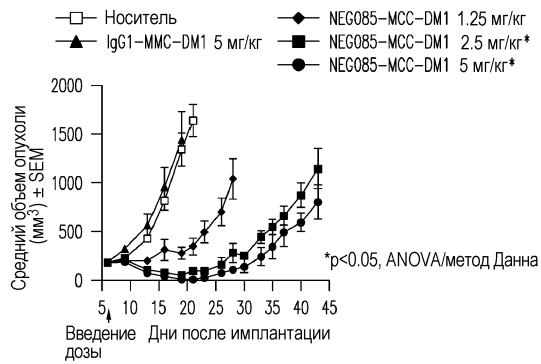
Фиг. 49В

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1

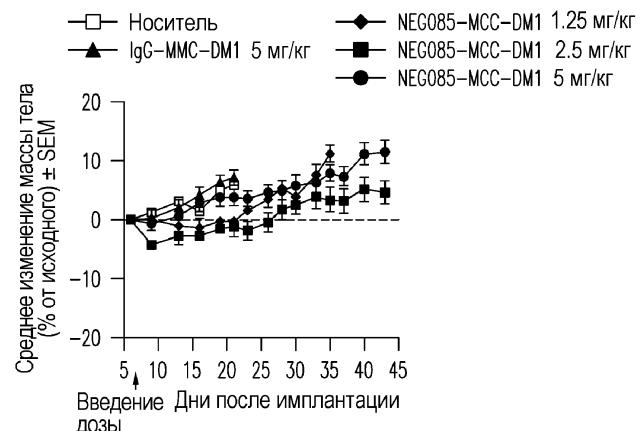
Фиг. 49С

IHC для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли NCI-H526

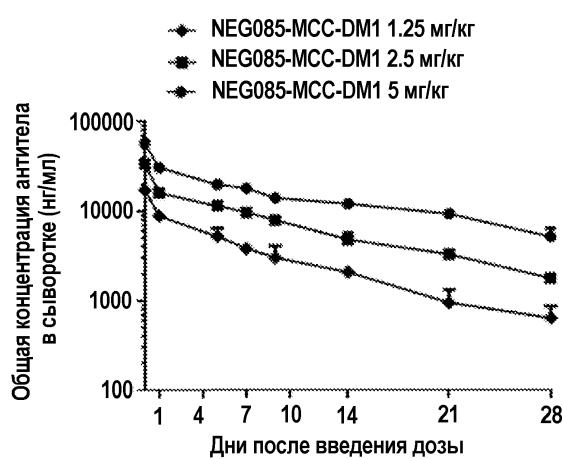
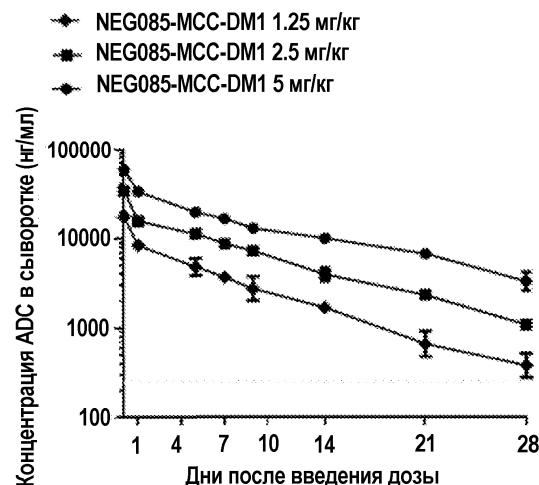
Фиг. 50А

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLS)

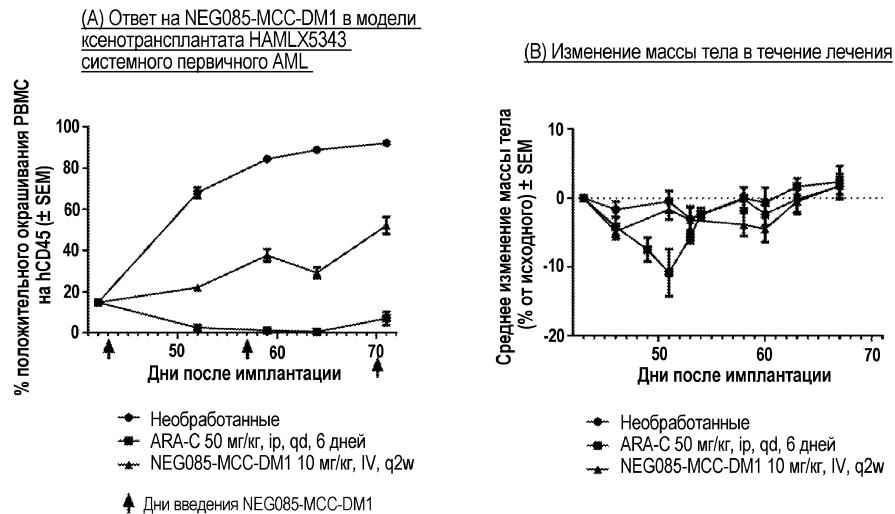
Фиг. 50В

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1

Фиг. 50С

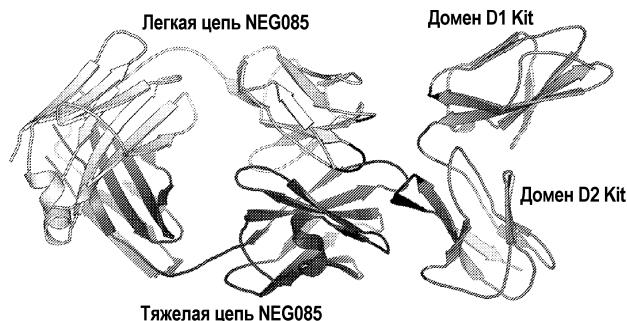
(A) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата NCI-H526(B) ELISA с антителом против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата NCI-H526

Фиг. 51



Фиг. 52

Представление 3,1- $\text{\AA}$  кристаллической структуры комплекса D1-D2 Kit/Fab NEG085, на котором показаны тяжелые цепи Fab (темно-серым), легкие цепи Fab (белым) и домены D1-D2 Kit (светло-серым). Эпипоты и паратопы закрашены черным.



Фиг. 53



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2