

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **020324**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2014.10.30

(21) Номер заявки

200970130

(22) Дата подачи заявки

2007.07.13(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C12N 15/63** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 5/20** (2006.01)**G01N 33/53** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**(54) АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ ЭФРИНА EphA2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**(31) **06291160.7**(32) **2006.07.18**(33) **EP**(43) **2009.06.30**(86) **PCT/IB2007/003074**(87) **WO 2008/010101 2008.01.24**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ-АВЕНТИС (FR)

(72) Изобретатель:

**Блан Вероник, Фромон Клодья,
Паркер Фабьенн (FR), Хань Цзявэнь,
Таварес Даниэль, Чжан Чунхой,
Ли Минь, Чжоу Сяо-Май, Стрели
Мишель (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; April 2006 (2006-04), BURKHARDT M. ET AL.: "Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer". XP002415898 Database accession no. NLM16484444 abstract

WO-A-2006047637

WO-A2-2004092343

WO-A2-2004101764

DOBRZANSKI PAWEL ET AL.:

"Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist". CANCER RESEARCH 1 FEB 2004, vol. 64, no. 3, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 910-919, XP002415896 ISSN: 0008-5472 abstract

WO-A2-2006084226

CARLES-KINCH KELLY ET AL.: "Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior". CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 62, no. 10, 15 May 2002 (2002-05-15), pages 2840-2847, XP002309753 ISSN: 0008-5472 the whole document

LANDEN C.N. ET AL.: "EPHA2 AS A

TARGET FOR OVARIAN CANCER THERAPY". EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, ASHLEY PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 9, no. 6, December 2005 (2005-12), pages 1179-1187, XP008072982 ISSN: 1472-8222 the whole document

(57) Предложены антитела, в том числе гуманизированные и поверхностно-модифицированные, и их фрагменты, а также конъюгаты вышеперечисленных соединений с цитотоксическими средствами, которые специфически связывают и ингибируют рецепторы эфрина Eph класса A, противодействуют эффектам факторов роста на размножение и выживание опухолевых клеток и которые обладают минимальной агонистической активностью или предпочтительно лишены агонистической активности. Указанные антитела и их фрагменты можно применять для лечения опухолей, которые экспрессируют повышенные уровни рецепторов Eph класса A, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, карцинома яичников, синовиальная карцинома и рак поджелудочной железы, а также для диагностики и визуализации опухолей, которые экспрессируют повышенные уровни рецепторов Eph класса A. Также предложены терапевтические композиции, содержащие указанные конъюгаты.

B1**020324****020324****B1**

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к новым мышинным анти-Eph моноклональным антителам или их фрагментам, а также их гуманизированным или поверхностно-модифицированным вариантам. Более конкретно, изобретение относится к новым моноклональным антителам или их фрагментам, а также их гуманизированным или поверхностно-модифицированным вариантам, которые взаимодействуют с семейством рецепторов EphA и действуют как антагонисты. Более конкретно, изобретение относится к антителам против рецептора EphA2, которые ингибируют клеточные функции рецептора EphA2. Еще более конкретно, изобретение относится к антителам против рецептора EphA2, которые препятствуют росту и выживанию опухолевых клеток и которые лишены агонистической активности.

Кроме того, настоящее изобретение относится к цитотоксическим конъюгатам, содержащим связывающее клетки средство и цитотоксическое средство, терапевтическим композициям, содержащим конъюгат, способам применения конъюгатов для ингибирования клеточного роста и лечения заболевания, а также к набору, включающему цитотоксический конъюгат. В частности, связывающее клетки средство представляет собой моноклональное антитело или его эпителиосвязывающий фрагмент, а также его гуманизированный или поверхностно-модифицированный вариант, который распознает и связывает семейство рецепторов EphA.

Уровень техники изобретения

Рецепторные тирозинкиназы играют многообразную роль в клеточном росте и дифференциации при нормальных физиологических ответах, а также при онкогенной трансформации и развитии опухоли. Рецепторы Eph представляют собой уникальное семейство рецепторных тирозинкиназ (RTK), самое большое в геноме, состоящее по меньшей мере из 16 рецепторов, которые взаимодействуют с девятью мембраносвязанными эфринными лигандами (Pasquale, E.B. et al., 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 6: 462-475). Их можно дополнительно подразделять на две группы, класс А и В, на основе гомологичности последовательности и афинности связывания (Pasquale, E.B. et al., 2005, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 6: 462-475). Рецепторы Eph класса А взаимодействуют с множественными лигандами семейства эфрин А, группы гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанных мембранных белков, тогда как рецепторы Eph класса В связываются с эфринными В лигандами, семейством трансмембранных белков. Связывание рецепторов Eph со своими лигандами индуцирует группирование рецепторов, активацию киназной активности и последующее транс-фосфорилирование цитоплазматических доменов по остаткам тирозина с образованием центров "причаливания" для целого ряда сигнальных белков (Kullander, K. and Klein, R., 2002, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 3: 475-486, Noren, N.K. and Pasquale, E.B., 2004, *Cell signal.*, 16: 655-666).

Рак представляет собой заболевание, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией, являющейся следствием искаженной сигнальной трансдукции. Наиболее опасные формы рака представляют собой злокачественные клетки, обладающие способностью к распространению, либо непосредственно прорастая в прилегающие ткани посредством инвазии, либо путем имплантации в отдаленные участки с помощью метастазов. Метастатические клетки приобрели способность отделяться от первичной опухоли, перемещаться к отдаленным участкам по кровотоку или лимфатической системе и колонизировать отдаленное и чужеродное микроокружение.

В настоящее время, очевидно, что молекулы Eph также играют роль в болезненных состояниях, таких как рак. В частности, сообщают о повышенной экспрессии рецептора EphA2 при раке яичников, молочной железы, предстательной железы, легких, толстой кишки, пищевода, клеток почечного эпителия, шейки матки, а также при меланоме. Предполагают, что EphA2 является позитивным регулятором клеточного роста и выживания злокачественных клеток (Landen, C.N. et al., 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 9 (6): 1179-1187). Также описана роль EphA2 в метастазировании, поскольку сама по себе повышенная экспрессия EphA2 является достаточной для трансформации эпителиальных клеток молочной железы в злокачественный фенотип (Zelinski et al., 2001, *Cancer Res.*, 61: 2301-2306) и увеличивает спонтанное метастазирование в отдаленные участки (Landen, C.N. et al., 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 9 (6): 1179-1187). Более того, имеется все больше указаний на то, что EphA2 принимает участие в ангиогенезе опухолей (Ogawa et al., 2000, *Oncogene*, 19: 6043-6052, Cheng et al. 2002, *Mol. Cancer Res.*, 1: 2-11, Cheng et al. 2003, *Neoplasia*, 5 (5): 445-456, Dobrzanski et al., 2004, *Cancer Res.*, 64: 910-919).

Показано, что фосфорилирование EphA2 связано с его избытком. Фосфорилированный по остаткам тирозина EphA2 быстро интернализируется и обрекается на деградацию, в то время как нефосфорилированный EphA2 характеризуется замедленным метаболизмом и вследствие этого накапливается на клеточной поверхности. В настоящее время считается, что подобная модель может вносить вклад в высокую частоту встречаемости сверхэкспрессии EphA2 при раке (Landen, C.N. et al., 2005, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 9 (6): 1179-1187). Однако реальная ситуация может быть более сложной, поскольку последние данные, судя по всему, свидетельствуют о роли зависимых и независимых от киназы функций EphA2 в развитии опухоли (Fang W.B., 2005, *Oncogene*, 24: 7859-7868).

Разработаны агонистические антитела, которые стимулируют фосфорилирование по остаткам тирозина и интернализацию EphA2, что в конечном итоге приводит к ингибированию роста опухолевых клеток (Dodge-Zantek et al., 1999, *Cell Growth & Differ.*, 10: 629-638, WO 01/12172, WO 03/094859, WO

2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642). Данные антитела направлены против внеклеточного домена EphA2. Поскольку данные агонистические антитела не ингибируют, а скорее стимулируют фосфорилирование рецептора EphA2 и сигналы в нисходящем направлении, данные антитела не могут быть эффективными в отношении опухолей, развитию которых способствует киназная активность EphA2. С другой стороны, предложено использовать антагонистические средства, включая антитела (WO 2004/092343), однако в данном документе не раскрыто ни одного фактически существующего антагонистического антитела. Более того, подобные антитела были предложены скорее для стимулирования, чем для ингибирования клеточной пролиферации. В патентной заявке WO 2006/084226 раскрывают антитела, которые ни увеличивают, ни уменьшают киназную активность EphA2, однако способны сдерживать пролиферацию опухолевых клеток. Однако в данном документе отсутствуют указания на то, что данные антитела предотвращают связывание эфрина A1 с рецептором и ингибируют индуцированное эфрином A1 фосфорилирование EphA2. Скорее, они могут влиять на пролиферацию опухолевых клеток посредством совершенно иного механизма, например, предотвращая группирование рецепторов после связывания эфрина A1. Таким образом, специалист в данной области не сочтет такие антитела антагонистами, скорее, механизм их действия является неизвестным.

Вследствие этого существует необходимость в новых антагонистических анти-EphA2 антителах, которые связываются с внеклеточными доменами рецептора EphA2, ингибируют его активацию лигандом эфрином A1 и ингибируют зависимый от киназы EphA2 рост опухолевых клеток. Такие антагонистические антитела должны быть полезны для лечения рака.

Сущность изобретения

Соответственно, целью данного изобретения является предложить средства, которые специфически связываются с членами семейства рецепторов Eph класса A, такими как EphA2, и ингибируют клеточную активность рецептора, вызывая антагонизм рецептора. Таким образом, настоящее изобретение включает антитела или их фрагменты, которые распознают рецептор EphA2, предпочтительно человека, и действуют как антагонисты указанного рецептора.

Рецептор EphA2 играет роль в развитии и росте опухолей, а также принимает участие в метастазировании. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению способны ингибировать рост раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению способны предотвращать миграцию метастатических раковых клеток. В предпочтительных вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака эндометрия, карциномы яичника, остеосаркомы, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака легких, синовиальной карциномы, рака поджелудочной железы, саркомы, глиомы, рака головы и шеи, рака желудка, рака печени и других карцином. В другом варианте осуществления антитела по изобретению способны ингибировать ангиогенез.

Поскольку анти-EphA2 антитела, раскрытые в документах известного уровня техники, преимущественно являлись агонистами (например, WO 03/094859, WO 2004/014292, WO 2004/101764, WO 2006/023403, WO 2006/047637, WO 2007/030642), данное изобретение охватывает антитела, распознающие указанный рецептор, которые обладают минимальной агонистической активностью, или предпочтительно полностью лишены агонистической активности в отношении рецептора. В предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению не стимулируют фосфорилирование EphA2 по остаткам тирозина.

Антитела по изобретению способны ингибировать связывание лиганда, предпочтительно эфрина A1, с рецептором EphA2. В некоторых вариантах осуществления они способны ингибировать фосфорилирование EphA2 по остаткам тирозина. В другом варианте осуществления фосфорилирование EphA2 по остаткам тирозина ингибируется антителами по изобретению даже в присутствии эфрина A1. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению способны блокировать опосредованную EphA2 передачу сигнала, в частности, они способны ингибировать EphA2-зависимое фосфорилирование Akt.

Данное изобретение также относится к антителам, которые связывают рецептор EphA2 с K_D , составляющей $0,3 \times 10^{-9}$ М или меньше.

Антитела по изобретению могут быть поликлональными или моноклональными. Эпитопсвязывающие фрагменты, такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv, включены в объем данного изобретения. Предпочтительными являются моноклональные анти-EphA2 антитела. В более предпочтительном варианте осуществления предлагают мышинные антитела, выбранные из 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, которые полностью охарактеризованы в данном описании в отношении их аминокислотных последовательностей переменных областей как легких, так и тяжелых цепей, последовательностей кДНК генов переменных областей легких и тяжелых цепей, идентификации их CDR (определяющих комплементарность областей), идентификации их поверхностных аминокислот и способов их экспрессии в рекомбинантной форме. Гибридомы, продуцирующие мышинные анти-EphA2 моноклональные антитела 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11, а также EphA2-N1 и EphA2-N2, депонированы в соответствии с Будапештской конвенцией 16 июня 2006 г. и 3 мая 2007 г., соответственно, в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA, под входящими номерами PTA-7660, PTA-7661, PTA-7662, PTA-8407 и PTA-8408, соответственно.

Настоящее изобретение включает мышинные анти-EphA2 моноклональные антитела, выбранные из 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, а также поверхностно-модифицированные или гуманизированные варианты антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, где экспонированные на поверхности остатки каркасов переменной области антител, или их эпитопсвязывающие фрагменты, заменены как в легких, так и в тяжелых цепях для большего сходства с поверхностями известных человеческих антител. Гуманизированные антитела и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению обладают улучшенными свойствами в том отношении, что они являются менее иммуногенными (или полностью неиммуногенными), чем мышинные варианты в субъектах-людях, которым их вводят. Таким образом, различные варианты гуманизированных антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, а также их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению специфически распознают рецептор EphA2, при этом не являясь иммуногенными для человека.

Гуманизированные варианты антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 по настоящему изобретению в данном описании полностью охарактеризованы в отношении их соответствующих аминокислотных последовательностей переменных областей как легких, так и тяжелых цепей, последовательностей ДНК генов переменных областей легких и тяжелых цепей, идентификации определяющих комплементарность областей (CDR), идентификации их поверхностных аминокислотных остатков каркасов переменных областей и раскрытия способов их экспрессии в рекомбинантной форме.

Данное изобретение также предусматривает применение конъюгатов между цитотоксическими конъюгатами, включающих (1) связывающее клетки средство, которое распознает и связывает рецептор EphA, такой как рецептор EphA2, а также (2) цитотоксическое средство. В цитотоксических конъюгатах связывающее клетки средство обладает высокой афинностью для рецептора EphA (например, рецептора EphA2), и цитотоксическое средство обладает высокой степенью цитотоксичности для клеток, экспрессирующих рецептор EphA, так что цитотоксические конъюгаты по настоящему изобретению образуют эффективные цитотоксирующие средства.

В предпочтительном варианте осуществления связывающее клетки средство представляет собой анти-EphA2 антитело (например, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2) или его эпитопсвязывающий фрагмент, более предпочтительно гуманизированное анти-EphA2 антитело (например, 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2) или его эпитопсвязывающий фрагмент, где цитотоксическое средство является ковалентно присоединенным, напрямую или через расщепляемый, либо нерасщепляемый линкер, к антителу или его эпитопсвязывающему фрагменту. В более предпочтительных вариантах осуществления связывающее клетки средство представляет собой гуманизированные антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 или их эпитопсвязывающий фрагмент, а цитотоксическое средство представляет собой таксол, мейтанзиноид, производное томеимицина, производное лептомицина, CC-1065 или аналог CC-1065.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения связывающее клетки средство представляет собой гуманизированное анти-EphA2 антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, и цитотоксическое средство представляет собой мейтанзиновое соединение, такое как DM1 или DM4.

Настоящее изобретение также охватывает применение фрагментов анти-EphA2 антител, которые сохраняют способность связывать рецептор EphA2. В другом аспекте изобретения предусмотрено применение функциональных эквивалентов анти-EphA2 антител.

Настоящее изобретение также охватывает способ ингибирования роста клеток, экспрессирующих рецептор EphA2. В предпочтительных вариантах осуществления способ ингибирования роста клеток, экспрессирующих рецептор EphA2, применяется *in vivo* и приводит к гибели клеток, хотя применения *in vitro* и *ex vivo* также включены.

Настоящее изобретение также относится к терапевтической композиции, содержащей анти-EphA2 антитело или конъюгат анти-EphA2 антитело-цитотоксическое средство и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиенты. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит второе терапевтическое средство. Это второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, включающей антагонисты фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), тканевого фактора (TF), белка C, белка S, тромбоцитарного фактора роста (PDGF) или рецептора HER2.

Кроме того, настоящее изобретение включает способ лечения субъекта, страдающего от рака, при помощи терапевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак. В частности, раковая клетка представляет собой клетку злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака эндометрия, карциномы яичника, остеосаркомы, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака легких, синовиальной карциномы, рака поджелудочной железы, саркомы, глиомы, рака головы и шеи, рака желудка, рака печени и других карцином. В предпочтительных вариантах осуществления цитотоксический конъюгат содержит анти-EphA2 антитело и цитотоксическое средство. В более предпочтительных вариантах осуществления цитотоксический конъюгат представляет собой конъюгат гуманизированное 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 антитело-DM1, гуманизированное 37.3D7, 37.1F5,

53.2Н11, EphA2-N1 и EphA2-N2 антитело-DM4, конъюгат гуманизированное 37.3D7, 37.1F5, 53.2Н11, EphA2-N1 и EphA2-N2 антитело-таксан или конъюгат гуманизированное 37.3D7, 37.1F5, 53.2Н11, EphA2-N1 и EphA2-N2 антитело-производное томеимицина, и конъюгат вводят совместно с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентами.

В другом аспекте изобретения анти-EphA2 антитела применяют для выявления белка EphA2 в биологическом образце. В предпочтительном варианте осуществления указанные антитела используют для определения уровней EphA2 в опухолевой ткани.

Настоящее изобретение также относится к набору, включающему анти-EphA2 антитело или конъюгат анти-EphA2 антитело-цитотоксическое средство и инструкцию по применению. В предпочтительных вариантах осуществления анти-EphA2 антитела представляют собой гуманизированные антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2Н11, EphA2-N1 и EphA2-N2, цитотоксическое средство представляет собой мейтанзиновое соединение, такое как DM1 или DM4, таксан, производное лептомицина или производное томеимицина, а инструкции относятся к применению конъюгатов в лечении субъекта, страдающего от рака. Набор может также включать компоненты, необходимые для приготовления фармацевтически приемлемого препарата, такие как разбавитель, в случае, если конъюгат находится в лиофилизированном состоянии или в концентрированной форме, а также для введения препарата.

Если не указано особо, все литературные источники и патенты, цитированные в данном описании, включены в него посредством ссылок.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен анализ методом FACS-анализа специфического связывания анти-EphA2 антител с клетками, сверхэкспрессирующими EphA2 человека (клетки 300-19/hu-EphA2). На фиг. 1А представлены данные для антитела 37.3D7, на фиг. 1В - для антитела 37.1F5 и на фиг. 1С - для антитела 53.2Н11, соответственно.

На фиг. 2 представлено специфическое связывание очищенного антитела 37.3D7 с клетками ВхРС3 рака поджелудочной железы человека, клетками MDA-MB-231 рака молочной железы человека и клетками HT-29 рака толстой кишки человека. Представлены гистограммы FACS-анализа.

На фиг. 3 представлены кривые связывания для антител 37.3D7 (фиг. 3А), 37.1F5 (фиг. 3В) и 53.2Н11 (фиг. 3С), полученные с мышинными клетками 300-19, сверхэкспрессирующими EphA2 человека (300-19/hu-EphA2).

На фиг. 4 представлено специфическое связывание очищенных антител 37.3D7 и 53.2Н11 с клетками, сверхэкспрессирующими EphA2. Представлены гистограммы FACS-анализа. На фиг. 4А представлены данные для клеток, сверхэкспрессирующих мышинный EphA2 (300-19/mu-EphA2), и на фиг. 4В представлены данные для клеток, сверхэкспрессирующих крысиный EphA2 (300-19/rat-EphA2).

На фиг. 5А представлено специфическое связывание очищенных антител 37.3D7, 37.1F5 и 53.2Н11 с эпителиальными клетками почки обезьяны VERO. Представлены гистограммы FACS-анализа.

На фиг. 5В представлены кривые связывания для антител 37.3D7, 37.1F5 и 53.2Н11, полученные с эпителиальными клетками почки обезьяны VERO.

На фиг. 6 показано ингибирование антителами 37.3D7, 37.1F5 и 53.2Н11 связывания биотинилированного эфрина А1 с клетками MDA-MB-231 рака молочной железы человека.

На фиг. 7А показано ингибирование антителами 37.3D7 и 37.1F5 стимулированного эфрином А1 фосфорилирования EphA2 в клетках MDA-MB-231 молочной железы.

На фиг. 7В показано ингибирование антителами 37.3D7 и 53.2Н11 стимулированного эфрином А1 фосфорилирования EphA2 в клетках MDA-MB-231 молочной железы.

На фиг. 7С показано ингибирование антителами 37.3D7 и 37.1F5 стимулированного эфрином А1 фосфорилирования Akt в клетках CFPAC-1 поджелудочной железы.

На фиг. 8А и В показано стимулирование фосфорилирования EphA2 эфрином А1 и отсутствие стимулирования фосфорилирования EphA2 антителами 37.3D7, 37.1F5 и 53.2Н11 в клетках MDA-MB-231 молочной железы.

На фиг. 9А-9D показано ингибирование стимулированных сывороткой роста и выживания клеток HT-29 толстой кишки (9А), клеток LoVo толстой кишки (9В), клеток CFPAC-1 поджелудочной железы (9С) и клеток UACC-257 меланомы (9D) антителами 37.3D7 и 53.2Н11.

На фиг. 10А показано дозозависимое ингибирование стимулированного сывороткой роста клеток ВхРС3 поджелудочной железы антителом 37.3D7.

На фиг. 10В показано дозозависимое ингибирование стимулированного сывороткой роста клеток LoVo толстой кишки антителом 53.2Н11.

На фиг. 10С показано дозозависимое ингибирование стимулированного EGF роста клеток LoVo толстой кишки антителом 53.2Н11.

На фиг. 11А представлена кривая связывания антитела 37.3D7 с клетками HUVEC.

На фиг. 11В представлена кривая связывания антитела 37.1F5 с клетками HUVEC.

На фиг. 12 показано ингибирование стимулированного VEGF роста и выживания клеток HUVEC антителом 37.3D7.

На фиг. 13 показано ингибирование антителом 37.3D7 индуцированного VEGF фосфорилирования

Акт в клетках HUVEC.

На фиг. 14 показан эффект воздействия антителом 37.3D7 на рост ксенотрансплантата рака толстой кишки HT-29 в мышцах. Эффект сравнивается с таковым для анти-EGFR антитела и контрольного не связывающегося антитела IgG1.

На фиг. 15А показано ингибирование роста клеток PC3 опухоли предстательной железы с помощью hu37.3D7-SPDB-DM4.

На фиг. 15В показано ингибирование роста клеток PC3 опухоли предстательной железы с помощью hu53.2H11-SPDB-DM4.

На фиг. 16А показан эффект воздействия hu37.3D7-SPDB-DM4 на рост ксенотрансплантата опухоли молочной железы MDA-MB-231 у мышей.

На фиг. 16В показан эффект воздействия hu53.2H11-SPDB-DM4 на рост ксенотрансплантата опухоли молочной железы MDA-MB-231 у мышей.

Подробное описание изобретения

В данном описании предложены новые средства, способные специфически связывать рецепторы EphA и вызывать антагонизм указанных рецепторов. В частности, авторы настоящего изобретения открыли новые антитела, которые специфически связываются с рецепторами EphA на клеточной поверхности. В то время как известные ранее антитела, которые специфически связывают рецептор EphA, также активируют его даже в отсутствие его лигандов, антитела или фрагменты по настоящему изобретению предпочтительно лишены любой агонистической активности. С другой стороны, они обладают уникальной способностью ингибировать клеточные функции рецептора даже в присутствии его лигандов, свойством, которое полностью отсутствует у известных ранее EphA2-связывающих антител. Более того, антагонистические антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению ингибируют рост и/или миграцию опухолевых клеток человека, и/или ангиогенез, три свойства, абсолютно неожиданные, принимая во внимание известный уровень техники (Landen, C.N. et al., 2005, Expert. Opin. Ther. Targets, 9 (6): 1179-1187, WO 01/12172, WO 2004/014292, WO 2004/092343).

Как используется в данном описании, термин "рецептор Eph" означает тирозинкиназу, принадлежащую к семейству рецепторов Eph (обзор в Pasquale, E.B. et al., 2005, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 6, 462-475). "Семейство рецепторов Eph класса А" или "рецепторы EphA", как используется в данном описании, предпочтительно взаимодействуют с гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанными лигандами (подкласса эфрина А, который в настоящее время включает пять лигандов). Специфические рецепторы EphA включают: EphA1 (также называемый Eph и Esk), EphA2 (также называемый Eck, mEck, Myk2, Sek2), EphA3 (также называемый Nek, Mek4, Tyro4 и Cek4), EphA4 (также известный как Nek8, Sek1, Tyro1 и Cek8), EphA5 (также называемый Nek7, Bsk, Ehk1, Rek7 и Cek7), EphA6 (также называемый mEhk2 и Ehk2), EphA7 (иначе называемый Nek11, Mdk1, Ebk, Ehk3) и EphA8 (также называемый Eek и mEek), а также их существующие в природе варианты. Предпочтительным рецептором Eph в данном описании является "рецептор EphA2", обладающий, например, аминокислотной последовательностью под номерами доступа в Genbank NM_004431 (человеческий EphA2), NM_010139 (мышинный EphA2) или NXM_345596 (крысиный EphA2). Термин "лиганд Eph", как используется в данном описании, означает белок, который связывает и необязательно активирует (например, стимулирует его аутофосфорилирование) рецептор Eph. В данном описании предпочтительным лигандом Eph является "эфрин А1", который связывается с рецептором EphA2 и обладает, например, аминокислотной последовательностью под номером доступа в Genbank NM_004428 (человеческий эфрин А1).

Термин "антагонист", как используется в данном описании, означает молекулу, которая способна ингибировать одну или более биологических активностей молекулы-мишени, такой как рецептор EphA. Антагонисты могут действовать, препятствуя связыванию рецептора с лигандом и наоборот, уменьшая фосфорилирование EphA2 и/или выводя из строя, либо уничтожая клетки, которые были активированы лигандом. Антагонисты могут полностью блокировать взаимодействия рецептор-лиганд или могут существенно уменьшать такие взаимодействия. Все подобные особенности вмешательства со стороны антагониста следует считать эквивалентными для целей данного изобретения. Таким образом, в объем изобретения входят антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с рецептором EphA, лигандом Eph или комплексом рецептора Eph и лиганда Eph; варианты, отличающиеся по аминокислотным последовательностям, или производные рецептора EphA или лиганда EphA, которые препятствуют взаимодействию между рецептором EphA и лигандом EphA; растворимый рецептор EphA или растворимый лиганд EphA, необязательно слитые с гетерологичной молекулой, такой как область иммуноглобулина (например, иммуноадгезин); комплекс, включающий рецептор EphA, связанный с лигандом EphA; пептиды с синтетической или природной последовательностью, которые связываются с рецептором EphA или лигандом EphA.

Термин "агонист", как используется в данном описании, означает любое соединение, включая белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела, конъюгат, большую молекулу, малую молекулу, способное активировать одну или более биологических активностей молекулы-мишени. Агонисты EphA действуют, стимулируя фосфорилирование белка, тем самым запуская процесс деградации указанного

белка.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится, среди прочих отличительных признаков, к анти-EphA моноклональным антителам, анти-EphA гуманизированным антителам, а также фрагментам анти-EphA антител. Все антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению разработаны для специфического распознавания и связывания рецептора EphA2 и действуют как антагонисты рецептора EphA2. Кроме того, антагонистические антитела и фрагменты антител по изобретению обладают уникальными свойствами, будучи способными ингибировать рост опухолевых клеток человека и/или миграцию метастатических раковых клеток, и/или ангиогенез.

Предпочтительный рецептор EphA, связываемый антагонистическими антителами и фрагментами антител по изобретению, представляет собой рецептор EphA2. Человеческий EphA2 является предпочтительным рецептором EphA2.

Рецептор EphA2 принадлежит к семейству рецепторов, у которых фосфорилирование цитоплазматического концевой сегмента возрастает после связывания лиганда для взаимодействия с множеством регулирующих и сигнальных белков, что приводит к активации различных клеточных сигнальных каскадов реакций в нисходящем направлении (Kullander, K. and Klein, R., 2002, Nature Reviews Mol. Cell Biol., 3: 475-486, Noren, N.K. and Pasquale, E. B., 2004, Cell signal., 16: 655-666). Как используется в данном описании, термин "опосредованная EphA2 передача сигнала" означает все клеточные события, которые происходят в ответ на связывание лиганда с EphA2. В то время как антитела, раскрытые в документах известного уровня техники, действуют как агонисты рецептора EphA2 и, в частности, увеличивают фосфорилирование по остаткам тирозина белка EphA2, антитела и фрагменты антител по изобретению предпочтительно лишены любых подобных агонистических свойств. В частности, они не способны сами стимулировать фосфорилирование EphA2.

С другой стороны, данное изобретение относится к первым подлинно антагонистическим анти-EphA2 антителам. В одном варианте осуществления антитела и фрагменты антител по изобретению способны ингибировать связывание лиганда с рецептором EphA. В предпочтительном варианте осуществления связывание эфрина A1 с EphA2 предотвращают антитела и их фрагменты, предложенные по данному изобретению. Примечательно, что в другом варианте осуществления антитела и фрагменты антител по изобретению способны ингибировать фосфорилирование по остаткам тирозина рецептора EphA2, даже в присутствии эфрина A1. Более того, указанные антитела и их фрагменты способны ингибировать опосредованную EphA2 передачу сигнала. В частности, зависимое от эфрина A1 фосфорилирование Akt можно предотвращать с помощью антител и фрагментов антител по изобретению.

Антитела

Термин "антитело" в данном описании используется в самом широком смысле и, в особенности, охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела) любого изотипа, такие как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела, химерные антитела и фрагменты антител. Антитело, способное вступать в реакцию с определенным антигеном, можно получать рекомбинантными методами, такими как селекция библиотек рекомбинантных антител в фаге или схожих векторах, либо иммунизируя животное антигеном или кодирующей антиген нуклеиновой кислотой.

Типичное антитело состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, которые соединены дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и переменную область. Каждая переменная область содержит три сегмента, называемые "определяющие комплементарность области" ("CDR") или "гиперпеременные области", которые в первую очередь ответственны за связывание эпитопа антигена. Обычно их называют CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца. Более консервативные участки переменных областей называются "каркасные области".

Как используется в данном описании, "V_H" или "VH" означает переменную область иммуноглобулиновой тяжелой цепи антитела, включая тяжелую цепь фрагмента F_v, scF_v, dsF_v, Fab, Fab' или F(ab')₂. Обозначение "V_L" или "VL" относится к переменной области иммуноглобулиновой легкой цепи антитела, включая легкую цепь фрагмента F_v, scF_v, dsF_v, Fab, Fab' или F(ab')₂.

"Поликлональное антитело" представляет собой антитело, которое было получено в числе прочих или в присутствии одного или большего количества других, не идентичных антител. Как правило, поликлональные антитела получают из В-лимфоцитов в присутствии нескольких других В-лимфоцитов, продуцирующих не идентичные антитела. Обычно поликлональные антитела получают непосредственно от иммунизированного животного.

"Моноклональное антитело", как используется в данном описании, представляет собой антитело, полученное из популяции в основном гомогенных антител, то есть антитела, образующие данную популяцию, являются по существу идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Данные антитела направлены против одного эпитопа и вследствие этого являются высоко специфическими.

"Эпитоп" представляет собой участок антигена, с которым связывается антитело. Он может быть

образован смежными остатками или несмежными остатками, расположенными в непосредственной близости друг от друга при укладке антигенного белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются в условиях денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные несмежными аминокислотами, обычно утрачиваются в указанных условиях.

Как используется в данном описании, термин "K_D" означает константу диссоциации при взаимодействии конкретное антитело/антиген.

В основе настоящего изобретения лежат мышинные анти-EphA2 антитела, в данном описании обозначенные 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, которые полностью охарактеризованы в отношении аминокислотных последовательностей как легких, так и тяжелых цепей, идентификации CDR, идентификации поверхностных аминокислот, а также способов их экспрессии в рекомбинантной форме. Первичные аминокислотные последовательности и последовательности ДНК легких и тяжелых цепей антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, а также гуманизированных вариантов, раскрыты в данном описании.

Антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 получены с помощью гибридом, соответственно обозначенных 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, и депонированы в соответствии с Будапештской конвенцией 16 июня 2006 г. и 3 мая 2007 г., соответственно, в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA, под номерами доступа РТА-7660, РТА-7661, РТА-7662, РТА-8407 и РТА-8408, соответственно.

Объем настоящего изобретения не ограничен антителами и фрагментами, обладающими данными последовательностями.

Напротив, все антитела и фрагменты, которые специфически связываются с рецептором EphA2 и противодействуют биологической активности рецептора, но которые лишены агонистической активности, входят в объем настоящего изобретения. Таким образом, антитела и фрагменты антител могут отличаться от антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, либо от гуманизированных производных, по аминокислотным последовательностям их каркасной структуры, CDR, легкой цепи и тяжелой цепи, и все-таки входить в объем настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам или их эпитопсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более CDR, обладающих аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 и 72.

В предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68 и 69, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71 и 72.

В более предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат три CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 и 6. В еще более предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.3D7, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:1, 2 и 3, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:4, 5 и 6.

В другом более предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат три CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 и 12. В еще более предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.1F5, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:7, 8 и 9, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:10, 11 и 12.

В другом более предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат три CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:13, 14, 15, 16, 17 и 18. В еще более предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 53.2H11, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:13, 14 и 15, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:16, 17 и 18.

В другом более предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат три CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65 и 66. В еще более предпочтительном варианте осуществления предлагают анти-

тело EphA2-N1, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:61, 62 и 63, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:64, 65 и 66.

В другом более предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат три CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:67, 68, 69, 70, 71 и 72. В еще более предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело EphA2-N2, которое содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:67, 68 и 69, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:70, 71 и 72.

В другом варианте осуществления антитела по изобретению содержат V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:20, 22, 24, 74 и 76. В предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.3D7, содержащее V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:20. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.1F5, содержащее V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:22. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 53.2H11, содержащее V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:24. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело EphA2-N1, содержащее V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:74. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело EphA2-N2, содержащее V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:76.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по изобретению содержат V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, 28, 30, 78 и 80. В предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.3D7, содержащее V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:26. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 37.1F5, содержащее V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:28. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело 53.2H11, содержащее V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:30. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело EphA2-N1, содержащее V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:78. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают антитело EphA2-N2, содержащее V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:80.

Гуманизированные или поверхностно-модифицированные антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2

Как используется в данном описании, термин "гуманизированное антитело" означает химерное антитело, которое содержит минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина, отличного от человеческого. "Химерное антитело", как используется в данном описании, представляет собой антитело, в котором константная область или ее часть подвергнута изменению, замене или обмену таким образом, что переменная область присоединена к константной области других видов, либо принадлежащей к другому классу или подклассу антител. "Химерное антитело" также означает антитело, в котором переменная область или ее часть подвергнута изменению, замене или обмену таким образом, что константная область присоединена к переменной области других видов, либо принадлежащей к другому классу или подклассу антител.

Целью гуманизации является снижение иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышинное антитело, для введения человеку, но при этом с сохранением полной антигенсвязывающей активности и специфичности антитела. Гуманизированные антитела, или антитела, адаптированные, чтобы не отторгаться другими млекопитающими, можно получать с помощью различных методик, таких как поверхностная модификация и пересадка CDR. Как используется в данном описании, в методике поверхностного модифицирования используют сочетание молекулярного моделирования, статистического анализа и мутагенеза для изменения отличных от CDR поверхностей переменных областей антитела с тем, чтобы они напоминали поверхности известных антител целевого хозяина.

Стратегии и способы поверхностной модификации антител, а также другие способы снижения иммуногенности антител в отличающемся хозяине описаны в патенте США №5639641, полное содержание которого включено в данное описание посредством ссылки. Кратко, в предпочтительном способе (1) производят выравнивания по позициям пула переменных областей тяжелой и легкой цепи антител для получения набора экспонированных на поверхности позиций каркаса переменной области тяжелой и легкой цепи, где выравниваемые позиции для всех переменных областей являются по меньшей мере примерно на 98% идентичными, (2) набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков

каркаса варибельной области тяжелой и легкой цепи определяют для антитела грызуна (или фрагмента антитела), (3) определяют набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелой и легкой цепи, который в наибольшей степени идентичен набору экспонированных на поверхности аминокислотных остатков грызуна, (4) набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелой и легкой цепи, определенный на этапе (2), замещают набором экспонированных на поверхности аминокислотных остатков каркаса варибельной области тяжелой и легкой цепи, определенным на этапе (3), за исключением тех аминокислотных остатков, которые находятся в пределах 5 Å от любого атома любого остатка определяющих комплементарность областей антитела грызуна, и (5) получают гуманизованное антитело грызуна, обладающее специфичностью связывания.

Антитела можно гуманизировать, применяя разнообразные методики, включая пересадку CDR (EP 0239400, WO 91/09967, патенты США №5530101 и 5585089), маскирование или поверхностную модификацию (EP 0592106, EP 0519596, Padlan E.A., 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498, Studnicka G.M. et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814, Roguska M.A. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:969-973), а также перетасовку цепи (патент США №5565332). Человеческие антитела можно получать с помощью разнообразных методов, известных в данной области, включая методы фагового дисплея. См. также патенты США №4444887, 4716111, 5545806 и 5814318, а также публикации международных патентных заявок номера WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741 (полное содержание указанных литературных источников включено посредством ссылок).

Настоящее изобретение относится к гуманизованным антителам или их фрагментам, которые распознают рецептор EphA2 и действуют как антагонисты. В другом варианте осуществления гуманизованные антитела или их эпитопсвязывающие фрагменты обладают дополнительной способностью ингибировать рост раковых клеток, экспрессирующих рецептор EphA2. В следующем варианте осуществления гуманизованное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент обладает дополнительной способностью ингибировать миграцию метастатических раковых клеток, экспрессирующих рецептор EphA2.

Предпочтительным вариантом осуществления такого гуманизованного антитела является гуманизованное антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, либо его эпитопсвязывающий фрагмент.

В более предпочтительных вариантах осуществления предлагают поверхностно-модифицированные или гуманизованные варианты антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, где экспонированные на поверхности остатки антитела или его фрагментов заменены как в легкой, так и в тяжелой цепях, чтобы в большей степени напоминать поверхности известных человеческих антител. Гуманизованные антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 или их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению обладают улучшенными свойствами. Например, гуманизованные антитела 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 или их эпитопсвязывающие фрагменты специфически распознают рецептор EphA2. Более предпочтительно гуманизованные антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 или их эпитопсвязывающие фрагменты обладают дополнительной способностью ингибировать рост клеток, экспрессирующих рецептор EphA2.

Гуманизованные варианты антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 также полностью охарактеризованы в данном описании в отношении соответствующих им аминокислотных последовательностей варибельных областей как легкой, так и тяжелой цепи, последовательностей ДНК генов варибельных областей легких и тяжелых цепей, идентификации CDR, идентификации их поверхностных аминокислот и раскрытия способов для их экспрессии в рекомбинантной форме. Однако объем настоящего изобретения не ограничен антителами и фрагментами, обладающими данными последовательностями. Напротив, все антитела и фрагменты, которые специфически связываются с рецептором EphA2, включены в настоящее изобретение. Предпочтительно антитела и фрагменты, которые специфически связываются с рецептором EphA2, проявляют антагонизм с биологической активностью рецептора. Более предпочтительно такие антитела, дополнительно, по существу лишены агонистической активности. Таким образом, антитела и эпитопсвязывающие фрагменты антител по настоящему изобретению могут отличаться от антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2 или его гуманизованных производных по аминокислотным последовательностям их каркасной структуры, CDR и/или легкой цепи и тяжелой цепи, и все-таки входить в объем настоящего изобретения.

CDR антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2 идентифицированы при помощи моделирования, и их молекулярные структуры прогнозируемы. Кроме того, хотя CDR являются важными для распознавания эпитопа, они не являются незаменимыми для антител и фрагментов по изобретению. Соответственно, предлагают антитела и фрагменты, которые обладают улучшенными свойствами, полученными, например, при помощи "созревания аффинности" антитела по настоящему изобретению. Гены гаметического типа для IgVκ и Jκ легкой цепи мыши, а также гены гаметического типа для IgVh и Jh тяжелой цепи, производными от которых, очевидно, являются 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и

EphA2-N2, были идентифицированы, как раскрыто в разделе экспериментальных примеров. Такие последовательности генов гаметического типа полезны для выявления соматических мутаций в антителах, в CDR включительно.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2, а также последовательности их CDR ранее не были известны и опубликованы в данной заявке. Подобную информацию можно использовать для получения гуманизированных вариантов антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2. Данные гуманизированные анти-EphA антитела или их производные могут также быть использованы в качестве связывающего клетки средства по настоящему изобретению.

Таким образом, в одном варианте осуществления данное изобретение относится к гуманизированным антителам или их эпитопсвязывающим фрагментам, содержащим одну или более CDR, обладающих аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 и 72. В предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 61, 62, 63, 67, 68 и 69, и указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 64, 65, 66, 70, 71 и 72. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:1, 2 и 3, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:4, 5 и 6. В другом дополнительном предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:7, 8 и 9, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:10, 11 и 12. В другом дополнительном предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:13, 14 и 15, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, представленными SEQ ID NO:16, 17 и 18. В другом более предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:61, 62 и 63, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:64, 65 и 66. В другом более предпочтительном варианте осуществления гуманизированные антитела по изобретению содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:67, 68 и 69, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные CDR, обладающие аминокислотными последовательностями, состоящими из SEQ ID NO:70, 71 и 72.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к гуманизированным антителам или их фрагментам, которые содержат V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43 и 45. В предпочтительном варианте осуществления предлагают гуманизированное антитело 37.1D7, которое содержит V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:32, 34 и 36. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают гуманизированное антитело 37.1F5, которое содержит V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:37 и 38. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают гуманизированное антитело 53.2H11, которое содержит V_H , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:40, 42, 43 и 45.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к гуманизированным антителам или их фрагментам, которые содержат V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:47, 48, 49, 50 и 52. В предпочтительном варианте осуществления предлагают гуманизированное антитело 37.1D7, которое содержит V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:47. В другом предпочтительном варианте осуществления предлагают гуманизированное антитело 37.1F5, которое содержит V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:48, 49 и 50. В другом предпочти-

тельном варианте осуществления предлагают гуманизованное антитело 53.2H11, которое содержит V_L , обладающую аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO:52.

Гуманизованные антитела 37.3D7 и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут также содержать замены аминокислотных остатков в легкой и/или тяжелой цепи на одной или большем числе позиций, маркированные серым остатками в табл. 1A и 1B, которые представляют собой мышинные поверхностные остатки каркаса, претерпевшие изменение с исходного мышинового остатка на соответствующий поверхностный остаток каркаса в человеческом антителе, 28E4. Помеченные звездочкой (*) остатки в табл. 1B соответствуют мышинным обратным мутациям в вариантах тяжелой цепи гуманизованного 37.3D7 (SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:36). Остатки для обратных мутаций являются проксимальными относительно CDR и были выбраны, как описано в патенте США №5639641, или по аналогии с выбором остатков, который в предыдущих попытках гуманизации привел к снижению аффинности связывания антигена (Roguska et al., 1996, Protein Eng.; 9(10): 895-904, публикации патентных заявок США 2003/0235582 и 2005/0118183).

Аналогичным образом, гуманизованные антитела 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 и их эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут также содержать замены аминокислотных остатков в легкой и/или тяжелой цепи.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

Предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-EphA2 антитела по изобретению. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую и/или легкую цепь анти-EphA2 иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления одна нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь анти-EphA2 иммуноглобулина, и другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует легкую цепь анти-EphA2 иммуноглобулина.

В другом аспекте данного изобретения предлагают полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие аминокислотной последовательностью, выбранной из группы SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 и 80. В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77 и 79. Изобретение не ограничивается указанными полинуклеотидами в чистом виде, но также включает все полинуклеотиды, характеризующиеся по меньшей мере 80% идентичностью с указанными полинуклеотидами.

Изобретение относится к векторам, содержащим полинуклеотиды по изобретению. В одном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь анти-EphA2 иммуноглобулина. В другом варианте осуществления указанный полинуклеотид кодирует легкую цепь анти-EphA2 иммуноглобулина. Изобретение также относится к векторам, содержащим молекулы полинуклеотида, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды.

Для того чтобы экспрессировать тяжелую и/или легкую цепь анти-EphA2 антител по изобретению, полинуклеотиды, кодирующие указанные тяжелые и/или легкие цепи, встраивают в экспрессионные векторы таким образом, что гены являются функционально связанными с транскрипционными и трансляционными последовательностями. Экспрессионные векторы включают плазмиды, YAC, космиды, ретровирусы, производные от EBV эписомы, а также все другие векторы, которые, как известно квалифицированному специалисту в данной области, удобно использовать для гарантированной экспрессии указанных тяжелых и/или легких цепей. Специалист в данной области понимает, что полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть клонированы в различные векторы или в один и тот же вектор. В предпочтительном варианте осуществления указанные полинуклеотиды клонированы в один и тот же вектор.

Полинуклеотиды по изобретению и векторы, содержащие данные молекулы, можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего, либо любого другого типа клетки-хозяина, известного специалисту в данной области. Трансформацию можно проводить любым из известных способов введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области и включают опосредованную декстраном трансформацию, преципитацию с фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида в липосомы, биолистические инъекции и прямые микроинъекции ДНК в ядра.

Фрагменты антител

Антитела по настоящему изобретению включают как полноразмерные антитела, обсуждавшиеся выше, так и эпитопсвязывающие фрагменты. Как используется в данном описании, "фрагменты антител" включают любые части антитела, которые сохраняют способность связывать эпитоп, распознаваемый полноразмерным антителом, обычно называемые "эпитопсвязывающими фрагментами". Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными мостиками Fvs (dsFv), и фрагменты, содержащие либо V_L , либо V_H -область. Эпитопсвязывающие фрагменты, включая одноцепочечные антитела, могут

включать вариабельную область(ти) саму по себе или в сочетании с полным или частичным вариантом перечисленного далее: шарнирная область, домены C_H1, C_H2 и C_H3.

Такие фрагменты могут содержать один или оба фрагмента Fab или фрагмент F(ab')₂. Предпочтительно фрагменты антитела содержат все шесть CDR полноразмерного антитела, хотя фрагменты, содержащие менее шести подобных областей, например, три, четыре или пять CDR, также являются функциональными. Далее, фрагменты могут представлять собой или сочетать в себе членов любого из следующих классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, а также их подклассов.

Фрагменты Fab и F(ab')₂ можно получать протеолитическим расщеплением при помощи ферментов, таких как папаин (фрагменты Fab) или пепсин (фрагменты F(ab')₂).

"Одноцепочечные FVs" ("scFvs") фрагменты представляют собой эпитопсвязывающие фрагменты, которые содержат по меньшей мере один фрагмент вариабельной области тяжелой цепи антитела (V_H), связанный с по меньшей мере одним фрагментом вариабельной области легкой цепи антитела (V_L). Линкер может представлять собой короткий гибкий пептид, выбранный так, чтобы гарантировать правильную трехмерную укладку областей (V_L) и (V_H), в то время как они связаны таким образом, чтобы сохранять специфичность связывания молекулы-мишени целого антитела, от которого происходит данный одноцепочечный фрагмент антитела. Карбоксильный конец последовательности (V_L) или (V_H) может быть ковалентно присоединен к аминоконцу комплементарной последовательности (V_L) или (V_H).

Одноцепочечные фрагменты антител по настоящему изобретению содержат аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере одной из вариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR) полноразмерных антител, описанных в данном описании, однако лишённые некоторых или всех константных доменов таких антител. Данные константные домены не являются необходимыми для связывания антигена, однако представляют собой большую часть структуры полноразмерных антител. Вследствие этого, использование одноцепочечных фрагментов антител позволит преодолеть некоторые из проблем, связанных с применением антител, содержащих константный домен частично или полностью. Например, одноцепочечные фрагменты антител, как правило, свободны от нежелательных взаимодействий между биологическими молекулами и константной областью тяжелой цепи, либо от другой нежелательной биологической активности. Кроме того, одноцепочечные фрагменты антител значительно меньше, чем целые антитела, и вследствие этого могут обладать большей способностью проникать в капилляры, чем целые антитела, что позволяет одноцепочечным фрагментам антител локализовать и связывать центры связывания целевого антигена более эффективно. Кроме того, можно наладить относительно крупномасштабную продукцию фрагментов антител в прокариотических клетках, что облегчает их производство. Более того, относительно малые размеры одноцепочечных фрагментов антител делает менее вероятным развитие иммунного ответа у реципиента, чем в случае с полноразмерными антителами.

Одноцепочечные фрагменты антител можно получать молекулярным клонированием, с помощью библиотек фагового дисплея антител или аналогичных методик, хорошо известных квалифицированным специалистам в данной области. Данные белки можно получать, например, в эукариотических клетках или прокариотических клетках, включая бактерии. Эпитопсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно также получать, используя различные методы фагового дисплея, известные в данной области. В методах фагового дисплея функциональные домены антитела экспонированы на поверхности фаговых частиц, которые несут полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, такие фаги можно использовать, чтобы экспонировать эпитопсвязывающие домены, экспрессированные из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши). Фаг, экспрессирующий эпитопсвязывающий домен, который связывает интересующее антитело, можно выбирать или идентифицировать при помощи антигена, например, используя меченый антиген, связанный или иммобилизованный на твердой поверхности или гранулах. Фаги, используемые в данных методах, обычно представляют собой нитчатые фаги, включая fd и M13 связывающие домены, экспрессированные из фага с Fab, Fv или стабилизированными при помощи дисульфидных мостиков Fv-доменами антитела, рекомбинантно слитыми либо с фаговым геном III, либо с белком гена VIII.

Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения эпитопсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, включают те, что описаны в Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182: 41-50, Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184: 177-186, Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24:952-958, Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18, Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57: 191-280, PCT заявке № PCT/GB91/01134, PCT публикациях WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и патентах США №5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, полное содержание каждого из которых включено в данное описание посредством ссылок.

После выбора фага, области фага, кодирующие фрагменты можно выделять и использовать для получения эпитопсвязывающих фрагментов посредством экспрессии в выбранном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, с применением методики рекомбинантных ДНК, например, как описано подробно ниже. Например, можно также использовать методики для рекомбинантной продукции фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂ при помощи способов, известных

специалистам в данной области, таких как те, что описаны в РСТ публикации WO 92/22324, Mullinax et al., 1992, *BioTechniques*, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI*, 34: 26-34; а также Better et al., 1988, *Science*, 240: 1041-1043, полное содержание указанных литературных источников включено посредством ссылок. Примеры методик, которые можно использовать для продуцирования одноцепочечных Fv и антител, включают те, что описаны в патентах США №4946778 и 5258498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203: 46-88, Shu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 7995-7999, Skerra et al., 1988, *Science*, 240: 1038-1040.

Функциональные эквиваленты

В объем данного изобретения также включены функциональные эквиваленты анти-EphA антитела и гуманизированного антитела против рецептора EphA2. Термин "функциональные эквиваленты" охватывает антитела с гомологичными последовательностями, химерные антитела, искусственные антитела и модифицированные антитела, например, где каждый функциональный эквивалент охарактеризован по его способности связываться с рецептором EphA2. Квалифицированный специалист в данной области понимает, что группа молекул, называемых "фрагменты антитела", и группа, называемая "функциональные эквиваленты", перекрываются. Способы получения функциональных эквивалентов известны специалистам в данной области и описаны, например, в РСТ заявке WO 93/21319, европейском патенте № EP 0239400, РСТ заявке WO 89/09622, европейском патенте № EP 0338745 и европейской патентной заявке EP 0332424, соответствующее полное содержание которых включено посредством ссылок.

Антитела с гомологичными последовательностями представляют собой такие антитела, аминокислотные последовательности которых обладают гомологией последовательностей с аминокислотной последовательностью анти-EphA антитела и гуманизированного анти-EphA антитела по настоящему изобретению. Предпочтительно гомология существует с аминокислотной последовательностью переменных областей анти-EphA антитела и гуманизированного анти-EphA антитела по настоящему изобретению. "Гомология последовательности", применительно к аминокислотной последовательности в данном описании, определена как последовательность с по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93 или 94% гомологией последовательности, более предпочтительно с по меньшей мере примерно 95, 96, 97, 98 или 99% гомологией последовательности с другой аминокислотной последовательностью, как определено, например, методом поиска FASTA в соответствии с Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 2444-2448.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором различные части антитела происходят из различных видов животных. Например, антитело, обладающее переменной областью, происходящей из мышинового моноклонального антитела, в паре с константной областью человеческого иммуноглобулина. Способы получения химерных антител известны в данной области. См., например, Morrison, 1985, *Science*, 229: 1202, Oi et al., 1986, *BioTechniques*, 4: 214, Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202; патенты США №5807715, 4816567 и 4816397, полное содержание которых включено в данное описание посредством ссылок.

Гуманизированные формы химерных антител получают, вставляя определяющие комплементарность области, например, мышинового антитела, в человеческий каркасный домен, например, см. РСТ публикацию WO 92/22653. Гуманизированные химерные антитела предпочтительно имеют константные области и переменные области за исключением определяющих комплементарность областей (CDR), происходящие, в основном или исключительно, из соответствующих областей антитела человека, и CDR, происходящие, в основном или исключительно, из млекопитающих, отличных от человека.

Искусственные антитела включают фрагменты scFv, диатела, триатела, тетратела и mgu (см. обзоры Winter, G. and Milstein, C, 1991, *Nature*, 349: 293-299, Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, 11: 548-557), каждое из которых обладает антигенсвязывающей способностью. В одноцепочечном фрагменте Fv (scFv) домены V_H и V_L антитела связаны гибким пептидом. Как правило, длина данного линкерного пептида составляет примерно 15 аминокислотных остатков. Если линкер намного короче, например, 5 аминокислот, образуются диатела, которые представляют собой двухвалентные димеры scFv. Если линкер укорочен до менее чем трех аминокислотных остатков, образуются трехмерные и тетрамерные структуры, которые называют триатела и тетратела. Наименьшей связывающей единицей антитела является CDR, как правило, CDR2 тяжелой цепи, который обладает способностью к специфическому распознаванию и связыванию, достаточной, чтобы быть использованным самостоятельно. Такой фрагмент называют "молекулярная распознающая единица" или mgu. Несколько подобных mgu можно сшивать вместе при помощи коротких линкерных пептидов, образуя, таким образом, искусственный связывающий белок с более высокой авидностью, чем отдельная mgu.

Функциональные эквиваленты согласно настоящему изобретению также включают модифицированные антитела, например, антитела, модифицированные ковалентным присоединением молекулы любого типа к антителу. Например, модифицированные антитела включают антитела, которые модифицированы, например, гликозилированием, ацетилизацией, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расще-

плением, сшиванием с клеточным лигандом или другим белком, и так далее. Ковалентное присоединение не мешает антителу вызывать анти-идиотипический ответ. Такие модификации можно осуществлять известными способами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и так далее. Кроме того, модифицированные антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

Функциональные эквиваленты можно получать путем взаимного обмена различных CDR на различных цепях в различных каркасах. Так, например, различные классы антител являются возможными для данного набора CDR путем замещения различных тяжелых цепей, посредством чего можно получать, например, IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE типы и изотипы антител. Аналогично, искусственные антитела в объеме данного изобретения можно получать, вставляя данный набор CDR в полностью синтетический каркас.

Функциональные эквиваленты можно легко получать посредством мутаций, делеций и/или вставок в последовательностях варибельной и/или константной области, которые примыкают к конкретному набору CDR, используя широкое разнообразие способов, известных в данной области.

Фрагменты антител и функциональные эквиваленты по настоящему изобретению охватывают молекулы с детектируемой степенью связывания с EphA, при сравнении с антителом 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2. Детектируемая степень связывания включает все значения в диапазоне по меньшей мере 10-100%, предпочтительно по меньшей мере 50, 60 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 99% связывающей способности мышинного антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2 по отношению к EphA.

Усовершенствованные антитела

CDR обладают первостепенной важностью для распознавания эпитопа и связывания антитела. Однако можно производить изменения в остатках, которые составляют CDR, без отрицательного влияния на способность антитела распознавать и связывать родственный ему эпитоп. Например, можно осуществлять изменения, которые не влияют на распознавание эпитопа, но увеличивают аффинность связывания антитела для эпитопа.

Таким образом, в объем настоящего изобретения также включены усовершенствованные варианты как мышинных, так и гуманизированных антител, которые также специфически распознают и связывают EphA, предпочтительно с повышенной аффинностью.

Во многих исследованиях изучали эффекты от введения одного или более аминокислотных изменений на различных позициях в последовательности антитела, на основании знаний о первичной последовательности антитела, на его свойства, такие как связывание или уровень экспрессии (Yang, W.P. et al., 1995, *J. Mol. Biol.*, 254: 392-403, Rader, C. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 8910-8915, Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 535-539).

В данных исследованиях получали эквиваленты первичного антитела путем изменения последовательностей генов тяжелой и легкой цепей в CDR1, CDR2, CDR3 или каркасных областях с помощью таких методов, как опосредованный олигонуклеотидами направленный мутагенез, кассетный мутагенез, ошибочно-направленная ПЦР, перетасовка ДНК или штаммы-мутаторы *E. coli* (Vaughan, T.J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 535-539, Adey, N.B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B.K. et al., Academic Press). Данные способы изменения последовательности первичного антитела привели к повышенным уровням аффинности вторичных антител (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 3576-3580, Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 10701-10705, Davies, J. and Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, 2: 169-179, Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 256: 77-88, Short, M.K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 16365-16370, Furukawa, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 27 622-27 628).

С помощью аналогичным образом направленной стратегии изменения одного или более аминокислотных остатков антитела, последовательности антител, описанные в данном изобретении, можно использовать для разработки анти-EphA антител с улучшенными функциями, включая более высокую аффинность для EphA.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются такие, которые: (1) уменьшают подверженность протеолизу, (2) уменьшают подверженность окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов и (4) придают или изменяют другие физико-химические или функциональные свойства подобных аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины с последовательностью, отличной от природной пептидной последовательности. Например, одну или множество аминокислотных замен (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) можно осуществлять в природной последовательности, предпочтительно в области полипептида за пределами домена(ов), образующих межмолекулярные контакты. Консервативные аминокислотные замены не должны существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна приводить к нарушению спирали, которая имеет место в исходной последовательности, или разрушать другие типы вторичной структуры, которые характеризуют исходную последовательность). Примеры принятых в данной области техники вторичных и третичных структур поли-

пептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)), *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)), и Thornton et al., 1991, *Nature*, 354: 105, полное содержание всех источников включено в данное описание посредством ссылок.

Усовершенствованные антитела также включают такие антитела с улучшенными характеристиками, которые получены с помощью стандартных методик иммунизации животных, создания гибридом и отбора на антитела со специфическими характеристиками.

Настоящее изобретение также включает цитотоксические конъюгаты. Данные цитотоксические конъюгаты содержат два первичных компонента, связывающее клетки средство и цитотоксическое средство.

Как используется в данном описании, термин "связывающее клетки средство" означает средство, которое специфически распознает и связывает рецепторы EphA на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления связывающее клетки средство специфически распознает рецептор таким образом, что это дает возможность конъюгатам действовать целевым образом с незначительными побочными эффектами, происходящими вследствие неспецифического связывания.

В другом варианте осуществления связывающее клетки средство по настоящему изобретению также специфически распознает рецептор EphA таким образом, что конъюгаты будут находиться в контакте с клеткой-мишенью в течение периода времени, достаточного, чтобы дать возможность цитотоксической лекарственной части конъюгата воздействовать на клетку и/или обеспечить достаточно времени для того, чтобы конъюгат был интернализован клеткой.

В предпочтительном варианте осуществления цитотоксические конъюгаты содержат анти-EphA антитело в качестве связывающего клетки средства, более предпочтительно мышинное анти-EphA моноклональное антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2. В более предпочтительном варианте осуществления цитотоксические конъюгаты содержат гуманизованное антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2 или его эпитопсвязывающий фрагмент. Антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2 способно специфически распознавать рецептор EphA, такой как EphA2, и направлять цитотоксическое средство на аномальную клетку или ткань, такую как раковые клетки, целевым образом.

Второй компонент цитотоксических конъюгатов по настоящему изобретению представляет собой цитотоксическое средство. Термин "цитотоксическое средство", как используется в данном описании, означает вещество, которое снижает или блокирует функцию или рост клеток и/или вызывает разрушение клеток.

В предпочтительных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой токсин, мейтанзиноид, такой как DM1 или DM4, низкомолекулярное лекарственное средство, производное томеймицина, производное лептомицина, пролекарство, аналог CC-1065 или CC-1065. В предпочтительных вариантах осуществления связывающие клетки средства по настоящему изобретению являются ковалентно присоединенными, напрямую или через расщепляемый или нерасщепляемый линкер, к цитотоксическому средству.

Связывающие клетки средства, цитотоксические средства и линкеры обсуждаются более подробно ниже.

Связывающие клетки средства

Эффективность соединений по настоящему изобретению как терапевтических средств зависит от тщательного отбора соответствующего связывающего клетки средства. Связывающие клетки средства могут представлять собой любой тип известных в настоящее время средств, или тех, что становятся известными, и включают пептиды и не-пептиды. Связывающее клетки средство может представлять собой любое соединение, которое способно связывать клетку, либо специфическим, либо неспецифическим образом. Как правило, это могут быть антитела (особенно моноклональные антитела), лимфокины, гормоны, факторы роста, витамины, молекулы, переносящие питательные вещества (такие как трансферрин) или любые другие связывающие клетки молекулы или вещества.

Более конкретные примеры связывающих клетки средств, которые можно использовать, включают поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, такие как Fab, Fab' и F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, *J. Immunol.*, 131:2895-2902, Spring et al., 1974, *J. Immunol.*, 113: 470-478, Nisonoff et al., 1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244).

Предпочтительно гуманизованное анти-EphA антитело используют в качестве связывающего клетки средства по настоящему изобретению. Более предпочтительно гуманизованное анти-EphA антитело выбирают из гуманизованных или поверхностно-модифицированных антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2.

Цитотоксические средства

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированными с лекарственным средством, таким как мейтанзиноид или производное томеймицина, с образованием пролекарства, обладающего специфической цитотоксичностью в

отношении экспрессирующих антиген клеток вследствие нацеливания лекарственного средства на рецептор ErbA2. Цитотоксические конъюгаты, содержащие такие антитела и небольшое высокотоксичное лекарственное средство (например, мейтанзиноиды, таксаны, производные томеймицина, производные лептомицина, аналоги СС-1065 и СС-1065), можно использовать в качестве терапевтических средств для лечения опухолей, таких как опухоли молочной железы и яичников.

Цитотоксическое средство, используемое в цитотоксическом конъюгате по настоящему изобретению, может представлять собой любое соединение, которое приводит к гибели клетки или индуцирует клеточный лизис или каким-либо образом снижает жизнеспособность клеток. Предпочтительные цитотоксические средства включают, например, мейтанзиноиды и аналоги мейтанзиноидов, пролекарства, производные томеймицина, токсиды, производные лептомицина, аналоги СС-1065 и СС-1065, охарактеризованные ниже. Данные цитотоксические средства конъюгированы с антителами, фрагментами антител, функциональными эквивалентами, усовершенствованными антителами и их аналогами, как раскрыто в данном описании.

Цитотоксические конъюгаты можно получать методами *in vitro*. Чтобы присоединить лекарственное средство или пролекарство к антителу, используют сшивающую группу. Подходящие сшивающие группы хорошо известны в данной области и включают дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолабильные группы, фотолабильные группы, расщепляемые пептидазой группы и расщепляемые эстеразой группы. Предпочтительными сшивающими группами являются дисульфидные группы и тиоэфирные группы. Например, конъюгаты можно создавать, используя дисульфидную обменную реакцию, или образуя тиоэфирную связь между антителом и лекарственным средством или пролекарством.

Мейтанзиноиды

Среди цитотоксических средств, которые можно использовать по настоящему изобретению для получения цитотоксического конъюгата, находятся мейтанзиноиды и аналоги мейтанзиноидов. Примеры соответствующих мейтанзиноидов включают мейтанзинол и аналоги мейтанзинола. Мейтанзиноиды представляют собой лекарственные средства, которые ингибируют образование микротрубочек и которые являются высокотоксичными для клеток млекопитающих.

Примеры соответствующих аналогов мейтанзинола включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо и которые имеют модификации по другим позициям. Такие соответствующие мейтанзиноиды раскрыты в патентах США №4424219, 4256746, 4294757, 4307016, 4313946, 4315929, 4331598, 4361650, 4362663, 4364866, 4450254, 4322348, 4371533, 6333410, 5475092, 5585499 и 5846545.

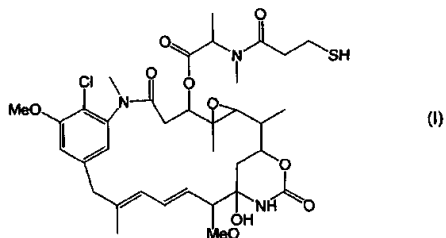
Конкретные примеры соответствующих аналогов мейтанзинола, имеющих модифицированное ароматическое кольцо, включают

- (1) С-19-дехлоро (патент США №4256746) (полученный восстановлением анзамитоцина Р2 при помощи LАН),
- (2) С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлоро (патенты США №4361650 и 4307016) (полученный деметилированием при помощи *Streptomyces* или *Actinomycetes*, либо дехлорированием при помощи LАН), и
- (3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлоро (патент США №4294757) (полученный ацилированием при помощи ацилхлоридов).

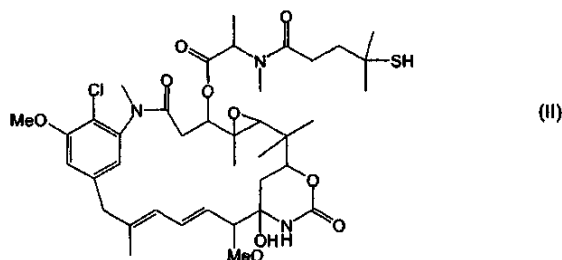
Конкретные примеры соответствующих аналогов мейтанзинола, имеющих модификации по другим позициям, включают

- (1) С-9-SH (патент США №4424219) (полученный в результате реакции мейтанзинола с H₂S или P₂S₅),
- (2) С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США №4331598),
- (3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США №4450254) (полученный из *Nocardia*),
- (4) С-15-гидрокси/ацилокси (патент США №4364866) (полученный конверсией мейтанзинола *Streptomyces*),
- (5) С-15-метокси (патенты США №4313946 и 4315929) (выделенные из *Trewia nudiflora*),
- (6) С-18-N-деметил (патенты США №4362663 и 4322348) (полученный деметилированием мейтанзинола *Streptomyces*), и
- (7) 4,5-дезоксиды (патент США №4371533) (полученный восстановлением мейтанзинола трихлоридом титана/LАН).

В предпочтительном варианте осуществления в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению используют тиолсодержащий мейтанзиноид (DM1), официально называемый N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропил)мейтанзин, в качестве цитотоксического средства. DM1 представлен следующей структурной формулой (I):

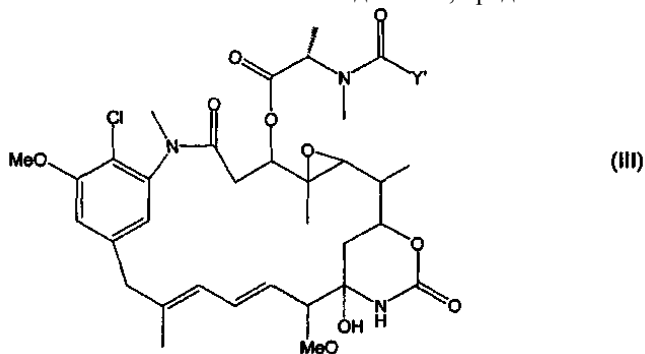


В другом предпочтительном варианте осуществления в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению используют тиолсодержащий мейтанзиноид N²-деацетил-N²-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)мейтанзин в качестве цитотоксического средства. DM4 представлен следующей структурной формулой (II):



В дополнительных вариантах осуществления изобретения можно использовать другие мейтанзины, включая тиол- и дисульфидсодержащие мейтанзиноиды, имеющие моно- или диалкильное замещение по атому углерода, несущему атом серы. Сюда входит мейтанзиноид, имеющий на С-3, С-14 гидроксиметил, С-15 гидроксил или С-20 дезметил, ацилированную аминокислотную боковую цепь с ацильной группой, несущей экранированную сульфгидрильную группу, где атом углерода ацильной группы, несущей тиоловую функциональную группу, имеет один или два заместителя, где указанные заместители представляют собой CH₃, C₂H₅, линейный или разветвленный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и где дополнительно один из заместителей может представлять собой H, и где ацильная группа имеет длину линейной цепи по меньшей мере три атома углерода между карбонильной функциональной группой и атомом серы.

Такие дополнительные мейтанзины включают соединения, представленные формулой (III)



где Y' представляет собой (CR₇R₈)₁(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qA_r(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃R₄)_nC-R₁R₂SZ, где

R₁ и R₂ каждый независимо представляют собой CH₃, C₂H₅, линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R₂ может представлять собой H,

A, B, D представляют собой циклоалкил или циклоалкенил, содержащий 3-10 атомов углерода, простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ каждый независимо представляют собой H, CH₃, C₂H₅, линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический

ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m, n, o, p, q, r, s и t каждый независимо равен 0 или целому числу от 1 до 5, при условии, что по меньшей мере два из l, m, n, o, p, q, r, s и t не равны нулю одновременно, и

Z представляет собой H, SR или -COR, где R представляет собой линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, либо простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

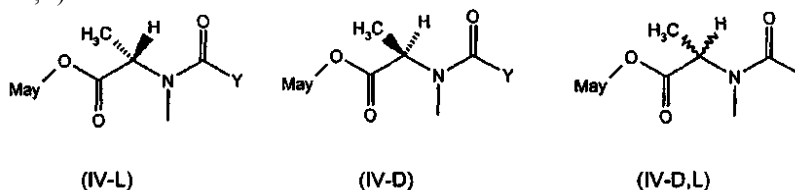
Предпочтительные варианты осуществления формулы (III) включают соединения формулы (III), где R₁ представляет собой метил, R₂ представляет собой H, и Z представляет собой H.

R₁ и R₂ представляют собой метил, и Z представляет собой H.

R₁ представляет собой метил, R₂ представляет собой H, и Z представляет собой -SCH₃.

R₁ и R₂ представляют собой метил, и Z представляет собой -SCH₃.

Такие дополнительные мейтанзины также включают соединения, представленные формулами (IV-L), (IV-D) или (IV-D,L)



где Y представляет собой (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ, где

R₁ и R₂ каждый независимо представляют собой CH₃, C₂H₅, линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R₂ может представлять собой H,

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый независимо представляют собой H, CH₃, C₂H₅, линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m и n каждый независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен 0,

Z представляет собой H, SR или -COR, где R представляет собой линейный или разветвленный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, либо простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и

Ma представляет собой мейтанзиноид, который несет боковую цепь на C-3, C-14 гидроксиметиле, C-15 гидроксиде или C-20 дезметиле.

Предпочтительные варианты осуществления формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L) включают соединения формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L), где

R₁ представляет собой метил, R₂ представляет собой H, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, n равен 0, и Z представляет собой H.

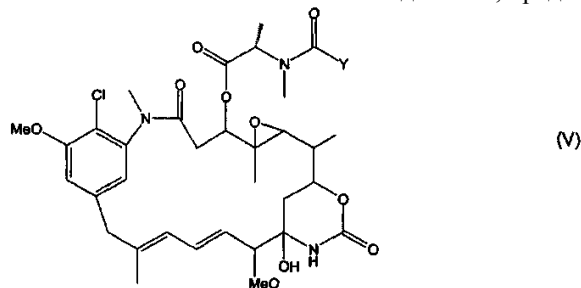
R₁ и R₂ представляют собой метил, R₅, R₆, R₇, R₈ каждый представляет собой H, l и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой H.

R₁ представляет собой метил, R₂ представляет собой H, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃.

R₁ и R₂ представляют собой метил, R₅, R₆, R₇, R₈ каждый представляет собой H, l и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃.

Предпочтительно цитотоксическое средство представлено формулой (IV-L).

Такие дополнительные мейтанзины также включают соединения, представленные формулой (V)



где Y представляет собой (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ, где

R₁ и R₂ каждый независимо представляют собой CH₃, C₂H₅, линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3

до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R_2 может представлять собой H,

R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый независимо представляют собой H, CH_3, C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m и n каждый независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен 0,

Z представляет собой H, SR или $-COR$, где R представляет собой линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, либо простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

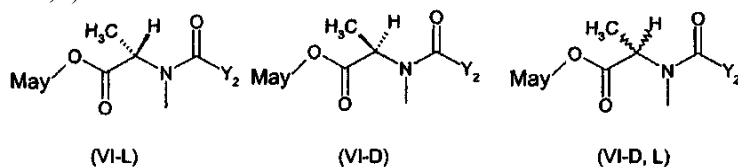
Предпочтительные варианты осуществления формулы (V) включают соединения формулы (V), где R_1 представляет собой метил, R_2 представляет собой H, R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, n равен 0, и Z представляет собой H.

R_1 и R_2 представляют собой метил, R_5, R_6, R_7, R_8 каждый представляет собой H, l и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой H.

R_1 представляет собой метил, R_2 представляет собой H, R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, n равен 0, и Z представляет собой $-SCH_3$.

R_1 и R_2 представляют собой метил, R_5, R_6, R_7, R_8 каждый представляет собой H, l и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой $-SCH_3$.

Такие дополнительные мейтанзины добавочно включают соединения, представленные формулами (VI-L), (VI-D) или (VI-D,L)



где Y_2 представляет собой $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, где

R_1 и R_2 каждый независимо представляют собой CH_3, C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R_2 может представлять собой H,

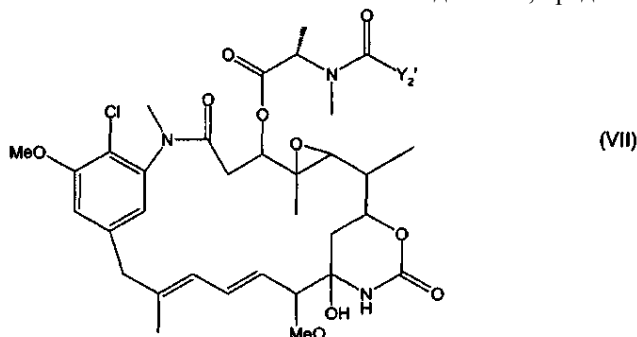
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 и R_8 каждый независимо представляет собой H, CH_3, C_2H_5 , линейный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l, m и n каждый независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен 0,

Z_2 представляет собой SR или COR, где R представляет собой линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, либо простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и

May представляет собой мейтанзиноид.

Такие дополнительные мейтанзины также включают соединения, представленные формулой (VII)



где Y_2' представляет собой

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, где

R_1 и R_2 каждый независимо представляет собой CH_3, C_2H_5 , линейный или разветвленный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R_2 может представлять собой H,

A, B и D каждый независимо представляет собой циклоалкил или циклоалкенил, содержащий от 3

до 10 атомов углерода, простой или замещенный арил, либо гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$ и R_{12} каждый независимо представляет собой H, CH_3 , C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

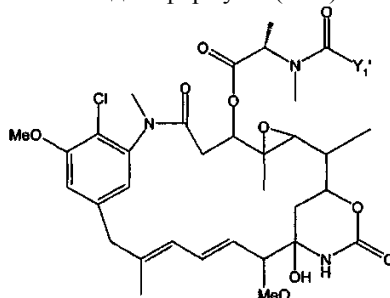
l, m, n, o, p, q, r, s и t каждый независимо равен 0 или целому числу от 1 до 5, при условии, что по меньшей мере два из l, m, n, o, p, q, r, s и t не равны 0 одновременно, и

Z_2 представляет собой SR или -COR, где R представляет собой линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, либо простой или замещенный арил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал.

Предпочтительные варианты осуществления формулы (VII) включают соединения формулы (VII), где R_1 представляет собой метил, R_2 представляет собой H.

Вышеуказанные мейтанзиноиды можно конъюгировать с анти-EphA антителом 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, либо его гомологом или фрагментом, где антитело сшито с мейтанзиноидом при помощи тиоловой или дисульфидной функциональной группы, которая находится на ацильной группе ацилированной аминокислотной боковой цепи, находящейся на C-3, C-14 гидроксиметиле, C-15 гидроксигруппе или C-20 дезметиле мейтанзиноида, и где у ацильной группы ацилированной аминокислотной боковой цепи тиоловая или дисульфидная функциональная группа расположена на атоме углерода, который имеет один или два заместителя, где указанные заместители представляют собой CH_3 , C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и, дополнительно, один из заместителей может представлять собой H, и где ацильная группа имеет длину линейной цепи по меньшей мере три атома углерода между карбонильной функциональной группой и атомом серы.

Предпочтительный конъюгат по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, который содержит анти-EphA антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, либо его гомолог или фрагмент, конъюгированный с мейтанзиноидом формулы (VIII)



(VIII)

где Y_1' представляет собой

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C\equiv C)_sB_1(CR_3R_4)_nCR_1R_2S^-$, где

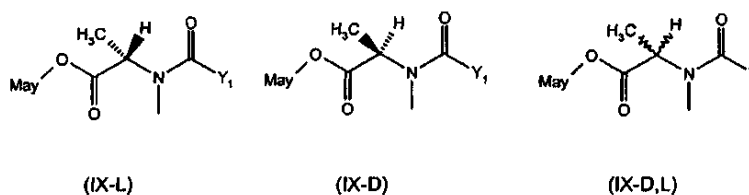
A, B и D каждый независимо представляет собой циклоалкил или циклоалкенил, содержащий 3-10 атомов углерода, простой или замещенный арил, либо гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$ и R_{12} каждый независимо представляет собой H, CH_3 , C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и

l, m, n, o, p, q, r, s и t каждый независимо равен 0 или целому числу от 1 до 5, при условии, что по меньшей мере два из l, m, n, o, p, q, r, s и t не равны нулю одновременно.

Предпочтительно R_1 представляет собой метил, R_2 представляет собой H или R_1 и R_2 представляют собой метил.

Еще более предпочтительный конъюгат по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, который содержит анти-EphA антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, либо его гомолог или фрагмент, конъюгированный с мейтанзиноидом формул (IX-L), (IX-D) или (IX-D,L)



где Y_1 представляет собой $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, где R_1 и R_2 каждый независимо представляет собой CH_3 , C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно R_2 может представлять собой H,

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый независимо представляет собой H, CH_3 , C_2H_5 , линейный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, содержащий от 3 до 10 атомов углерода, фенил, замещенный фенил или гетероциклический ароматический или гетероциклоалкильный радикал,

l , m и n каждый независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен 0, и

May представляет собой мейтанзинол, который несет боковую цепь на C-3, C-14 гидроксиметиле, C-15 гидроксиде или C-20 дезметиле.

Предпочтительные варианты осуществления формул (IX-L), (IX-D) и (IX-D,L) включают соединения формул (IX-L), (IX-D) и (IX-D,L), где

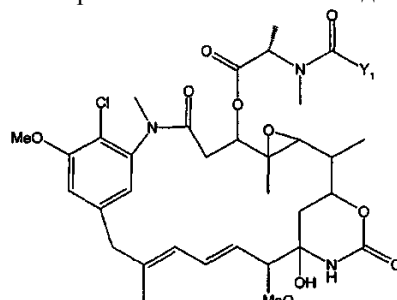
R_1 представляет собой метил, R_2 представляет собой H, или R_1 и R_2 представляют собой метил,

R_3 представляет собой метил, R_4 представляет собой H, R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, n равен 0,

R_1 и R_2 представляют собой метил, R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый представляет собой H, l и m равны 1, n равен 0.

Предпочтительно цитотоксическое средство представлено формулой (IX-L).

Дополнительный предпочтительный конъюгат по настоящему изобретению представляет собой конъюгат, который содержит анти-EphA антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, либо его гомолог или фрагмент, конъюгированный с мейтанзиноидом формулы (X)



(X)

где заместители такие, как определены для вышеприведенной формулы (IX).

Особенно предпочтительными являются любые из вышеописанных соединений, где R_1 представляет собой H, R_2 представляет собой метил, R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый представляет собой H, l и m каждый равен 1, и n равен 0.

Дополнительно особенно предпочтительными являются любые из вышеописанных соединений, где R_1 и R_2 представляют собой метил, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 каждый представляет собой H, l и m равны 1, и n равен 0.

Дополнительно предпочтительным является стереоизомер L-аминоацил.

Каждый из мейтанзиноидов, о котором сообщается в находящейся на рассмотрении патентной заявке США №10/849136, зарегистрированной 20 мая 2004 г., можно также использовать в цитотоксическом конъюгате по настоящему изобретению. Полное содержание патентной заявки США №10/849136 включено в данное описание посредством ссылки.

Дисульфидсодержащие сшивающие группы

Для присоединения мейтанзиноида к связывающему клетки средству, такому как антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, в состав мейтанзиноида входит сшивающий фрагмент. Сшивающий фрагмент содержит химическую связь, которая позволяет высвобождать полностью активные мейтанзиноиды в определенном участке. Соответствующие химические связи хорошо известны в данной области и включают дисульфидные связи, кислотолabile связи, фотолabile связи, расщепляемые пептидазой связи и расщепляемые эстеразой связи. Предпочтительными являются дисульфидные связи.

В состав сшивающего фрагмента также входит реакционно-способная химическая группа. В предпочтительном варианте осуществления реакционно-способная химическая группа может быть ковалентно присоединена к мейтанзиноиду посредством сшивающего фрагмента с дисульфидной связью.

Особенно предпочтительными реакционно-способными химическими группами являются N-сукцинимидильные сложные эфиры и N-сульфосукцинимидильные сложные эфиры.

Особенно предпочтительными мейтанзиноидами, в состав которых входит сшивающий фрагмент, содержащий реакционно-способную химическую группу, являются сложные С-3 эфиры мейтанзинола и его аналоги, где сшивающий фрагмент содержит дисульфидную связь, а в состав реакционно-способной химической группы входит N-сукцинимидильный или N-сульфосукцинимидильный сложный эфир.

Многие позиции на мейтанзиноидах могут служить в качестве позиции для химического присоединения сшивающего фрагмента. Например, позиция С-3 с гидроксильной группой, позиция С-14, модифицированная гидроксиметилом, позиция С-15, модифицированная гидроксильной, и позиция С-20 с гидроксигруппой, предположительно, все являются пригодными. Однако позиция С-3 является предпочтительной, и позиция С-3 мейтанзинола является особенно предпочтительной.

В то время как синтез сложных эфиров мейтанзинола, содержащих сшивающий фрагмент, описан в отношении сшивающих фрагментов с дисульфидными связями, любому специалисту в данной области будет понятно, что сшивающие фрагменты с другими химическими связями (как описано выше) можно также использовать по настоящему изобретению, так же как и другие мейтанзиноиды. Конкретные примеры других химических связей включают кислотолabile связи, фотолabile связи, расщепляемые пептидазой связи и расщепляемые эстеразой связи. В раскрытии патента США №5208020, включенного в данное описание, сообщается о получении мейтанзиноидов, содержащих такие связи.

Синтез мейтанзиноидов и производных мейтанзиноидов с дисульфидным фрагментом, содержащим реакционно-способную группу, описан в патентах США №6441163 и 6333410, а также в патентной заявке США №10/161651, все они включены в данное описание посредством ссылок.

Содержащие реакционно-способные группы мейтанзиноиды, такие как DM1, реагируют с антителом, таким как антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, образуя цитотоксические конъюгаты. Данные конъюгаты можно очищать с помощью ВЭЖХ или гель-фильтрации.

Несколько наилучших схем производства таких конъюгатов антитело-мейтанзиноид приведены в патенте США №6333410 и патентных заявках США №09/867598, 10/161651 и 10/024290, полное содержание их всех включено в данное описание посредством ссылок.

Как правило, раствор антитела в водном буфере можно инкубировать с молярным избытком мейтанзиноидов с дисульфидным фрагментом, содержащим реакционно-способную группу. Реакционную смесь можно гасить добавлением избытка аминов (таких как этаноламин, таурин и так далее). Конъюгат мейтанзиноид-антитело затем можно очищать гель-фильтрацией.

Количество молекул мейтанзиноида, связанных с молекулой антитела, можно определять спектрофотометрическим измерением отношения поглощений при 252 и 280 нм. Предпочтительным является среднее значение 1-10 молекул мейтанзиноида/молекулу антитела.

Конъюгаты антител с мейтанзиноидными лекарственными средствами можно оценивать по их способности подавлять пролиферацию различных нежелательных клеточных линий *in vitro*. Например, такие клеточные линии, как линия A-431 человеческого плоскоклеточного рака, линия SW2 человеческого мелкоклеточного рака легких, линия SKBR3 рака молочной железы человека и линия Namalwa лимфомы Беркитта, легко могут быть использованы для оценки цитотоксичности этих соединений. Оцениваемые клетки можно подвергать действию данных соединений в течение 24 ч, и выжившие фракции клеток измерять в прямых анализах известными способами. Затем по результатам анализов могут быть рассчитаны значения IC₅₀.

ПЭГ-содержащие сшивающие группы

Мейтанзиноиды можно также сшивать со средствами, связывающими клетки, с помощью ПЭГ-содержащих сшивающих групп, как указано в патентной заявке США №10/024290. Эти ПЭГ-содержащие сшивающие группы растворимы как в воде, так и в неводных растворителях и могут быть использованы для присоединения одного или большего количества цитотоксических средств к связывающему клетки средству. Иллюстративные примеры ПЭГ-содержащих сшивающих групп включают гетеробифункциональные ПЭГ-линкеры, которые соединяют цитотоксические средства и связывающие клетки средства по противоположным концам линкеров через функциональную сульфгидрильную или дисульфидную группу на одном конце и активный сложный эфир на другом конце.

В качестве основного примера синтеза цитотоксического конъюгата с использованием ПЭГ-содержащей сшивающей группы можно опять сослаться на патентную заявку США №10/024290 для конкретизации деталей. Синтез начинается с реакции одного или более цитотоксических средств, имеющих в составе реакционно-способный фрагмент ПЭГ, со средством, связывающим клетки, что приводит к замещению концевого активного эфира каждого реакционно-способного фрагмента на аминокислотный остаток средства, связывающего клетки, такого как антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, приводя в результате к образованию цитотоксического конъюгата, содержащего одно или более цитотоксических средств, ковалентно связанных со средством, связывающим клетки,

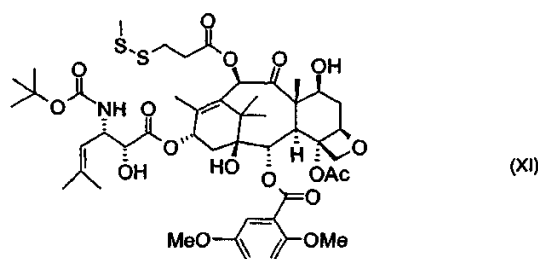
через ПЭГ-содержащую сшивающую группу.

Таксаны

Цитотоксическим средством, используемым в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению, может также являться таксан или его производные.

Таксаны представляют собой класс соединений, который включает паклитаксел (таксол), цитотоксический природный продукт, и доцетаксел (таксотер), полусинтетическое производное, два соединения, которые широко применяются в лечении раковых заболеваний. Таксаны являются ядами митотического веретена, которые ингибируют деполимеризацию тубулина, что приводит к гибели клетки. Несмотря на то что доцетаксел и паклитаксел являются полезными средствами для лечения рака, их противоопухолевая активность ограничена из-за их неспецифической токсичности для нормальных клеток. Кроме того, соединения типа паклитаксела и доцетаксела сами по себе недостаточно эффективны для применения в конъюгатах средств, связывающих клетки.

Предпочтительным таксаном, используемым для получения цитотоксических конъюгатов, является таксан формулы (XI)



Способы синтеза таксанов, которые можно применять в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению, наряду со способами конъюгирования таксанов со средством, связывающим клетки, таким как антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, подробно описаны в патентах США №5416064, 5475092, 6340701, 6372738 и 6436931, а также в патентных заявках США №10/024290, 10/144042, 10/207814, 10/210112 и 10/369563.

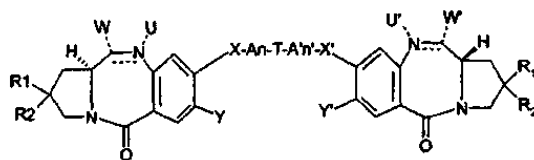
Производные томеймицина

Цитотоксические средства по настоящему изобретению могут также являться производными томеймицина. Производные томеймицина представляют собой пирроло[1,4]бензодиазепины (PBDs), известный класс соединений, проявляющих свои биологические свойства путем ковалентного связывания с N2 гуанина в малой бороздке молекулы ДНК. PBDs включают целый ряд связывающих малую бороздку соединений, таких как антрамицин, неотрамицин и DC-81.

Новые производные томеймицина, которые сохраняют высокую цитотоксичность и могут быть эффективно присоединены к связывающим клетки средствам, описаны в международной заявке № PCT/IB2007/000142, содержание которой включено в данное описание в качестве ссылки. Комплексы связывающее клетки средство-производное томеймицина позволяют в полной мере использовать цитотоксическое действие производных томеймицина целенаправленно только против нежелательных клеток, тем самым избегая побочных эффектов из-за повреждения нецелевых здоровых клеток.

Цитотоксическое средство по настоящему изобретению включает одно или более производных томеймицина, шитых со связывающим клетки средством, таким как антитело 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 или EphA2-N2, через сшивающую группу. Сшивающая группа является частью химического фрагмента, который ковалентно связан с производным томеймицина обычными способами. В предпочтительном варианте осуществления химический фрагмент может быть ковалентно связан с производным томеймицина через дисульфидную связь.

Производные томеймицина, применяемые по настоящему изобретению, имеют формулу (XII), представленную ниже



(XII)

где --- представляет собой необязательную одинарную связь,

--- представляет собой либо одинарную, либо двойную связь,

при условии, что когда --- представляет собой одинарную связь, U и U', одинаковые или различные, независимо представляют собой H, а W и W', одинаковые или различные, независимо выбирают из группы, состоящей из OH, простого эфира, такого как -OR, сложного эфира (например, ацетата), такого как -OCOR, карбоната, такого как -OCOOR, карбамата, такого как -CONRR', циклокарбамата, в котором N10 и C11 являются частью цикла, мочевины, такой как -NRCONRR', тиокарбамата, такого как -

OCSNHR, циклотиакарбамата, в котором N10 и C11 являются частью цикла, -SH, сульфида, такого как -SR, сульфоксида, такого как -SOR, сульфона, такого как -SOOR, сульфоната, такого как -SO₃-, сульфонамида, такого как -NRSOOR, амина, такого как -NRR', необязательно, циклического амина, в котором N10 и C11 являются частью цикла, производного гидроксилamina, такого как -NROR', амида, такого как -NRCOR, азида, такого как -N₃, циано, галогена, триалкила или триарилфосфония, группы аминокислотного происхождения; предпочтительно W и W' являются одинаковыми или различными и представляют собой OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe;

и когда $\overset{\text{---}}{\text{---}}{\text{---}}$ представляет собой двойную связь, U и U' отсутствуют, а W и W' представляют собой H;

R1, R2, R1', R2' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из галида или алкила, необязательно замещенного одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, OR, арилом, Het, S(O)_qR, или R1 и R2, а также R1' и R2' образуют вместе двойную связь, содержащую группу =B и =B', соответственно.

Предпочтительно R1 и R2, а также R1' и R2' образуют вместе двойную связь, содержащую группу =B и =B', соответственно.

B и B' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из алкенила, необязательно замещенного одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, OR, арилом, Het, S(O)_qR, либо B и B' представляют собой атом кислорода.

Предпочтительно B=B'.

Более предпочтительно B=B'= =CH₂ или =CH-CH₃, - X, X' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из одного или более -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Предпочтительно X=X'.

Более предпочтительно X=X'=O.

A, A' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из алкила или алкенила, необязательно содержащего атом кислорода, азота или серы, каждый из которых необязательно замещен одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, арилом, Het, алкилом, алкенилом.

Предпочтительно A=A'.

Более предпочтительно A=A'=линейный незамещенный алкил.

Y, Y' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из H, OR.

Предпочтительно Y=Y'.

Более предпочтительно Y=Y'=Оалкил, более предпочтительно Ометил.

T является -NR-, -O-, -S(O)_q-, или 4-10-членным арилом, циклоалкилом, гетероциклом или гетероарилом, каждый необязательно замещен одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, и/или линкером(ами), или разветвленным алкилом, необязательно замещенным одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR и/или линкером(ами), или линейным алкилом, замещенным одним или более Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR и/или линкером(ами).

Предпочтительно T является 4-10-членным арилом или гетероарилом, более предпочтительно фенилом или пиридиллом, необязательно замещенными одним или более линкером(ами).

Указанный линкер содержит сшивающую группу. Подходящие сшивающие группы хорошо известны в данной области и включают тиоловые, сульфидные, дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолabile группы, фотолabile группы, расщепляемые пептидазой группы и расщепляемые эстеразой группы. Предпочтительными являются дисульфидные группы и тиоэфирные группы.

Когда сшивающая группа представляет собой тиол-, сульфид (или так называемый тиоэфир -S-) или дисульфид (-S-S-)содержащую группу, боковая цепь, содержащая тиоловую, сульфидную или дисульфидную группу, может быть линейной или разветвленной, ароматической или гетероциклической. Специалист в данной области легко определит подходящие боковые цепи.

Предпочтительно указанный линкер имеет формулу -G-D-(Z)_p-S-Z', где

G представляет собой одинарную или двойную связь, -O-, -S-или -NR-;

D представляет собой одинарную связь или -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

где E и F являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из линейных или разветвленных -(OCH₂CH₂)_i-алкил(OCH₂CH₂)_j-, -алкил(OCH₂CH₂)_i-алкил-, -(OCH₂CH₂)_i-, (OCH₂CH₂)_i-циклоалкил(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_i-гетероцикл(OCH₂CH₂)_j-, (OCH₂CH₂)_i-арил(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_i-гетероарил(OCH₂CH₂)_j-, -алкил(OCH₂CH₂)_i-алкил(OCH₂CH₂)_j-, -алкил(OCH₂CH₂)_i-, алкил(OCH₂CH₂)_i-циклоалкил(OCH₂CH₂)_j-, алкил(OCH₂CH₂)_i-гетероцикл(OCH₂CH₂)_j-, -алкил(OCH₂CH₂)_i-арил(OCH₂CH₂)_j-, -алкил(OCH₂CH₂)_i-гетероарил(OCH₂CH₂)_j-, циклоалкил-алкил-, -алкил-циклоалкил-, -гетероцикл-алкил-, -алкил-гетероцикл-, -алкил-арил-, -арил-алкил-, -алкил-гетероарил-, гетероарил-алкил-;

где i и j, одинаковые или различные, являются целыми числами и независимо выбраны из 0, 1 до 2000;

Z представляет собой линейный или разветвленный -алкил-;

p равен 0 или 1;

Z' представляет собой H, защищающие тиол группы, такие как COR, R20 или SR20, где R20 представляет собой H, метил, алкил, необязательно замещенный циклоалкил, арил, гетероарил или гетеро-

цикл, при условии, что если Z' представляет собой H, указанное соединение находится в равновесии с соответствующим соединением, образованным внутримолекулярной циклизацией, полученной в результате добавления тиоловой группы $-SH$ к иминной связи $-NH=$ одного из фрагментов PBD;

n, n' , одинаковые или различные, равны 0 или 1;

q равен 0, 1 или 2;

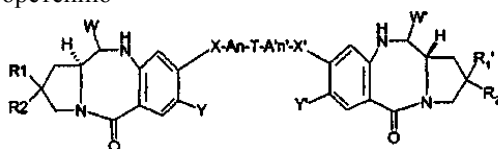
R, R' являются одинаковыми или различными и независимо выбраны из H, алкила, арила, каждый из которых необязательно замещен Hal, CN, NRR' , CF_3 , R, OR, $S(O)_qR$, арилом, Het;

или его фармацевтически приемлемые соли, гидраты или гидратированные соли, или полиморфные кристаллические структуры этих соединений, или его оптические изомеры, рацематы, диастереоизомеры или энантиомеры.

Соединения общей формулы (XII), имеющие геометрические и стереоизомеры, также являются частью данного изобретения.

Известно, что двойная связь между N-10 и C-11 у производных томеймицина формулы (XII) легко превращается обратимым образом в соответствующие иминные аддукты в присутствии воды, спирта, тиола, первичного или вторичного амина, мочевины и других нуклеофилов. Этот процесс является обратимым и соответствующие производные томеймицина могут быть легко регенерированы в присутствии дегидратирующего средства, в непротонированных органических растворителях, в вакууме или при высоких температурах (Z. Tozuka, 1983, J. Antibiotics, 36: 276).

Таким образом, обратимые производные томеймицина общей формулы (XIII) также можно применять согласно настоящему изобретению



(XIII)

где A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' определены, как в формуле (XII), а W, W', одинаковые или различные, выбирают из группы, состоящей из OH, простого эфира, такого как $-OR$, сложного эфира (например, ацетата), такого как $-OCOR$, $-COOR$, карбоната, такого как $-OCOOR$, карбамата, такого как $-OCONRR'$, циклокарбамата, в котором N10 и C11 являются частью цикла, мочевины, такой как $-NRCONRR'$, тиокарбамата, такого как $-OCSNHR$, циклотиюкарбамата, в котором N10 и C11 являются частью цикла, $-SH$, сульфида, такого как $-SR$, сульфоксида, такого как $-SOR$, сульфона, такого как $-SOOR$, сульфоната, такого как $-SO_3-$, сульфонида, такого как $-NRSOOR$, амина, такого как $-NRR'$, необязательно циклического амина, в котором N10 и C11 являются частью цикла, производного гидроксиламина, такого как $-NROR'$, амида, такого как $-NRCOR$, $-NRCONRR'$, азида, такого как $-N_3$, циано, галогена, триалкила или триарилфосфония, группы аминокислотного происхождения; предпочтительно W и W' являются одинаковыми или различными и представляют собой OH, Ome, Oet, $NHCONH_2$, SMe.

Соединения формулы (XIII) могут, таким образом, считаться сольватами, включающими воду, если растворителем является вода, эти сольваты могут быть особенно полезны.

В предпочтительном варианте осуществления производные томеймицина по изобретению выбирают из группы, включающей

8,8'-[1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[1,5-пентандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[1,4-бутандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[3-метил-1,5-пентандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[2,6-пиридиндиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбониламинопропилокси)-2,6-пиридиндиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[5-(3-аминопропилокси)-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

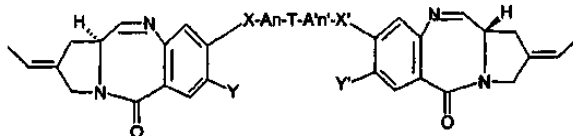
8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбониламинопропил)-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)пропилокси]-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

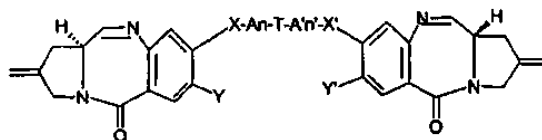
8,8'-[5-ацетилтиометил-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
трет-бутиловый эфир бис {2-[(S)-2-метилен-7-метокси-5-оксо-1,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-илокси]этил} карбаминовой кислоты;
8,8'-[3-(2-ацетилтиоэтил)-1,5-пентадиилбис(окси)]бис[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноил)амино-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[5-(N-4-метилдитио-4,4-диметилбутаноил)амино-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилэтил)амино-1,3-бензолдиил(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитио-2,2-диметилэтил)амино-1,3-бензолдиил(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамидоэтокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)-илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидоэтокси)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидопропокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]-бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидобутокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноил]пиперазин-1-ил)пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноил]пиперазин-1-ил)пропил)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноиламино)этокси]этокси}этокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноиламино)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноиламино)этокси]этокси}этокси)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноиламино)этокси]этокси}этокси)этокси)этокси]этокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(2-[метил(2-метил-2-метилдисульфанил)пропил)амино]этокси)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(3-[метил(4-метил-4-метилдисульфанил)пентаноил)амино]пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(4-(3-[метил(2-метил-2-метилдисульфанил)пропил)амино]пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидо)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он],

а также соответствующие меркапто-производные, либо их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, или гидратированные соли, либо полиморфные кристаллические структуры этих соединений, либо их оптические изомеры, рацематы, диастереоизомеры или энантиомеры.

Предпочтительными соединениями являются соединения формулы



или



где X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' определены, как указано выше.

Соединения формулы (XII) могут быть получены множеством способов, хорошо известных специалистам в данной области. Соединения можно синтезировать, например, путем приложения или адаптации способов, описанных ниже, или их вариациями, как признают квалифицированные специалисты. Соответствующие модификации или замены совершенно очевидны и хорошо известны, либо легко могут быть получены из научной литературы специалистами в данной области. В частности, такие способы можно найти в R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Способы синтеза производных томеймицина, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению, описаны в международной заявке № PCT/IB2007/000142. Соединения по настоящему изобретению можно получать различными путями синтеза. Реагенты и исходные материалы являются коммерчески доступными, либо легко синтезируемыми с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области (см., например, WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori et al., 1986, *Tetrahedron*, 42: 3793-3806).

Молекулы-конъюгаты по данному изобретению можно получать с помощью любой методики. Производные томеймицина по изобретению могут быть сшиты с антителом или другим связывающим клетки средством через кислотолабильный линкер, либо с помощью фотоллабильного линкера. Производные можно конденсировать с пептидом, имеющим подходящую последовательность, а затем сшивать со связывающим клетки средством для получения линкера, расщепляемого пептидазой. Можно получать конъюгаты, содержащие первичную гидроксильную группу, которая может быть сукцинилирована и сшита со связывающим клетки средством для получения конъюгата, который может быть расщеплен внутриклеточными эстеразами для высвобождения свободных производных. Предпочтительно производные синтезируют содержащими свободные или защищенные тиоловые группы, а затем одно или более дисульфидных или тиолсодержащих производных каждое ковалентно сшивают со связывающим клетки средством через дисульфидную связь или тиоэфирный мостик.

Многочисленные способы конъюгации изложены в USP 5416064 и 5475092. Производные томеймицина можно модифицировать так, чтобы получить свободную аминогруппу, и затем сшить с антителом или другим связывающим клетки средством через кислотолабильный линкер, либо фотоллабильный линкер. Производные томеймицина со свободной амино- или карбоксильной группой можно конденсировать с пептидом, а затем сшивать со связывающим клетки средством для получения линкера, расщепляемого пептидазой. Производные томеймицина со свободной гидроксильной группой в составе линкера можно сукцинилировать и сшивать со связывающим клетки средством для получения конъюгата, который может быть расщеплен внутриклеточными эстеразами для высвобождения свободного лекарственного средства. Наиболее предпочтительно производные томеймицина обрабатывают так, чтобы создать свободные или защищенные тиоловые группы, а затем дисульфидные или тиолсодержащие димеры томеймицина сшивают со связывающим клетки средством через дисульфидные связи.

Предпочтительно конъюгатами моноклональное антитело- или связывающее клетки средство-производное томеймицина являются те, которые соединены через дисульфидную связь, как обсуждалось выше, которые способны обеспечить доставку производных томеймицина. Такие связывающие клетки конъюгаты получают известными способами, такими как модификация моноклональных антител сукцинимидилпиридилдитиопропионатом (SPDP) (Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.*, 173: 723-737). Полученную в результате тиопиридиловую группу затем замещают обработкой тиолсодержащими производными томеймицина для получения конъюгатов, сшитых через дисульфид. Альтернативно, в случае арилдитио-производных томеймицина, образование связывающего клетки конъюгата осуществляется прямым замещением арил-тиола производного томеймицина сульфгидрильными группами, заранее встроенными в молекулы антитела. Конъюгаты, содержащие от 1 до 10 молекул лекарственного средства из производных томеймицина, сшитых через дисульфидный мостик, легко получать любым из способов.

Конкретнее, раствор модифицированного дитионитропиридиллом антитела в концентрации 2,5 мг/мл в 0,05 М калий-фосфатном буфере, при pH 7,5, содержащем 2 мМ EDTA, обрабатывают тиолсодержащим производным томеймицина (1,3 молярных экв./дितिопиридиловую группу). Высвобождение тионитропиридина из модифицированного антитела контролируется спектрофотометрически при 325 нм и завершается приблизительно через 16 ч. Конъюгат антитело-производное томеймицина очищают и освобождают от непрореагировавшего лекарственного средства и другого низкомолекулярного материала гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-25 или Sephacryl S300. Количество связанных фрагментов производного томеймицина на молекулу антитела можно определять измерением отношения поглощений при 230 и 275 нм. В среднем таким способом может быть пришито через дисульфидные связи 1-10 молекул производного томеймицина/молекулу антитела.

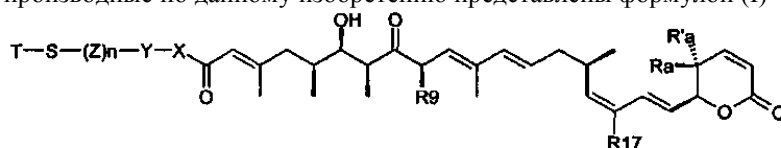
Эффект конъюгации на аффинность связывания в отношении клеток, экспрессирующих антиген,

можно определять способами, ранее описанными Liu et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 8618-8623. Цитотоксичность для клеточных линий производных томеймицина и их конъюгатов с антителом можно измерять путем обратной экстраполяции кривых клеточной пролиферации, как описано в Goldmacher et al., 1985, J. Immunol., 135: 3648-3651. Цитотоксичность этих соединений для адгезивных клеточных линий можно определять клоногенными анализами, как описано в Goldmacher et al., 1986, J. Cell Biol., 102: 1312-1319.

Производные лептомицина

Согласно настоящему изобретению цитотоксическим может также являться производное лептомицина. Согласно настоящему изобретению "производные лептомицина" относятся к членам лептомицинового семейства, как определено у Kalesse et al. (2002, Synthesis 8: 981-1003), и включают: лептомицины, такие как лептомицин А и лептомицин В, каллистатины, ратжадоны, такие как ратжадон А и ратжадон В, ангвиномицины, такие как ангвиномицин А, В, С, D, казусамицины, лептолстатины, лептофуранины, такие как лептофуранин А, В, С, D. Производные лептомицина А и В являются предпочтительными.

Конкретнее, производные по данному изобретению представлены формулой (I)



(I)

где Ra и Ra' представляют собой H или -алк; предпочтительно Ra представляет собой -алк, предпочтительно метил, и Ra' представляет собой H,

R17 представляет собой алкил, необязательно замещенный OR, CN, NRR', перфторалкилом; предпочтительно R17 представляет собой алкил, более предпочтительно метил или этил,

R9 представляет собой алкил, необязательно замещенный OR, CN, NRR', перфтороалкилом; предпочтительно R9 представляет собой алкил, более предпочтительно метил,

X представляет собой -O- или -NR-; предпочтительно X представляет собой -NR-,

Y представляет собой -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-,

предпочтительно, если X представляет собой -O-, Y представляет собой -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-,

где U выбирают из линейных или разветвленных -алк-, алк(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m-алк-, -алк(OCH₂CH₂)_m-алк-, -(OCH₂CH₂)_m-, циклоалкил-, гетероцикл-, циклоалкил-алк-, алк-циклоалкил-, гетероцикл-алк-, алк-гетероцикл-,

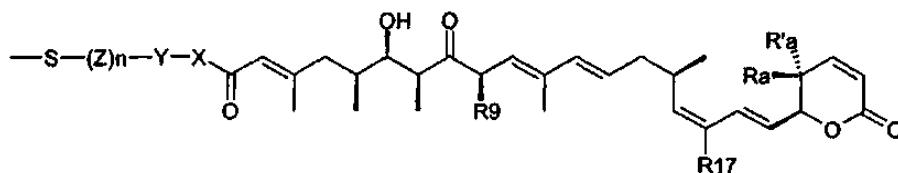
где m представляет собой целое число, выбранное от 1 до 2000,

предпочтительно U представляет собой линейный или разветвленный -алк-,

Z представляет собой -алк,

n равен 0 или 1, предпочтительно n равен 0,

T представляет собой H, тиоловую защитную группу, такую как Ac, R1 или SR₁, где R₁ представляет собой H, метил, алк, циклоалкил, необязательно замещенный арил или гетероцикл, либо T представляет собой



где Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n определены выше,

предпочтительно T представляет собой H или SR₁, где R₁ представляет собой алк, более предпочтительно метил,

R, R', одинаковые или различные, представляют собой H либо алкил, алк представляет собой линейный или разветвленный алкил, предпочтительно алк представляет собой -(CH₂)_q(CH₃)_p-, где p представляет собой целое число от 1 до 10, и q представляет собой целое число от 0 до 2; предпочтительно алк представляет собой -(CH₂)- или -C(CH₃)₂-,

или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты или гидратированные соли, либо полиморфные кристаллические структуры этих соединений, или их оптические изомеры, рацематы, диастереоизомеры или энантиомеры.

Предпочтительные соединения можно выбирать из следующих:

(2-метилсульфанилэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2H-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты; бис[(2-меркаптоэтил)амид(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2H-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-меркаптоэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксоноадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-метилдисульфанилэтил)амид(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксоноадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-метил-2-метилдисульфанилпропил)амид(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксоноадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-меркапто-2-метилпропил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксоноадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

или их фармацевтически приемлемых солей, гидратов или гидратированных солей, либо полиморфных кристаллических структур этих соединений, или их оптических изомеров, рацематов, диастереоизомеров или энантиомеров.

Для того чтобы шить производное со связывающим клетки средством, данное производное должно содержать фрагмент (сшивающую группу), который позволяет производным быть сшитыми со связывающим клетки средством через сочленение, такое как дисульфидная связь, сульфидная (иначе называемая в данном описании тиозфирной) связь, кислотолабильная группа, фотоллабильная группа, расщепляемая пептидазой группа и расщепляемая эстеразой группа. Производные получают таким образом, чтобы они содержали фрагмент, необходимый для сшивки производного лептомицина со связывающим клетки средством через, например, дисульфидную связь, тиозфирную связь, кислотолабильную группу, фотоллабильную группу, расщепляемую пептидазой группу и расщепляемую эстеразой группу. Для того чтобы дополнительно повысить растворимость в водных растворах, сшивающая группа может содержать полиэтиленгликолевый спейсер. Предпочтительно применяют сульфидное или дисульфидное сочленение, так как восстановительная среда клетки-мишени приводит к расщеплению сульфида или дисульфида и к высвобождению производных с сопутствующим возрастанием цитотоксичности.

Соединения по настоящему изобретению можно получать различными путями синтеза. Реагенты и исходные материалы являются коммерчески доступными, либо легко синтезируемыми с помощью методов, хорошо известных рядовым специалистам в данной области. Методы синтеза производных лептомицина, которые можно использовать для цитотоксических конъюгатов по настоящему изобретению, наряду с методами конъюгации указанных производных лептомицина со связывающими клетки средствами, такими как антитела, подробно описаны в европейской патентной заявке №062909486, содержание которой включено в данное описание посредством ссылки.

Аналоги СС-1065

Цитотоксическое средство, используемое в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению, может представлять собой СС-1065 или его производное.

СС-1065 является эффективным противоопухолевым антибиотиком, выделенным из среды культивирования *Streptomyces zelensis*. СС-1065 примерно в 1000 раз более эффективен *in vitro* по сравнению с обычно применяемыми противораковыми лекарственными средствами, такими как доксорубин, метотрексат и винкристин (В.К. Bhuyan et al., 1982, *Cancer Res.*, 42, 3532-3537). СС-1065 и его аналоги раскрыты в патентах США №6372738, 6340701, 5846545 и 5585499.

Цитотоксическая эффективность СС-1065 коррелировала с его алкилирующей активностью и его ДНК-связывающей или ДНК-интеркалирующей активностью. Эти две активности свойственны различным частям данной молекулы. Так, алкилирующая активность присуща циклопропапирролоиндольной (CPI) субъединице, а ДНК-связывающая активность свойственна двум пирролоиндольным субъединицам.

Хотя СС-1065 обладает определенными привлекательными свойствами в качестве цитотоксического средства, оно имеет ограничения в терапевтическом применении. Введение СС-1065 мышам вызывало отсроченную гепатотоксичность, приводящую к летальному исходу на 50 день после единичной внутривенной дозы, составляющей 12,5 мкг/кг (V.L. Reynolds et al., 1986, *J. Antibiotics*, XXIX: 319-334). Это привело к форсированным попыткам разработать аналоги, не вызывающие отсроченную токсичность, и был описан синтез более простых аналогов, смоделированных на основе СС-1065 (M.A. Warpehoski et al., 1988, *J. Med. Chem.*, 31: 590-603).

В другой серии аналогов фрагмент CPI был заменен циклопропабензиндольным (CBI) фрагментом (D.L. Boger et al., 1990, *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833, D.L. Boger et al., 1991, *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120). Эти соединения сохраняют высокую эффективность *in vitro* исходного лекарственного средства, но не приводят к отсроченной токсичности у мышей. Как и СС-1065, эти соединения являются алкилирующими средствами, которые связываются с малой бороздкой ДНК ковалентным образом, что приводит к гибели клетки. Однако клиническая экспертиза наиболее перспективных аналогов, адоцелезина и карцелезина, привела к разочаровывающим результатам (B.F. Foster et al., 1996, *Investigational New Drugs*, 13: 321-326; I. Wolff et al., 1996, *Clin. Cancer Res.*, 2: 1717-1723). Эти лекарственные средства обладали неудовлетворительным терапевтическим действием из-за своей высокой системной токсичности.

Терапевтическая эффективность аналогов СС-1065 может быть значительно улучшена изменением распределения *in vivo* посредством направленной доставки к месту опухоли, что приводит к меньшей токсичности для нецелевых тканей и, таким образом, снижению системной токсичности. Для достижения этой цели были описаны конъюгаты аналогов и производных СС-1065 со связывающими клетки средствами, которые специфически направлены против опухолевых клеток (патенты США №5475092, 5585499, 5846545). Эти конъюгаты обычно демонстрируют высокую целеспецифическую цитотоксичность *in vitro* и исключительную противоопухолевую активность у мышинных моделей ксенотрансплантатов человеческих опухолей (R.V. J. Chari et al., 1995, *Cancer Res.*, 55: 4079-4084).

Недавно были описаны пролекарства на основе аналогов СС-1065 с повышенной растворимостью в водной среде (европейская патентная заявка №062903794). В этих пролекарствах фенольная группа алкилирующей части молекулы защищена функциональной группой, что делает данное лекарственное средство стабильным при хранении в кислых водных растворах и придает лекарственному средству повышенную растворимость в воде по сравнению с незащищенным аналогом. Защитная группа легко расщепляется *in vivo* при физиологическом pH с получением соответствующего активного лекарственного средства. У пролекарств, описанных в EP 062903794, фенольный заместитель защищен в виде сульфоновой кислоты, содержащей фенилкарбамат, который заряжен при физиологическом pH и, таким образом, обладает повышенной растворимостью в воде. Для дальнейшего повышения растворимости в воде, при желании, можно вводить полиэтиленгликолевый спейсер в линкер между индолильной субъединицей и расщепляемой связью, такой как дисульфидная группа. Введение этого спейсера не влияет на эффективность лекарственного средства.

Методы синтеза аналогов СС-1065, которые можно использовать в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению, наряду с методами конъюгации аналогов со связывающими клетки средствами, такими как антитела, подробно описаны в EP 062903794 (содержание которого включено в данное описание посредством ссылки), патентах США №5475092, 5846545, 5585499, 6534660 и 6586618, а также в патентных заявках США №10/116053 и 10/265452.

Другие лекарственные средства

Такие лекарственные средства, как метотрексат, даунорубицин, доксорубицин, винкристин, винбластин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, калихимидин, тубулизин и аналоги тубулизина, дуокармицин и аналоги дуокармицина, доластатин и аналоги доластатина, также пригодны для получения конъюгатов по настоящему изобретению. Молекулы лекарственного средства могут быть также сшиты с молекулами антитела через молекулу промежуточного носителя, такого как сывороточный альбумин. Соединения доксорубицина и данорубицина, как описано, например, в патенте США №6630579, также могут быть полезными цитотоксическими средствами.

Терапевтическая композиция

Данное изобретение также относится к терапевтической композиции для лечения гиперпролиферативных заболеваний у млекопитающих, которая содержит терапевтически эффективное количество соединения по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения раковых заболеваний, включая (но не ограничиваясь ими) следующие: карциному, включая карциномы мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи, включая плоскоклеточную карциному; гемопоэтические опухоли лимфоидной линии дифференцировки, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта; гемопоэтические опухоли миелоидной линии дифференцировки, включая острые и хронические миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; а также другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоактантому, семиному, тиреофоликулярную карциному и тератокарциному, а также другие, которые еще предстоит определить, раковые заболевания, при которых главным образом экспрессируются EphA. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтические композиции по данному изобретению применяют для лечения рака легких, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, почек, поджелудочной железы, яичников, шейки матки и лимфатических органов, остеосаркомы, синовиальной карциномы, саркомы головы и шеи, глиомы, желудочных, печеночных и других карцином, при которых экспрессируются EphA. В частности, рак представляет собой метастатический рак. В другом варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция относится к другим заболеваниям, таким как, например, аутоиммунные заболевания, такие как системная волчанка, ревматоидный артрит и рассеянный склероз; отторжения трансплантата, такие как отторжение почечного трансплантата, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата легкого, отторжение сердечного трансплантата и отторжение трансплантата костного мозга; реакция "трансплантат против хозяина"; вирусные инфекции, такие как корь, ВИЧ, СПИД и тому подобные; и паразитарные инфекции, такие как лямблиоз, амебиаз, шистосомоз и

другие, как определит специалист в данной области.

По настоящему изобретению предлагают фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным.

Как используется в данном описании, понятие "фармацевтически приемлемые носители" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства и им подобные, которые являются физиологически совместимыми. Примеры соответствующих носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают одно или более из следующих: вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстроза, глицерин, этанол и им подобные, а также их сочетания. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические средства, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. В частности, характерные примеры подходящих носителей включают: (1) фосфатно-солевой буферный раствор на среде Дульбекко, pH~7,4, содержащий или не содержащий примерно от 1 до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% вес/объем хлорида натрия (NaCl)), и (3) 5% (вес/объем) декстрозу; и могут также содержать антиоксидант, такой как триптамин, а также стабилизирующее средство, такое как Tween 20.

Композиции в данном описании могут также содержать добавочное терапевтическое средство, если этого требует лечение конкретного заболевания. Предпочтительно, чтобы антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела по настоящему изобретению и дополнительное активное соединение обладали дополняющими друг друга активностями, которые не влияют неблагоприятно друг на друга. В предпочтительном варианте осуществления добавочное терапевтическое средство является антагонистом фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), тканевого фактора (TF), белка C, белка S, тромбоцитарного фактора роста (PDGF) или рецептора HER2.

Композиции по данному изобретению могут находиться в разных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, но предпочтительная форма зависит от намеченных способов введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме инъеклируемых или инфузируемых растворов. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, внутривнутрибрюшинный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления композиции по изобретению вводят внутривенно в виде болюсной инъекции или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их инъектируют внутримышечно, подкожно, интраартикулярно, внутрисуставно, внутрь опухоли, возле опухоли, в пораженную ткань или возле пораженной ткани для проявления как местных, так и системных эффектов.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать путем внесения антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела по настоящему изобретению в необходимом количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией путем микрофильтрации. В качестве растворителя или среды можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и им подобные, а также их сочетания. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические средства, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции могут также содержать адьюванты, в частности, увлажняющие, изотонирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие средства. Стерильные композиции для парентерального введения можно также получать в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять во время использования в стерильной воде или любой другой стерильной среде для инъекции.

Антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела по настоящему изобретению можно также вводить перорально. В качестве твердых композиций для перорального введения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, пакеты-саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент по данному изобретению смешивают в потоке аргона с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или силикагель. Эти композиции могут также содержать вещества, отличные от разбавителей, например, одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, краситель, оболочку (покрытая сахаром таблетка) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, увлажняющие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и используемого способа введения; они составляют обычно от 5 до 1000 мг в сутки перорально для взрослого при однократной дозе в пределах от 1 до 250 мг активного вещества. Как правило, подходящую дозировку подбирает врач в зависимости от возраста, веса и других факторов, специфических для субъекта, подвергающегося лечению.

Терапевтические методы применения

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования ак-

тивности рецептора EphA2 путем введения антитела, которое является антагонистом указанного рецептора EphA2, пациенту, который в этом нуждается. Терапевтически можно использовать любой тип антител, фрагментов антител или цитотоксических конъюгатов по изобретению. Таким образом, данное изобретение включает применение антагонистических анти-EphA2 антител, их фрагментов, или их цитотоксических конъюгатов в качестве лекарственных средств.

В предпочтительном варианте осуществления антитела, фрагменты антител или цитотоксические конъюгаты по данному изобретению применяют для лечения гиперпролиферативного заболевания у млекопитающего. В более предпочтительном варианте осуществления одну из раскрытых выше фармацевтических композиций, содержащую антитело, фрагмент антитела или цитотоксический конъюгат по изобретению, применяют для лечения гиперпролиферативного заболевания у млекопитающего. В одном варианте осуществления данное заболевание представляет собой рак. В частности, рак представляет собой метастатический рак. Антитела, фрагменты антител и цитотоксические конъюгаты по изобретению можно также использовать для лечения неоваскуляризации в указанной раковой опухоли.

Соответственно, фармацевтические композиции по данному изобретению являются полезными для лечения или профилактики различных видов рака, включая (но не ограничиваясь ими) следующие: карциному, включая карциномы мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи, включая плоскоклеточную карциному; гемопоэтические опухоли лимфоидной линии дифференцировки, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта; гемопоэтические опухоли миелоидной линии дифференцировки, включая острые и хронические миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; а также другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоактантому, семиному, тиреофоликулярную карциному и тератокарциному, а также другие, которые еще предстоит определить, раковые заболевания, при которых главным образом экспрессируются EphA. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой рак легких, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, почек, поджелудочной железы, матки, яичников, шейки матки и лимфатических органов, остеосаркому, синовиальную карциному, саркому головы и шеи, глиому, желудочную, печеночную и другие карциномы, при которых экспрессируются EphA. В другом варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция относится к другим заболеваниям, таким как, например, аутоиммунные заболевания, такие как системная волчанка, ревматоидный артрит и рассеянный склероз; отторжения трансплантата, такие как отторжение почечного трансплантата, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата легкого, отторжение сердечного трансплантата и отторжение трансплантата костного мозга; реакция "трансплантат против хозяина"; вирусные инфекции, такие как корь, ВИЧ, СПИД и тому подобные; а также паразитарные инфекции, такие как лямблиоз, амебиаз, шистосомоз и др., как определит рядовой специалист в данной области.

Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста выбранных клеточных популяций, включающему приведение в контакт клеток-мишеней, или ткани, содержащей клетки-мишени, с эффективным количеством антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела по настоящему изобретению, либо антитела, фрагмента антитела или терапевтического средства, содержащего цитотоксический конъюгат, либо в отдельности, либо в сочетании с другими цитотоксическими или терапевтическими средствами.

Способ ингибирования роста выбранных клеточных популяций может быть применен на практике *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Как используется в данном описании, "ингибирование роста" означает замедление роста клетки, снижение жизнеспособности клетки, вызывающее гибель клетки, лизис клетки и индукцию гибели клетки в течение либо короткого, либо длительного периода времени.

Примеры использования *in vitro* включают терапевтическую обработку аутогенного костного мозга перед его трансплантацией тому же пациенту с целью уничтожения пораженных болезнью или злокачественных клеток; терапевтическую обработку костного мозга перед его трансплантацией с целью уничтожения компетентных Т-клеток и предотвращения реакции "трансплантат-против-хозяина" (GVHD); терапевтическую обработку клеточных культур с целью уничтожения всех клеток, за исключением желательных вариантов, которые не экспрессируют целевой антиген; либо уничтожения вариантов, экспрессирующих нежелательный антиген.

Условия неклинического использования *in vitro* могут быть легко определены специалистом в данной области.

Примерами клинического *ex vivo* использования являются удаление опухолевых клеток или лимфоидных клеток из костного мозга перед аутологической трансплантацией при лечении рака или при лечении аутоиммунных заболеваний, либо удаление Т-клеток и других лимфоидных клеток из аутоген-

ных или аллогенных костного мозга или ткани перед трансплантацией для предотвращения реакции "трансплантат-против-хозяина" (GVHD). Терапевтическую обработку проводят следующим образом. Костный мозг отбирают у пациента или другого индивидуума и затем инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавлено цитотоксическое средство по данному изобретению. Диапазон концентраций составляет примерно от 10 мкМ до 1 пМ, в течение примерно от 30 мин до примерно 48 ч при примерно 37°C. Точные параметры концентрации и времени инкубации, то есть дозировку, может легко определить специалист в данной области. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и снова вводят пациенту путем внутривенной инфузии известными способами. При обстоятельствах, когда пациент получает другое лечение, такое как курс разрушающей химиотерапии или тотального облучения всего организма, между временем отбора костного мозга и реинфузией терапевтически обработанных клеток, обработанные клетки костного мозга хранят замороженными в жидком азоте, используя стандартное медицинское оборудование.

Для клинического *in vivo* использования антитело, эпитопсвязывающий фрагмент антитела или цитотоксический конъюгат по данному изобретению будет поставляться в виде растворов, которые проверены на стерильность и уровни эндотоксинов. Примерами подходящих протоколов введения цитотоксического конъюгата являются следующие. Конъюгаты вводят еженедельно в течение 4 недель в виде в/в болюсной инъекции каждую неделю. Болюсные дозы вводят в объеме от 50 до 100 мл изотонического раствора, к которому может быть добавлено от 5 до 10 мл человеческого сывороточного альбумина. Дозировки составят от 10 мкг до 100 мг за одно в/в введение (диапазон от 100 нг до 1 мг/кг в сутки). Более предпочтительно дозировки будут находиться в пределах от 50 мкг до 30 мг. Наиболее предпочтительно дозировки будут находиться в пределах от 1 до 20 мг. Через четыре недели лечения пациент может продолжать получать лечение на еженедельной основе. Конкретные клинические протоколы в отношении пути введения, эксципиентов, разбавителей, дозировок, расписания и так далее, могут быть определены специалистом в данной области в виде предписаний в зависимости от клинической ситуации.

Диагностика

Антитела или фрагменты антител по данному изобретению можно также использовать для обнаружения EphA2 в биологическом образце *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления анти-EphA2 по изобретению применяют для определения уровня EphA2 в ткани или в клетках, происходящих из данной ткани. В предпочтительном варианте осуществления данная ткань является пораженной болезнью тканью. В предпочтительном варианте осуществления способа данная ткань является опухолью или ее биопсией. В предпочтительном варианте осуществления способа ткань или ее биопсию сначала иссекают у пациента, а затем могут быть определены уровни EphA2 в данной ткани или биопсии иммуноанализом с антителами или фрагментами антител по изобретению. Ткань или ее биопсия может быть заморожена или фиксирована. Такой же способ можно применять для определения других свойств белка EphA2, таких как его уровень фосфорилирования по остаткам тирозина, уровни на клеточной поверхности или клеточная локализация.

Вышеописанный способ можно применять для диагностирования рака у субъекта, страдающего от рака, или у которого подозревают рак, при этом уровень EphA2, измеренный у указанного пациента, сравнивают с таковым у нормального контрольного субъекта или со стандартом. Указанный способ затем можно применять для определения, экспрессирует ли опухоль EphA2, и это может означать, что данная опухоль хорошо отреагирует на лечение антителами, фрагментами антител или конъюгатами антител по настоящему изобретению. Предпочтительно опухоль является раком легких, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, почек, поджелудочной железы, матки, яичников, шейки матки и лимфатических органов, остеосаркомой, синовиальной карциномой, саркомой, глиомой, желудочной, печеночной, головы и шеи, а также другими карциномами, при которых экспрессируются EphA2, и другими, которые еще предстоит определить, видами рака, при которых главным образом экспрессируются EphA2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к моноклональным антителам, гуманизированным антителам и их эпитопсвязывающим фрагментам, которые дополнительно метят для использования в исследованиях или диагностических применениях. В предпочтительных вариантах осуществления метка является радиоактивной меткой, флюорофором, хромофором, визуализирующим средством или металлическим ионом.

Также предлагают способ диагностики, при котором указанные меченые антитела или их эпитопсвязывающие фрагменты вводят субъекту с подозрением на раковое заболевание и измеряют или контролируют распределение метки в организме субъекта.

Набор

Настоящее изобретение также включает наборы, например, содержащие описанный цитотоксический конъюгат и инструкции по применению данного цитотоксического конъюгата для уничтожения конкретных типов клеток. Инструкции могут включать указания для применения цитотоксических конъюгатов *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Как правило, такой набор будет иметь отделение, содержащее цитотоксический конъюгат. Данный цитотоксический конъюгат может быть в лиофилизированной форме, жидкой форме или других формах,

модифицируемых так, чтобы быть включенными в набор. Набор может также содержать дополнительные элементы, необходимые для практического применения способа, описанного в инструкциях данного набора, такие как стерилизованный раствор для растворения лиофилизированного порошка, дополнительные средства для комбинирования с цитотоксическим конъюгатом перед введением пациенту и приспособления, облегчающие введение конъюгата пациенту.

Примеры

Пример 1.

Получение гибридом анти-EphA2 моноклональных антител

Четыре мыши BALB/c VAF иммунизировали трансфицированными EphA2 человека клетками 300-19, линией В-клеток-предшественников, происходящих из мышей BALB/c. Стабильно трансфицированные клетки, сверхэкспрессирующие антиген, получали трансфекцией клеток 300-19 кДНК полноразмерного человеческого EphA2 и селекцией клонов с высокой экспрессией с помощью проточной цитометрии. Клон 4-6, клон с высокой экспрессией человеческого рецептора EphA2 на поверхности клеток, был выбран в качестве иммуногена для иммунизации мышей и для скрининга гибридом с помощью антител. Клетки, трансфицированные EphA2, поддерживали в селекционной среде, содержащей G418 в конечной концентрации 1 мг/мл, и регулярно тестировали на экспрессию EphA2 с помощью коммерчески доступного антитела.

Мышам Balb/c инъецировали подкожно примерно 5×10^6 трансфицированных EphA2 клеток 300-19 в 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) на мышь. Инъекции выполняли каждые 2-3 недели по стандартным протоколам иммунизации компании ImmunoGen, Inc. За три дня до слияния клеток мышам проводили еще одну внутривенную бустер-инъекцию той же дозой антигена и в день слияния клеток умерщвляли для получения клеток селезенки согласно стандартным протоколам процедуры использования лабораторных животных.

Селезенку забирали у иммунизированной мыши в стерильных хирургических условиях и измельчали между двух стерильных и матированных предметных стекол, чтобы получить суспензию единичных клеток в среде RPMI-1640. Спленоциты осаждали и дважды промывали средой RPMI-1640 перед слиянием клеток. Клетки селезенки смешивали с клетками мышинной миеломы P3X63Ag8.653 (Kearney, J.F. et al., 1979. *J. Immunol.*, 123: 1548-1550) и проводили слияние, используя полиэтиленгликоль-1500 в качестве вещества, способствующего слиянию (Roche 783 641). После слияния клеток и центрифугирования клетки суспендировали в полной среде RPMI-1640 (200 мл), содержащей добавку гипоксантина-аминоптерин-тимидин (HAT) (Sigma H-0262), и высевали в десять 96-луночных плоскодонных планшетов (Coming-Costar 3596, 200 мкл клеточной суспензии на лунку). После инкубации при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 дней 100 мкл культурального супернатанта удаляли из каждой лунки планшета и заменяли равным объемом полной среды RPMI-1640, содержащей добавку гипоксантина-тимидин (HT) (Sigma H-0137). Инкубацию (в атмосфере 5% CO₂ при 37°C) продолжали до тех пор, пока клоны гибридом не вырастали в колонии, достаточно крупные для проведения скрининга с помощью антител.

На 10 день после слияния, когда количество гибридомных клеток в лунках увеличивалось до половинной конfluence, и супернатант изменил цвет на оранжевый, гибридомные супернатанты отбирали из гибридационных планшетов для скрининга антителами методом иммуноанализа. Для предварительного скрининга гибридомные супернатанты тестировали на клетках, трансфицированных EphA2, против родительских клеток 300-19 методом проточной цитометрии. Клетки окрашивали 50 мкл гибридомного супернатанта с последующей инкубацией в присутствии конъюгата флуоресцеина с антителами козы против мышинных IgG (H+L) и анализировали проточной цитометрией на приборе Becton Dickinson FACSCalibur или FACSArray. Гибридомные клоны с положительными результатами анализа на клетках, трансфицированных EphA2, но с отрицательными результатами на клетках 300-19, отбирали, наращивали, замораживали для хранения или субклонировали методом серийных разведений, чтобы добиться моноклональной популяции. Специфические антитела, секретируемые гибридомными клетками, изотипировали с помощью коммерчески доступных реагентов для изотипирования (Roche 1493027).

На основе данных проточной цитометрии, 29 гибридомных клонов, которые специфически реагировали с клетками, трансфицированными человеческим EphA2, но не с родительскими клетками 300-19, были идентифицированы и выбраны в результате иммунизации мышей человеческими антигенами EphA2.

Пример 2.

Характеристики связывания анти-EphA2 антител 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2

Специфическое связывание каждого из очищенных анти-EphA2 антител, 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11, было показано методом клеточной сортировки с возбуждением флуоресценции (FACS) с использованием клеток, сверхэкспрессирующих человеческий EphA2, и с использованием клеток, не экспрессирующих EphA2 (фиг. 1A, B и C). Инкубацию антитела 37.3D7 или антитела 37.1F5, или антитела 53.2H11 (60 нМ) в 100 мкл холодного FACS-буфера (1 мг/мл BSA в среде Дульбекко MEM) проводили с использованием клеток, сверхэкспрессирующих человеческий EphA2, и клеток, не экспрессирующих EphA2, в круглодонных 96-луночных планшетах на льду. Через 1 ч клетки осаждали центрифугированием и промывали холодным FACS-буфером, а затем инкубировали с конъюгатом антитела козы против IgG мыши-FITC

(100 мкл, 6 мкг/мл в FACS-буфере) на льду в течение 1 ч. Клетки затем осаждали, промывали и ресуспендировали в 200 мкл 1% раствора формальдегида в PBS. Образцы клеток затем анализировали на ридере FACSCalibur (BD Biosciences).

Был получен сильный сдвиг флуоресценции во время инкубации клеток, сверхэкспрессирующих человеческий EphA2, с антителом 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11, в отличие от незначительного сдвига при инкубации клеток, не экспрессирующих человеческий EphA2, с антителом 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11 (фиг. 1A, 1B и 1C), что свидетельствует о том, что антитела 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 избирательно связываются с человеческим EphA2. Положительно-контрольное анти-EphA2 антитело, B2D6 (Upstate), вызывало похожий сдвиг флуоресценции при инкубациях с клетками, сверхэкспрессирующими человеческий EphA2 (фиг. 1A). Сильный сдвиг флуоресценции также наблюдали при FACS-анализе с использованием 37.3D7 и человеческих раковых клеток, таких как человеческие MDA-MB-231 клетки рака молочной железы, человеческие HT-29 клетки рака толстой кишки, человеческие VxPC3 клетки рака поджелудочной железы, что свидетельствует о том, что антитело 37.3D7 связывается с человеческим EphA2 на поверхности человеческих опухолевых клеток (фиг. 2). Схожие данные были также получены с использованием антител 37.1F5 и 53.2H11 с линиями человеческих опухолевых клеток.

Относительные константы диссоциации (K_D) для связывания антител 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 с человеческим EphA2 на поверхности клеток определяли FACS-анализами связывания антитела в различных концентрациях с клетками, сверхэкспрессирующими человеческий EphA2, и человеческими MDA-MB-231 клетками рака молочной железы (фиг. 3). Значения K_D оценивали нелинейной регрессией для связывания по одному сайту. Из кривых связывания получали значения относительных K_D , составляющие 0,3 нМ для антитела 37.3D7, 0,07 нМ для антитела 37.1F5 и 0,14 нМ для антитела 53.2H11 (фиг. 3A, 3C и 3E).

С помощью того же экспериментального протокола были определены значения относительных K_D , составляющие 0,18 и 0,05 нМ, соответственно, для EphA2-N1 и EphA2-N2.

Сильный сдвиг флуоресценции был получен во время инкубации клеток, сверхэкспрессирующих EphA2 мыши или EphA2 крысы, с антителом 37.3D7 или антителом 53.2H11, в отличие от незначительного сдвига во время инкубации клеток, не экспрессирующих EphA2 мыши или EphA2 крысы, с антителом 37.3D7 или антителом 53.2H11 (фиг. 4), что свидетельствует о том, что антитела 37.3D7 и 53.2H11 связывают также EphA2 мыши и EphA2 крысы. Сильный сдвиг флуоресценции также наблюдали во время FACS-анализа с использованием антитела 37.3D7 или 37.1F5, или 53.2H11 и эпителиальных клеток обезьяны VERO (*Sercothecus aethiops*) (фиг. 5A), что свидетельствует о том, что 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 также связываются с EphA2 обезьяны. Кажущиеся значения K_D оценивали нелинейной регрессией для связывания по одному сайту. Из кривых связывания по результатам FACS-анализа получали значения K_D , составляющие 0,15 нМ для 37.3D7, 0,05 нМ для 37.1F5 и 0,07 нМ для 53.2H11 на клетках обезьяны (фиг. 5B, 5D и 5F).

Пример 3.

Ингибирование связывания эфрина A1 с клетками MDA-MB-231 антителами 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2

Связывание эфрина A1 с человеческими клетками MDA-MB-231 рака молочной железы ингибировалось антителами 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 (фиг. 6). Клетки MDA-MB-231 инкубировали в присутствии и в отсутствие 5 мкг/мл антитела 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11 в течение 2 ч с последующей инкубацией в присутствии 100 нг/мл биотинилированного эфрина A1 в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки дважды промывали бессывороточной средой для удаления несвязанного биотин-эфрина A1, а затем лизировали в 50 мМ буфере HEPES, pH 7,4, содержащем 1% NP-40 и ингибиторы протеаз. Планшеты для ELISA Immulon-2HB покрывали моноклональным анти-EphA2 антителом мыши (D7, Upstate) и использовали для захвата EphA2 и связанного биотин-эфрина A1 из лизата. Связывание покрывающего антитела с цитоплазматическим C-концевым доменом EphA2 не мешало связыванию биотин-эфрина A1 с внеклеточным доменом EphA2. Лунки промывали, инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена, вновь промывали и затем проявляли субстратом ABTS/H₂O₂. Ингибирование связывания эфрина A1 с клетками MDA-MB-231 антителами 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11 в концентрации 5 мкг/мл было в основном количественным; сигнал был практически равен фоновому сигналу ELISA, полученному при использовании контроля, где не задействован биотин-эфрин A1 (фиг. 6A, 6B и 6C).

И EphA2-N1, и EphA2-N2 были способны ингибировать связывание человеческого эфрина A1 с клетками MDA-MB-231 в той же степени, что и 37.3D7.

Пример 4.

Ингибирование опосредованной EphA2 клеточной передачи сигнала антителами 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2

Обработка человеческих клеток MDA-MB-231 рака молочной железы антителом 37.3D7 или 37.1F5 полностью ингибировала внутриклеточную передачу сигнала рецептором EphA2, о чем свидетельствовало ингибирование аутофосфорилирования рецептора EphA2 (фиг. 7A), а также ингибирование фосфорилирования его эффекторов в нисходящем направлении, таких как Akt (фиг. 7B). Обработка клеток CFAC-1 рака поджелудочной железы антителом 37.3D7 или антителом 53.2H11 полностью ингибировала

ла внутриклеточную передачу сигнала рецептором EphA2, о чем свидетельствовало ингибирование аутофосфорилирования рецептора EphA2 (фиг. 7С).

На фиг. 7А и 7С клетки MDA-MB-231 молочной железы или клетки CFPAC-1 поджелудочной железы выращивали на обычной среде (как предложено АТСС для каждой клеточной линии), содержащей сыворотку, в течение 3 дней, затем культивировали в бессывороточной среде в течение 12-14 ч. Истощенные в бессывороточной среде клетки обрабатывали антителом 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11 в концентрации 15 мкг/мл, либо контрольным IgG1, в течение 2 ч с последующей стимуляцией эфрином А1-Fc (R&D) в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин при 37°C. Затем клетки лизировали в ледяном лизисном буфере, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз (50 мМ буфер HEPES, pH 7,4, 1% NP-40, 1 мМ ортованадат натрия, 100 мМ фторид натрия, 10 мМ пиродифосфат натрия, 2,5 мМ EDTA, 10 мкМ леупептин, 5 мкМ пепстатин, 1 мМ PMSF, 5 мМ бензамидин и 5 мкг/мл апротинин). Лизаты подвергали иммунопреципитации с помощью анти-EphA2 антитела D7 (Upstate), присоединенного к бусам с белком А/Г. Иммунопреципитированный EphA2 разделяли в SDS-полиакриламидном геле и анализировали методом вестерн-блоттинга с моноклональным антителом 4G10 (Cell Signaling Technology), специфичным для остатков фосфотирозина. Чтобы оценить уровень белка EphA2 в каждом иммунопреципитированном образце, ту же самую мембрану подвергали повторному блоттингу с анти-EphA2 антителом D7 (Upstate). Использование контрольного антитела не выявило ингибирования стимулированного эфрином А1 аутофосфорилирования рецептора EphA2 (фиг. 7С). Напротив, полное ингибирование стимулированного эфрином А1 аутофосфорилирования рецептора EphA2 было получено при обработке антителом 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11 (фиг. 7А и 7С). Стимулированная эфрином А1 активация эффекторов в нисходящем направлении, таких как Akt, также была ингибирована в клетках MDA-MB-231 антителом 37.3D7 или 37.1F5, как показано методом вестерн-блоттинга лизатов с использованием поликлонального анти-фосфо-Ser⁴⁷³ Akt антитела кролика (Cell Signaling Technology) (фиг. 7В).

Антитела 37.3D7 и 53.2H11 сами по себе не стимулировали аутофосфорилирование EphA2 в человеческих клетках MDA-MB-231 рака молочной железы, в противоположность стимулирующему эффекту эфрина А1 на аутофосфорилирование EphA2 в клетках MDA-MB-231 (фиг. 8А и 8В). Сходные данные получены для антитела 37.1F5 с использованием клеток MDA-MB-231. На фиг. 8 клетки MDA-MB-231 выращивали на обычной среде, содержащей сыворотку, в течение 3 дней, затем культивировали в бессывороточной среде в течение 12-14 ч. Истощенные в бессывороточной среде клетки обрабатывали эфрином А1-Fc в концентрации 1 мкг/мл, либо антителом 37.3D7 или 53.2H11 в концентрации 15 мкг/мл в течение 10 мин. Клеточные лизаты подвергали иммунопреципитации с помощью анти-EphA2 антитела D7 (Upstate). После разделения в SDS-полиакриламидном геле блот исследовали с помощью анти-фосфотирозинового антитела 4G10 (Cell Signaling Technology) и анти-EphA2 антитела D7 (Upstate). Сходные результаты были получены на человеческих клетках MDA-MB-231 рака молочной железы как с EphA2-N1, так и с EphA2-N2, поскольку ни одно из данных антител не стимулирует аутофосфорилирование EphA2 само по себе, в то время как каждое из них предотвращает эфрин А1-зависимое фосфорилирование рецептора EphA2.

Следовательно, антитела 37.3D7, 37.1F5, 53.2H11, EphA2-N1 и EphA2-N2 являются уникальными среди всех известных анти-EphA2 антител по своей способности ингибировать стимулированную эфрином А1 внутриклеточную передачу сигнала EphA2.

Пример 5.

Ингибирование стимулированных сывороткой роста и выживаемости человеческих опухолевых клеток антителами 37.3D7 и 53.2H11

Некоторые линии человеческих опухолевых клеток тестировали в бессывороточных условиях на зависимость их роста и выживаемости от сыворотки в присутствии антитела 37.3D7 или 53.2H11. Приблизительно по 3000 клеток/лунку высаживали на 96-луночный планшет в обычной среде (как предложено АТСС для каждой клеточной линии), содержащей сыворотку, которую заменяли на бессывороточную среду на следующий день. После одного дня роста в бессывороточной среде клетки инкубировали с 15 мкг/мл антитела 37.3D7 или антитела 53.2H11 или контрольного IgG1, после чего добавляли сыворотку до конечной концентрации, составляющей 1 или 1,5%. Затем клеткам давали возможность расти в течение еще 3 дней. Затем добавляли раствор МТТ [3-(4,5)диметилтиазол-2-ил-2,3-дифенилтетразолия бромид, 25 мкл 5 мг/мл раствора в PBS], и клетки вновь помещали в инкубатор на 2-3 ч. Затем среду удаляли и заменяли на 100 мкл DMSO, перемешивали и измеряли поглощение в планшете при 545 нм. Некоторые линии человеческих опухолевых клеток демонстрировали ответную реакцию роста и выживаемости на добавление сыворотки, которая существенно ингибировалась антителом 37.3D7 или 53.2H11. В качестве примеров представлены результаты по линиям опухолевых клеток толстой кишки, HT-29, LoVo; линии опухолевых клеток поджелудочной железы, CFPAC-2, VxPC3 и меланомы UACC-257.

Антитело 37.3D7 сильно ингибировало стимулированные сывороткой рост и выживаемость человеческих клеток HT-29 рака толстой кишки (фиг. 9А). В другом эксперименте антитело 37.3D7 сильно ингибировало стимулированные сывороткой рост и выживаемость человеческих клеток VxPC3 рака поджелудочной железы дозозависимым образом со значением IC₅₀, равным 4 нМ (фиг. 10А). Кроме того, антитело 37.3D7 или 53.2H11 сильно ингибировало стимулированные сывороткой рост и выживаемость че-

ловеческих клеток LoVo рака толстой кишки (фиг. 9B), человеческих клеток CFPAC-1 рака поджелудочной железы (фиг. 9C) и раковых клеток UACC-257 меланомы (фиг. 9D), а антитело 53.2H11 ингибировало стимулированные сывороткой или EGF рост и выживаемость клеток LoVo дозозависимым образом со значением IC_{50} , равным 2 нМ (фиг. 10B и 10C). На фиг. 10 значения OD_{545} для обработанных 0% сыворотки образцов было принято за 100% ингибирования, а 0% ингибирования было установлено с помощью образцов, обработанных 1,5% сывороткой или 10 нг/мл EGF. Ни одно из ранее описанных анти-EphA2 антител не обладало ингибиторными активностями в отношении зависимого от "якорной" подложки (монослойного) роста человеческих опухолевых клеток. Следовательно, антитела 37.3D7 и 53.2H11 являются уникальными по их способности ингибировать зависимый от "якорной" подложки рост (монослойный рост) человеческих опухолевых клеток.

Пример 6.

Ингибирование опосредованной VEGF клеточной передачи сигнала и стимулированных VEGF роста и выживаемости эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) антителом 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11

Сильный сдвиг флуоресценции был получен FACS-анализом после инкубации клеток HUVEC с антителом 37.3D7, 37.1F5 или 53.2H11, что указывает на связывание антител 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 с рецепторами EphA2, экспрессированными на клетках HUVEC. Кажущиеся константы диссоциации (K_D) для связывания антител 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 с EphA2 на поверхности клеток были определены из кривых связывания, построенных с помощью FACS-анализа связывания, проведенного при нескольких концентрациях, и представленных на фиг. 11. Значение $K_D=0,3$ нМ для антитела 37.3D7 было оценено нелинейной регрессией для связывания по одному сайту (фиг. 11), которое сходно со значением K_D связывания антитела 37.3D7 с человеческими раковыми клетками. Значение $K_D=0,01$ нМ для антитела 37.1F5 и значение $K_D=0,06$ нМ для антитела 53.2H11 были получены аналогично. Это означает, что антитела 37.3D7, 37.1F5 и 53.2H11 специфически связываются с клетками HUVEC через рецептор EphA2.

Антитело 37.3D7 сильно ингибировало индуцированные VEGF рост и выживаемость HUVEC. Данная активность такая же или лучше, чем у Авастина[®], анти-VEGF блокирующего антитела (Genentech) (фиг. 12). Агонистическое анти-EphA2 антитело не ингибировало индуцированные VEGF рост и выживаемость HUVEC (фиг. 12). На фиг. 12 клетки HUVEC выращивали на среде EBM-2 с добавлением сыворотки и эндотелиально-клеточных (EC) добавок (Clonetics) в течение 3 дней. Клетки культивировали в бессывороточной среде плюс EC ростовые добавки без VEGF в течение 12-14 ч. После сывороточного истощения клетки стимулировали 5 нг/мл VEGF плюс 0,4% сыворотки в присутствии или в отсутствие указанных антител (100 мкг/мл). Эффекты антител на индуцированные VEGF рост и выживаемость клеток HUVEC определяли через 3 дня после добавления антител и VEGF с помощью анализа МТТ, как описано в примере 5. Процент ингибирования антителами опосредованных VEGF роста и выживаемости показан на фиг. 12. Значения OD_{545} для обработанных контрольной средой образцов были приняты за 0% ингибирования, а 100% ингибирования было установлено с помощью образцов без VEGF.

Такая обработка клеток HUVEC антителом 37.3D7 ингибирует внутриклеточную передачу сигнала рецептором EphA2, что было показано измерением ингибирования фосфорилирования его эффекторов в нисходящем направлении, таких как Akt.

Данное ингибирование сходно с таковым для Авастина[®], анти-VEGF блокирующего антитела (Genentech) (фиг. 13). Агонистическое анти-EphA2 антитело не ингибировало индуцированное VEGF фосфорилирование Akt в клетках HUVEC. На фиг. 13 клетки HUVEC истощали в течение 12-14 ч на бессывороточной среде плюс EC добавки без VEGF. Клетки обрабатывали антителами (20 мкг/мл) в течение 1 ч перед добавлением VEGF (100 нг/мл). Клетки лизировали 15 мин после добавления VEGF, и иммуноблоты изучали с помощью указанных антител.

Пример 7.

Подавление роста ксенотрансплантата HT-29 рака толстой кишки человека у мышей антителом 37.3D7 (фиг. 14)

Ксенотрансплантаты HT-29 рака толстой кишки человека приживляли мышам SCID подкожной инъекцией 2×10^6 клеток HT-29. Когда у мышей обнаруживали пальпируемые (50 мм^3) HT-29 ксенотрансплантатные опухоли, их подвергали воздействию антитела 37.3D7 или контрольного антитела (IgG1) (1 мг/мышь, в/в, дважды в неделю) или одного PBS (100 мкл/мышь, в/в, дважды в неделю). Рост опухолей существенно замедлялся при воздействии антителом 37.3D7, по сравнению с воздействием контрольным антителом или одним PBS. Никакой токсичности антитела 37.3D7 не наблюдали, судя по измерениям веса мышей.

Пример 8.

Ингибирование метастаза начальной MDA-MB-231 опухоли молочной железы анти-EphA2 антителом hu53.2H11

Противоопухолевую активность анти-EphA2 антитела hu532H11 оценивали при однократном уровне дозы против начальной MDA-MB-231 опухоли молочной железы, имплантированной подкожно самкам мышей SCID. Также исследовали действие этого антитела на инвазию опухоли MDA-MB-231 в по-

верхностных аксиальных и паховых лимфатических узлах. Для этого hu532H11 вводили в дозе 40 мг/кг/введение внутривенно на 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 и 26 дни после имплантации опухоли. Контрольную группу оставляли без воздействия.

Для оценки противоопухолевой активности hu532H11, животных ежедневно взвешивали, и опухоли измеряли 2-3 раза еженедельно штангенциркулем. Вес опухолей рассчитывали с помощью формулы масса (мг) = [длина (мм) × ширина (мм)²]/2. Противоопухолевую активность оценивали на основании 3 критериев 1) с учетом Т/С, определяемого как среднее значение веса опухоли (мг) обработанной группы, деленное на среднее значение веса опухоли необработанного контроля; 2) определение задержки роста опухоли (Т-С), где Т определяется как среднее время в днях, необходимое для достижения опухолью в обработанной группе 750 мг, а С представляет собой среднее время для достижения опухолью в контрольной группе такого же размера, и 3) уничтожение опухолевых клеток, определяемое как \log_{10} уничтоженных клеток (в совокупности) = [значение Т-С в днях]/(Td × 3,32). Т-С определено выше, и Td представляет собой время в днях удвоения объема опухоли для контрольных опухолей, которое оценивается из прямой линии наилучшего соответствия на логарифмически-линейном графике роста опухолей контрольной группы в экспоненциальной фазе роста (диапазон 100-1000 мг).

В параллельном исследовании животных подвергали воздействию, как указано ранее, а на 28 день после имплантации опухоли всех мышей умерщвляли, и собирали подмышечные и паховые лимфатические узлы (средний размер опухоли в контрольной группе = 1558 мг). Для специфической идентификации опухолевых клеток MDA-MB-231 в лимфатических узлах иммунохимическим окрашиванием использовали человеческое антитело Ki67. Рассчитывали площадь поверхности метастазов в лимфатических узлах (среднее по 2 гистологическим срезам) как S = площадь поверхности человеческих Ki67 × 100/площадь поверхности лимфатического узла.

Эффективность действия на первичную опухоль

hu532H11 хорошо переносимы при 40 мг/кг/введение (суммарная доза 320 мг/кг) при изменении веса тела +8,9% на 27 день. Такая доза замедляет опухолевый рост первичной опухоли (Т/С = 27% и 1,0 log уничтоженных клеток в совокупности), даже если данная опухоль просочилась в процессе терапии.

Противометастатическая активность hu532H11 вызывает снижение поверхности метастазов (> 50%) как в подмышечных, так и в паховых лимфатических узлах.

В заключение необходимо отметить, что у мышей, несущих опухоль молочной железы MDA-MB-231, hu532H11 замедляет рост первичной опухоли, подвергнутой воздействию на ранней стадии развития опухоли (Т/С = 27% и 1,0 log уничтоженных клеток в совокупности), и уменьшает поверхность метастазов (> 50%) как в подмышечных, так и в паховых лимфатических узлах.

В другом исследовании активность анти-EphA2 антитела могла быть оценена на модели печеночного "метастаза" человеческих клеток HT29 рака толстой кишки. Мышиное анти-EphA2 антитело 53.2H11 вводили в/в дважды в неделю, начиная с 4 дня после внутриселезеночной имплантации клеток HT29 самкам мышей SCID (n=20 мышей на группу для не несущих опухоль животных (NTBA), подвергнутых обработке и контрольных). На 50 день, 3 дня после 13-го введения анти-EphA2, мышей подвергали некропсии, и их селезенку и печень взвешивали для оценки опухолевой массы либо по месту первичной опухоли (селезенка), либо по месту метастаза (печень). Также оценивали количество метастазов. Данные анализировали статистическими методами, известными специалисту в данной области.

Воздействие анти-EphA2 при 40 мг/кг/инъекцию (суммарная доза 520 мг/кг) хорошо переносимо.

Вес первичной опухоли (селезенка): наблюдали значительную разницу в весе селезенки между NTBA и мышами с контрольной имплантацией, в последнем случае вес был больше. Не существовало никаких значимых различий между весом селезенки мышей с контрольной имплантацией и таковым для мышей, подвергнутых воздействию анти-EphA2.

Вес метастазов (печень): вес печени мышей с контрольной имплантацией был значительно больше, чем вес печени у NTBA; с другой стороны, он был значительно меньше у мышей, обработанных анти-EphA2, чем у мышей с контрольной имплантацией.

Число печеночных метастазов: никаких статистических различий не было обнаружено между мышами с контрольной имплантацией и подвергнутыми воздействию анти-EphA2.

В заключение необходимо отметить, что внутриселезеночная имплантация человеческой аденокарциномы толстой кишки HT-29 в значительной степени вызывает увеличение веса печени из-за метастатической опухолевой массы. Воздействие анти-EphA2 способно существенно снизить метастатическую опухолевую массу, как наблюдали по уменьшению веса печени мышей с имплантацией, без влияния на число метастазов, насчитываемых в печени.

Пример 9.

Клонирование и секвенирование легкой и тяжелой цепей антитела 37.1F5

Получение РНК из гибридомных клеток, продуцирующих антитело 37.1F5

Препараты суммарной РНК получали из 5×10^6 гибридомных клеток, продуцирующих антитело 37.1F5, с помощью набора "RNeasy miniprep kit" фирмы Qiagen. Кратко, 5×10^6 клеток осаждали и ресуспендировали в 350 мкл буфера RLT (содержащего 1% β-меркаптоэтанол). Суспензию гомогенизировали

пропусканием ее через иглу калибра 21,5 и шприц примерно 10-20 раз или до тех пор, пока она не перестанет быть вязкой. Добавляли этанол (350 мкл 70% водного этанола) к гомогенату, который хорошо перемешивали. Раствор переносили в спин-колонку, помещали в 2-мл сборную пробирку и центрифугировали при $>8000 \times g$ в течение 15 с. Колонку промывали дважды 500 мкл буфера RPE, затем переносили в новую пробирку и элюировали 30 мкл свободной от РНКаз воды при 1-минутном центрифугировании. Элюат (30 мкл) вновь помещали на колонку для второго 1-минутного элюиционного центрифугирования. Аликвоту 30 мкл элюата разбавляли водой и использовали для измерения УФ поглощения при 260 нм для количественного определения РНК.

Получение кДНК реакцией с обратной транскриптазой (RT)

кДНК варибельной области антитела 37.1F5 создавали из суммарной РНК с помощью набора "SuperscriptII kit" фирмы Invitrogen. Протоколам набора следовали точно, используя вплоть до 5 мкг суммарной РНК из мини-препаратов, полученных с помощью набора Qiaeasy. Кратко, РНК, 1 мкл случайных праймеров и 1 мкл смеси dNTP доводили до 12 мкл свободной от РНКаз стерильной дистиллированной водой и инкубировали при 65°C в течение 5 мин. Затем смесь помещали на лед по меньшей мере на 1 мин. Затем добавляли 4 мкл 5× реакционного буфера, 2 мкл 0,1 М DTT и 1 мкл RNaseOUT, и смесь инкубировали при 25°C в течение 2 мин в термоциклере MJ Research. Термоциклер останавливали так, чтобы можно было добавить 1 мкл ферментов из набора SuperscriptII, а затем запускали повторно на дополнительные 10 мин при 25°C перед сдвигом до 55°C в течение 50 мин. Реакционную смесь подвергали тепловой инактивации нагреванием до 70°C в течение 15 мин, и РНК удаляли добавлением 1 мкл РНКазы H и инкубацией при 37°C в течение 20 мин.

Вырожденные реакции ПЦР

Данная методика для вырожденной реакции ПЦР первого цикла на кДНК, происходящей из гибридомных клеток, основана на способах, описанных у Wang et al. (2000, J Immunol Methods., 233(1-2): 167-77) и Co et al. (1992, J Immunol., 148(4): 1149-54). Праймеры для этого цикла (табл. 2) содержат сайты рестрикции для облегчения клонирования в плазмиды pBluescriptII.

Компоненты реакции ПЦР (табл. 3) смешивали на льду в тонкостенных пробирках для ПЦР, а затем переносили в термоциклер MJ Research, заранее нагретый и оставленный при 94°C.

Реакции проводили с помощью программы, взятой от Wang et al., (2000, J Immunol Methods., 233(1-2): 167-77), которая приведена ниже.

Название: Wang45

- 1) 94°C 3:00 мин;
- 2) 94°C 0:15 с;
- 3) 4 5°C 1:00 мин;
- 4) 72°C 2:00 мин;
- 5) Goto 2 29 раз;
- 6) 72°C 6:00 мин;
- 7) 4°C постоянно;
- 8) конец.

Затем реакционные смеси ПЦР разгоняли в геле из 1% легкоплавкой агарозы, полосы от 300 до 400 п.о. вырезали, очищали с помощью мини-колонок Zymo DNA и посылали в фирму Agencourt biosciences для секвенирования. Соответствующие 5' и 3' ПЦР-праймеры использовали в качестве праймеров секвенирования для создания кДНК варибельной области 37.1F5 с двух направлений.

Клонирование 5'-концевой последовательности

Поскольку вырожденные праймеры, использованные для клонирования последовательностей кДНК варибельной области легкой цепи и тяжелой цепи 37.1F5, изменяют 5'-концевые последовательности, необходимы были дополнительные усилия по секвенированию для расшифровки полных последовательностей. Предварительную последовательность кДНК, полученную вышеописанными способами, применяли для поиска на сайте NCBI IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) мышинных гаметических последовательностей, от которых произошла последовательность 37.1F5. Были разработаны ПЦР-праймеры (табл. 4) для отжига лидерной последовательности данного мышинного антитела так, чтобы новая реакция ПЦР могла привести к созданию кДНК полной варибельной области, не измененной ПЦР-праймерами. Реакции ПЦР, очистки полос и секвенирование проводили, как описано выше. Гаметические последовательности, из которых предположительно произошли последовательности легкой цепи и тяжелой цепи mu37.1F5, находятся в открытом доступе в Genbank под входящими номерами MUSIGKVR3 и AF303839, соответственно.

Анализ пептидов для подтверждения последовательности

Информацию о последовательности кДНК для варибельной области объединяли с гаметической последовательностью константной области для получения последовательностей кДНК полноразмерных антител. Затем рассчитывали молекулярные массы тяжелой цепи и легкой цепи и сравнивали с молекулярными массами, полученными методами ЖХ/МС анализов мышинного антитела 37.1F5.

В табл. 5 приведены массы, рассчитанные на основании последовательностей кДНК для легкой це-

пи и тяжелой цепи 37.1F5, вместе со значениями, измеренными методами ЖХ/МС. Измерения молекулярных масс находятся в соответствии с последовательностями кДНК как для легкой, так и для тяжелой цепи 37.1F5.

В основном такой же способ использовали для клонирования легкой и тяжелой цепей 37.3D7 и 53.2H11. Входящие номера в Genbank для гаметических последовательностей, из которых, очевидно, произошли легкая цепь и тяжелая цепь 37.3D7, являются, соответственно, MMU231217 и AF303868. Для 53.2H11 они являются, соответственно, MMU231196 и AF303833; для EphA2-N1, K02161 и J00488, соответственно; и для EphA2-N2, AJ231222 и J00488, соответственно.

Пример 10.

Ингибирование роста экспрессирующих EphA2 опухолевых клеток гуманизированными-37.3D7-SPDB-DM4 и гуманизированными-53.2H11-SPDB-DM4

Гуманизированные 37.3D7 и гуманизированные 53.2H11 антитела конъюгировали с L-DM4 N²-ацетил-N²-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)мейтанзином при помощи линкера SPDB (N-гидроксисукцинимидный эфир 4-[2-пиридилдитио]масляной кислоты). Кратко, антитело модифицировали при концентрации 8 мг/мл с 5,5- или 6,5-кратным молярным избытком SPDB для hu53.2H11 и hu37.3D7, соответственно. Реакцию проводили в буфере А (50 мМ КР/50 мМ NaCl/2 мМ EDTA, pH 6,5, 95% об./об.) с EtOH (5% об./об.) в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем модифицированное антитело очищали на колонке для обессоливания с Sephadex G25 в буфере А. Далее проводили реакцию модифицированного антитела с 1,7-кратным молярным избытком DM4 над линкером SPDB. Реакцию проводили при концентрации 2,5 мг/мл антитела в буфере А (97% об./об.) и DMA (диметилацетамид, 3% об./об.) при комнатной температуре в течение 20 ч. Конъюгат очищали на колонке для обессоливания с Sephadex G25 с помощью 10 мМ гистидина, 130 мМ глицина, 5% сахарозы, pH 5,5. Отношение лекарственного средства к антителу составило 4,0 для hu37.3D7-SPDB-DM4 и 3,1 для hu53.2H11-SPDB-DM4.

Эффекты hu37.3D7-SPDB-DM4 и hu53.2H11-SPDB-DM4 на рост экспрессирующих EphA2 опухолевых клеток были сначала протестированы в *in vitro* анализе клеточной пролиферации с WST-8 ((2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфопенил)-2Н-тетразолия однонатриевая соль) (каталожный № SK04-11, Dojindo Molecular Technologies, Inc). Тестировали несколько опухолевых клеточных линий человека. Приблизительно 2000 клеток/лунку высаживали в 96-луночный планшет в обычной среде (как предложено ATCC для каждой клеточной линии), содержащей 10% сыворотку, в присутствии hu37.3D7-SPDB-DM4 или hu53.2H11-SPDB-DM4 в различных концентрациях. Затем клетки оставляли расти в течение 5 дней. Затем добавляли раствор WST-8 [20 мкл раствора], и клетки вновь помещали в инкубатор на 2-3 ч. Поглощение на планшете измеряли при 450 и 650 нм. В экспериментах использовали две контрольные группы. 0% выживаемости соответствует контролю из одной только среды. 100% выживаемости соответствует контролю из одних только клеток. Для анализа данных значения A650 нм (длина волны базовой линии) предварительно вычитали из соответствующих значений A450 нм. Затем значения A450 нм для каждого образца нормализовали вычитанием значений A450 нм для контроля нулевого уровня (только среда). Выживаемость фракций рассчитывали путем деления нормализованных значений A450 образцов на нормализованные значения A450 контроля (только клетки) (100% выживаемости-0% выживаемости). Значения log[AT-DM4] откладывали по оси абсцисс, а выживаемость фракций откладывали по оси ординат.

Hu37.3D7-SPDB-DM4 и hu53.2H11-SPDB-DM4 существенно ингибировали рост экспрессирующих EphA2 человеческих опухолевых клеток, включая клетки PC3 опухоли предстательной железы, клетки MDA-MDA-MB-231 опухоли молочной железы, клетки WM-115 меланомы, клетки A375 меланомы и клетки LoVo опухоли толстой кишки. В качестве примера приведены результаты, полученные на клетках PC3 опухоли предстательной железы. Hu37.3D7-SPDB-DM4 или hu53.2H11-SPDB-DM4 сильно ингибировали рост клеток PC3 дозозависимым образом со сходными значениями IC₅₀, составляющими 0,02 нМ (фиг. 15А и 15В). Активность конъюгатов коррелировала с уровнями экспрессии EphA2. Требовалось более чем 50-кратное превышение концентрации hu37.3D7-SPDB-DM4 или hu53.2H11-SPDB-DM4 для ингибирования роста клеток SK-Mel28 (значения IC₅₀: 1,3 нМ и >5 нМ, соответственно, фиг. 15А и 15В), которые экспрессировали почти не детектируемый уровень EphA2 на поверхности клеток (определено методом FACS, данные не представлены) (фиг. 15А и 15В). Следовательно, результаты *in vitro* анализов ингибирования роста продемонстрировали способность конъюгатов антагонистического анти-EphA2 антитела специфически ингибировать рост экспрессирующих EphA2 линий опухолевых клеток.

Были протестированы эффекты hu37.3D7-SPDB-DM4 и hu53.2H11-SPDB-DM4 на рост экспрессирующих EphA2 ксенотрансплантатов опухолей. В качестве примера приведено исследование на модели ксенотрансплантата опухоли молочной железы MDA-MB-231. Ксенотрансплантаты рака молочной железы человека MDA-MB-231 приживляли 5-недельным самкам мышей CB17 SCID подкожной инъекцией 1×10⁷ клеток MDA-MB-231. Когда ксенотрансплантаты опухолей MDA-MB-231 приживлялись (средние размеры составляли 83 мм³), мышей подвергали воздействию однократной внутривенной инъекцией hu3D7-SPDB-DM4, или hu2H11-SPDB-DM4 или PBS. Дозы антител составляли 15 мг/кг массы тела мыши, 7,5 мг/кг массы тела мыши и 3,25 мг/кг массы тела мыши. Рост опухолей MDA-MB-231 полностью ингибировался конъюгатами как с hu3D7-SPDB-DM4, так и с hu2H11-SPDB-DM4 антителом при всех

протестированных концентрациях, за исключением концентрации 3,25 мг/кг для hu2H11-SPDB-DM4, вызвавшей заметное замедление роста опухолевых клеток относительно PBS-контроля (фиг. 16А и 16В). Средние объемы опухолей в каждой группе (6 мышей на группу) представлены на фиг. 16А и В. Таким образом, как hu3D7-SPDB-DM4, так и hu2H11-SPDB-DM4 обладают сильными ингибиторными активностями в отношении роста экспрессирующих EphA2 опухолей *in vivo*. Никакой токсичности обоих конъюгатов с антителом не наблюдали, судя по измерениям массы тела.

Таблица 1А. Поверхностные остатки каркаса легкой цепи mu37.3D7 и соответствующие остатки на тех же позициях по Kabat в антителе 28E4 человека. Остатки, которые отличаются и вследствие этого изменены в антителе hu37.3D7, находятся в серых ячейках (1, 10, 15, 100)

Поверхностные остатки каркаса легкой цепи mu37.3D7 и соответствующие остатки в антителе 28E4 человека		
позиция по Kabat	mu37.3D7	28E4
1	Q	E
3	V	V
5	T	T
9	A	A
10	I	T
15	I	P
18	R	R
40	P	P
41	G	G
57	G	G
60	A	A
67	S	S
80	S	S
81	E	E
100	S	G
107	K	K
108	R	R

Таблица 1В. Поверхностные остатки каркаса тяжелой цепи mu37.3D7 и соответствующие остатки на тех же позициях по Kabat в антителе 28E4 человека. Остатки, которые отличаются и вследствие этого изменены в антителе hu37.3D7, находятся в серых ячейках (5, 9, 11, 13, 19, 28, 61, 64, 65, 74, 75). Остатки, отмеченные звездочкой (*), представляют собой результат обратной мутации к остатку mu37.3D7 в одном или более вариантах hu37.3D7

Поверхностные остатки каркаса тяжелой цепи mu37.3D7 и соответствующие остатки в антителе 28E4 человека		
позиция по Kabat	mu37.3D7	28E4
1	Q	Q
3	Q	Q
5	Q	V
9	S	A
11	L	V
13	R	K
14	P	P
15	G	G
19	Q	K
23	K	K
28*	S*	N*
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	E	Q

62	K	K
64	M	Q
65	N	G
73	T	T
74*	Y*	S*
75	S	T
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
105	Q	Q
112	S	S

Таблица 2. Праймеры, используемые для вырожденных реакций ПЦР, основаны на тех, что приведены у Wang et al., 2000, за исключением HindKL (SEQ ID NO:58), взятого из Co et al., 1992. Смешанные основания обозначены следующим образом: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g, W=A+T, V= A+C+G

Праймер	Последовательность
BamIlg1 (SEQ ID NO:53)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC
IgG2Abam (SEQ ID NO:54)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO:55)	CTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO:56)	CTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
Sac1MK (SEQ ID NO:57)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO:58)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC

Таблица 3. Реакционные смеси для ПЦР легкой и тяжелой цепи для клонирования последовательностей кДНК варибельной области 37.1F5

Реакционная смесь легкой цепи	Реакционная смесь тяжелой цепи
5 мкл 10X реакционного буфера ПЦР (Roche)	5 мкл 10X реакционного буфера ПЦР (Roche)
4 мкл 10 мМ смеси dNTP (2,5 мМ каждый)	4 мкл 10 мМ смеси dNTP (2,5 мМ каждый)
2 мкл матрицы (OT реакция)	2 мкл матрицы (OT реакция)
5 мкл 10 мкМ левого праймера Sac1MK	2,5 мкл 10 мкМ левого праймера EcoMH1
5 мкл 10 мкМ правого праймера HindKL	2,5 мкл 10 мкМ левого праймера EcoMH2
5 мкл ДМСО	5 мкл 10 мкМ правого праймера BamIlg1
0,5 мкл Taq полимеразы (Roche)	5 мкл ДМСО
23,5 мкл стерильной дистиллированной H ₂ O	0,5 мкл Taq полимеразы (Roche)
	23,5 мкл стерильной дистиллированной H ₂ O
всего 50 мкл	всего 50 мкл

Таблица 4. Праймеры 5'-концевой мышиной лидерной последовательности, используемые для второго цикла реакций ПЦР 37.1F5. 3'-концевые праймеры идентичны тем, которые используют в первом цикле реакций, так как они служат затравкой соответствующих последовательностей константных областей

Праймер	Последовательность
Легкая цепь 38SB13 LC лидерная (SEQ ID NO:59)	GACAGACACACTCCTGCTATGGG
Тяжелая цепь 5F85 HC лидерная (SEQ ID NO:60)	GCAGAATTCATGGGATGGAGCYGGATCTTTCT

Таблица 5. Рассчитанные на основе кДНК и измеренные при помощи ЖХ/МС молекулярные массы легкой и тяжелой цепей мышинового антитела 37.1F5

	Легкая цепь			Тяжелая цепь		
	кДНК	ЖХ/МС	разница	кДНК	ЖХ/МС	разница
37.1F5	24031 Да	24029 Да	2 Да	49316 Да	49333 Да	17 Да

Список последовательностей

<110> SANOFI-AVENTIS
 <120> АНТАГОНИСТИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА
 <130> FR2006030 PCT
 <150> EP 06291160.7
 <151> 2006-07-18
 <160> 80
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 1
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 2
 Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Met
 1 5 10 15
 Asn
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 3
 Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 4
 Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 6

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Gln Phe Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 7

Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 8

Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 9

Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 10

020324

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13

Ala Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 14

Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Glu
 1 5 10 15

Asp

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 15

Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 17

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 18

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 363
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 19
 cag gtc caa ctg caa caa cct ggg tct gaa ctg gtg agg cct gga gct 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg cag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac tca ttc acc agc tac 96
 Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg atg cac tgg gtg aga cag agg cct gga caa ggc ctt caa tgg att 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 gga aat att tat cct ggt act ggt aat act aat tac gat gag aaa ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60
 atg aac aag gcc aca ctg act gta gac aca tat tcc agc aca acc tac 240
 Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

020324

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga tgg ggg tta gta cgg tat ttc ttt gca atg gac tac tgg ggt 336
Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
50 55 60

Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 354
<212> DHK
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 21
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct 48

020324

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca atg aag att tcc tgc agg gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 acc atg aac tgg gtg agg cag agc cat gga aag aac ctt gag tgg att 144
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga ctt att aat cct cac aat ggt ggt tct agc tac aac ctg aag ttc 192
 Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctc ctc agt ctg aca tct gaa gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gta aga tgg ggt gac tac ggc tct ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
 Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 ctg gtc act gtc tct gca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

020324

	100		105		110	
Leu Val Thr Val Ser Ala						
	115					
<210>	23					
<211>	357					
<212>	DHK					
<213>	Mus sp.					
<220>						
<221>	CDS					
<222>	(1)..(357)					
<400>	23					
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct						48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala						
1	5		10		15	
tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gcc tac						96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr						
	20		25		30	
tac atg cac tgg gtg aag caa agt cat gta aag agt ctt gag tgg att						144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile						
	35		40		45	
gga ctt gtt aat cct tac aat ggt ttt agt agc tac aac cag aat ttc						192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe						
	50		55		60	
gag gac aag gcc agc ttg act gta gat aag ttc tcc agc acc gcc tac						240
Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr						
	65		70		75	80
atg gaa ctc cac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt						288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys						
	85		90		95	
gca aga gaa ttc tac ggc tac cgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg						336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly						
	100		105		110	
acc gcg gtc acc gtc tcc tca						357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser						
	115					
<210>	24					
<211>	119					
<212>	PRT					
<213>	Mus sp.					
<400>	24					
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala						
1	5		10		15	
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr						
	20		25		30	

020324

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Glu Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 333
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(333)

<400> 25
 caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cta ggg 48
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 gaa cgg gtc acc atg acc tgc act gtc agc tca agt gtg aat tcc agt 96
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30
 tac ttg cac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg 144
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 att tat agc aca tcc aac ctg cct tct gga gtc cca gct cgc ttc agt 192
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc acc ata gag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
 65 70 75 80
 tct gaa gat gct gcc act tat tac tgt cac cag tat cat cgt tcc cca 288
 Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95
 caa ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa cgg gct 333
 Gln Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

020324

<210> 26
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 26

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

Gln Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105 110

<210> 27
 <211> 336
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 27

gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat act ttt 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

ggc tat agt ttt ata tac tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc 144
 Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

020324

agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

gag gat cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 336
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 28
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 29
 <211> 339
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 29
 gat gtt gtg atg tcc cag att cca ctc act ttg tgg gtc acc att gga 48
 Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc ata cat agt 96

020324

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag cgc cta att tat ctg gtg tct aga ctg gac tct gga gtc cct 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

tca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336
 Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgg 339
 Arg

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 30

Asp Val Val Met Ser Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 31
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<220>
 <221> источник
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (91)..(105)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (106)..(147)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (148)..(192)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (193)..(294)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (295)..(330)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (331)..(363)
 <223> homo sapiens

<400> 31
 cag gtt cag ctt gtc cag cct gga gct gaa gtg gta aag cca gga gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tct gtg aag ctc tct tgt aaa gca agc ggc tac aac ttc acc agc tat 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg atg cac tgg gtg cgt cag cgt ccc ggc cag gga ctc cag tgg ata 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

020324

ggc aac atc tac ccc ggc acc ggt aat aca aac tat gac cag aag ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

caa ggc aag gct acc ctt aca gtt gac acc tct acc agc act act tat 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg caa ttg tcc agc ctg act agc gag gat tcc gcc gtg tat tat tgt 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcc agg tgg ggc ctt gtt agg tac ttc ttc gct atg gat tac tgg ggg 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag ggt act agc gtt aca gtt tcc agt 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<220>
 <221> источник
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (91)..(105)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (106)..(147)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (148)..(192)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (193)..(294)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (295)..(330)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (331)..(363)
 <223> homo sapiens

<400> 33
 cag gtg cag ctc gtc cag ccc ggt gcc gaa gtg gtg aaa ccc ggt gct 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tct gtg aag ctg tca tgc aag gcc tca ggc tat agt ttc acc tca tat 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg atg cat tgg gtc cgc cag agg cca ggc cag ggc ctc caa tgg atc 144
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 gga aac atc tac cct ggc aca gga aat acc aat tat gac cag aaa ttc 192
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

020324

caa ggt aag gcc act ctg acc gtg gac act agc aca tca acc aca tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctg tct tct ctc act tca gaa gac agt gct gtc tac tac tgc 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca cga tgg ggc ctc gtt cgt tat ttc ttc gca atg gat tat tgg ggt 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

caa ggc aca tca gtt acc gtg tcc tct 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

```

<220>
<223> Гуманизированное антитело

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<220>
<221> источник
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (148)..(192)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (193)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (295)..(330)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (331)..(363)
<223> homo sapiens

<400> 35
cag gtg cag ctg gtg cag ccc ggg gct gag gtg gta aag cca gga gcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

agt gtg aag ttg tcc tgc aag gcc tcc ggg tac aat ttc acc tct tac      96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
20          25          30

tgg atg cat tgg gtg cgt cag cgg cct ggg caa gga ctt caa tgg atc      144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35          40          45

ggg aat att tac ccc ggt acc ggc aat aca aat tat gat cag aag ttc      192
Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
50          55          60

cag ggc aag gct aca ttg acc gtg gat acc tac act tct act act tac      240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr
65          70          75          80

```

020324

atg caa ctg agc tca ctg acc tcc gag gac tca gcc gtg tac tat tgc 288
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca cgc tgg gga ctc gtc agg tat ttc ttt gcc atg gat tac tgg gga 336
 Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag ggg acc tct gtc acc gtg agc agt 363
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Tyr Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Leu Val Arg Tyr Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<400> 37

020324

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Asp Ser Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Asp Ser Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Val Arg Trp Gly Asp Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<220>
 <221> источник
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (91)..(105)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (106)..(147)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (148)..(195)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (196)..(294)
 <223> homo sapiens

<220>
 <221> источник
 <222> (295)..(324)
 <223> Mus sp.

<220>
 <221> источник
 <222> (325)..(357)
 <223> homo sapiens

<400> 39
 sag gtg caa ctg gtg caa tcc ggt gcc gag gtc gtc aaa ccc gga gca 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

020324

tct gtg aag ata tcc tgt aag gcc tcc ggc tac act ttt aca gcc tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

tat atg cat tgg gtt aaa cag agt ccc gtg cag tcc ctg gaa tgg atc 144
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggc ttg gtg aac cct tat aac gga ttc tca agt tac aat caa aag ttt 192
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

cag ggc aag gct tcc ctg act gta gac aag agc agt tcc aca gcc tac 240
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctc cat tca ctg aca tca gaa gac agc gcc gta tac tat tgc 288
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca cgt gag ttc tac ggc tat aga tac ttt gac gtc tgg ggc caa ggc 336
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

aca gcc gtc aca gtg agc tct 357
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Гуманизированное антитело

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> источник
<222> (1)..(90)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (148)..(195)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (196)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (295)..(324)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens

<400> 41
cag gtc cag ttg gtg cag tct gga gca gag gtt gtg aaa cca ggc gca 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

agt gtc aaa atc agc tgt aag gct agc gga tac tcc ttt aca gca tat 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

020324

tat atg cac tgg gtg aag cag agc cct gtt cag agc ctg gaa tgg atc 144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggt ctc gtc aac cct tat aat gga ttt tct tct tat aac caa aag ttc 192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

cag ggc aaa gcc agc ctg aca gtg gat aag agt agc agc act gcc tat 240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gaa ctg cat tct ctc acc tct gaa gat agt gca gtg tac tat tgt 288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gct cgc gag ttc tac ggt tat cga tat ttc gac gtg tgg ggc cag ggt 336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

act gcc gtg aca gta agc agt 357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Val Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ala Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 43
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Гуманизированное антитело

 <400> 43
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Гуманизированное антитело

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

 <220>
 <221> источник
 <222> (1)..(90)
 <223> homo sapiens

 <220>

```

<221> источник
<222> (91)..(105)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (106)..(147)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (148)..(195)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (196)..(294)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (295)..(324)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (325)..(357)
<223> homo sapiens

<400> 44
cag gtt caa ctg gtt cag agt ggg gca gaa gtc gta aag ccc gga gct 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcc gtt aag att agc tgt aaa gcc tcc ggc tat agc ttt aca gct tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

tat atg cac tgg gtc aag caa tct cct ggg cag agc ctg gag tgg atc 144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggc ctg gtc aat cca tac aat ggc ttc tct agt tac aac caa aaa ttt 192
Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

cag gga aaa gcc tcc ctt aca gta gac aag tca tct tcc act gcc tac 240
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gaa ctt cac tcc ctt aca agc gag gat agc gcc gtt tat tat tgt 288
Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aga gaa ttt tac gga tat cgg tat ttc gat gtc tgg ggg cag ggg 336
Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

act gcc gtg acc gtc agt tct 357
Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

```

020324

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Синтетическая конструкция

 <400> 45

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Leu Val Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Glu Phe Tyr Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 46
 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Гуманизированное антитело

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)

 <220>
 <221> источник
 <222> (1)..(71)
 <223> homo sapiens

 <220>
 <221> источник
 <222> (72)..(105)
 <223> Mus sp.

```

<220>
<221> источник
<222> (106)..(150)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (151)..(171)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (172)..(269)
<223> homo sapiens

<220>
<221> источник
<222> (270)..(299)
<223> Mus sp.

<220>
<221> источник
<222> (300)..(330)
<223> homo sapiens

<400> 46
gag atc gtt ctc aca cag tca cca gcc acc atg agc gcc tct ccc ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1                               5                10                15

gaa cga gtg acc atg act tgt aca gta tcc tcc tct gtg aac tct tct      96
Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
                20                25                30

tac ctg cat tgg tac cag cag aag cct ggt tcc agc ccc aaa ctc tgg      144
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
                35                40                45

atc tac agt aca agc aat ctg ccc tca ggc gtt ccc gct agg ttc tcc      192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
                50                55                60

ggg tca ggt tct ggc act agt tac tct ctg acc atc agc acc atc gaa      240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
65                70                75                80

tcc gaa gat gct gca aca tac tac tgt cac cag tat cac agg tcc ccc      288
Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
                85                90                95

cag ttt aca ttc ggt ggc ggc acc aaa ctt gag att aag cgt            330
Gln Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                100                105                110

<210> 47
<211> 110
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 47

```

020324

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Asn Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Ile Glu
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

Gln Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<400> 48

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

020324

100 105 110

<210> 49
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<400> 49

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Гуманизированное антитело

<400> 50

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp

020324

gac gtc gtg atg aca caa acc cct ctg tcc ctg agc gtc act ctg gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

caa ccc gct tcc att agc tgc aaa tca tca caa tct ctc atc cac tca 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30

gac ggc aaa aca tac ctc aat tgg ctg ctg cag aga cca gga cag tcc 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cct aaa agg ctt atc tac ctg gtc tct cgt ttg gac tct ggt gta cca 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac cgg ttt act ggt tcc ggg gcc gga acc gat ttc act ctg aag att 240
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

tcc agg gtg gaa gct gaa gat ctc gga gtg tat tat tgc tgg cag ggc 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

agc cat ttc ccc cgt act ttt ggt ggg ggt acc aaa ttg gaa att aag 336
 Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgt 339
 Arg

<210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 52

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Ser His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 53
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

<400> 53
 ggaggatcca tagacagatg ggggtgctgt ttggc 36

<210> 54
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

<400> 54
 ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 55
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> смешанные основания обозначены следующим образом H=A+T+C, S=G+C,
 Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 55
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 56
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 56
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 57
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Mus sp.

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> смешанные основания обозначены следующим образом H=A+T+C, S=G+C,
      Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 57
ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

<210> 58
<211> 46
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<400> 58
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc 46

<210> 59
<211> 23
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<400> 59
gacagacaca ctctgctat ggg 23

<210> 60
<211> 32
<212> ДНК
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> смешанные основания обозначены следующим образом H=A+T+C, S=G+C,
      Y=C+T, K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V = A+C+G, N = A+C+G+T

<400> 60
gcagaattca tgggatggag cyggatcttt ct 32

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 61
Glu Tyr Asn Met His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 62

```

020324

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 63

Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 64

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 65

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 66

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 67

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 68

020324

<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 68

Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 69

Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 70

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 71

Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 72

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 73
<211> 360
<212> DHK
<213> Mus sp.

020324

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 73
 gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gac ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aga ttc act gaa tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

aat atg cac tgg atg aag cag agc cat gga gag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tat att tat cct tac aat ggt gat act ggc tac agg cag aaa ttc 192
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe
 50 55 60

aag aac atg gcc aca ttg act gca gac att tcc tcc aat aca gcc tac 240
 Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gac gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gca aga tgg ggc tac ggt agt ggc ggg ggg ttt act tac tgg ggc caa 336
 Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gca 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 74
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 74
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Arg Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Met Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

020324

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 75
 <211> 357
 <212> MHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 75
 gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 aac atg cac tgg gtg aaa cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga ttt att tat cct tac aat ggt ggt act ggc tac aac cag agg ttc 192
 Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 aag aac aag gcc aca ttg act gta gac act tcc tcc agc aca gcc tac 240
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag gtc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
 Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gca agg gga tat tac tac ggt agg cac ttt gac tac tgg ggc caa ggc 336
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc act ctc aca gtc tcc tca 357
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 76

020324

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 336
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 77
 gac att gtg ctg acc caa tct cca ggt tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gac act tat 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30
 ggc aat agt ttc atg cac tgg tac cag cag aaa gca gga cag ccg ccc 144
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288

020324

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 gag gat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgg 336
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 78

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 79
 <211> 321
 <212> DHK
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 79

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca ctc atg tct gca tct cca ggg 48
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gtg agt tac atg 96
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

tac tgg tac cag cag aag cca aga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat 144
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

```

          35              40              45
atc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt      192
Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
   50              55              60

ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa      240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
   65              70              75              80

gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt aac cca ccc acg      288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
   85              90              95

ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg      321
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
   100              105

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 80
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1              5              10              15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20              25              30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35              40              45

Ile Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50              55              60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65              70              75              80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
 85              90              95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100              105

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с рецептором эфрина EphA2 и является антагонистом указанного рецептора, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит одну или несколько гипервариабельных областей с аминокислотными последовательностями, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 и 72.

2. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент представляет собой антитело мыши или его эпитопсвязывающий фрагмент и продуцируется гибридомой 37.3D7 РТА-7660; гибридомой 37.1 F5 РТА-7661; гибридомой 53.2Н11 РТА-7662; гибридомой EphA2-N1 РТА-8407 или гибридомой EphA2-N2 РТА-8408.

3. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать рост раковой клетки.

4. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать миграцию раковой клетки.

5. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.3 и 4, отличающееся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку, выбранную из группы, состоящей из клеток рака молочной железы, рака толстой кишки, рака эндометрия, карциномы яичников, остеосаркомы, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака легких, синовиальной карциномы, рака поджелудочной железы, саркомы, глиомы, рака головы и шеи, рака желудка, рака печени и других карцином.

6. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать ангиогенез.

7. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент лишено агонистической ак-

тивности.

8. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.7, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент не стимулирует фосфорилирование по остаткам тирозина EphA2.

9. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать связывание лиганда с указанным рецептором.

10. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.9, отличающееся тем, что указанный лиганд представляет собой эфрин A1.

11. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать фосфорилирование по остаткам тирозина EphA2.

12. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.11, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать фосфорилирование по остаткам тирозина EphA2 в присутствии эфрина A1.

13. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент способно ингибировать опосредованную EphA2 передачу сигнала.

14. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.13, отличающееся тем, что опосредованная EphA2 передача сигнала представляет собой увеличение фосфорилирования Akt.

15. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент связывает EphA2 с K_D , составляющей 3×10^{-10} М или меньше.

16. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рецептор EphA2 является рецептором человека.

17. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, 28, 30, 78 и 80.

18. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:20, 22, 24, 74 и 76.

19. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:1, 2 и 3, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:4, 5 и 6.

20. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.19, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO:26.

21. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.19, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит одну или более переменных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

22. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:7, 8 и 9, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарность области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:10, 11 и 12.

23. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.22, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28.

24. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.22, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит одну или более переменных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

25. Антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, отличающееся тем, что указанное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные

SEQ ID NO:7, 8 и 9, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:10, 11 и 12.

41. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.40, отличающееся тем, что содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:48, 49 или 50.

42. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.40, отличающееся тем, что содержит одну или более вариабельных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:37 и 38.

43. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.34-36, отличающееся тем, что содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:13, 14, и 15, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO:16, 17 и 18.

44. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.43, отличающееся тем, что содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

45. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по п.43, отличающееся тем, что содержит одну или более вариабельных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:40, 42, 43 и 45.

46. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.34-36, отличающееся тем, что содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:61, 62 и 63, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:64, 65 и 66.

47. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.34-36, отличающееся тем, что содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:67, 68 и 69, и где указанная легкая цепь содержит три последовательные определяющие комплементарности области, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:70, 71 и 72.

48. Гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.34-47, отличающееся тем, что указанное гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из hu37.3D7, hu37.1F5, hu53.2H11, huEphA2-N1 и huEphA2-N2, раскрытых в описании.

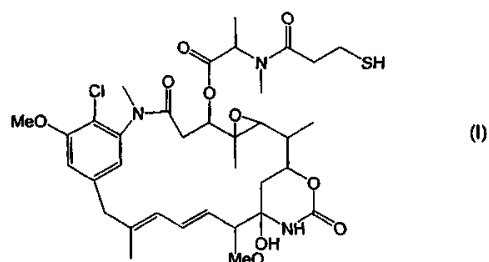
49. Конъюгат, содержащий антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент, по любому из пп.1-48, связанный с цитотоксическим средством.

50. Конъюгат, содержащий гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи с последовательностью, гомологичной по меньшей мере примерно на 95% последовательности SEQ ID NO:52, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, гомологичной по меньшей мере примерно на 95% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:40, 42, 43 и 45, связанный с цитотоксическим средством.

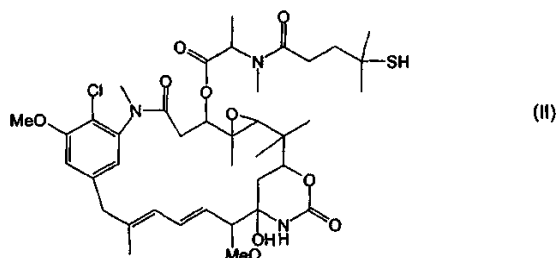
51. Конъюгат, содержащий гуманизированное или поверхностно-модифицированное антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи с последовательностью, гомологичной по меньшей мере примерно на 98% последовательности SEQ ID NO:52, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, гомологичной по меньшей мере примерно на 98% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:40, 42, 43 и 45, связанный с цитотоксическим средством.

52. Конъюгат по любому из пп.49-51, отличающийся тем, что указанное цитотоксическое средство выбирают из группы, состоящей из мейтанзиноида, низкомолекулярного лекарственного средства, производного томеймицина, производного лептомицина, пролекарства, токсоида, аналога CC-1065 и CC-1065.

53. Конъюгат по п.52, отличающийся тем, что указанное цитотоксическое средство представляет собой мейтанзин DM1 формулы



54. Конъюгат по п.52, отличающийся тем, что указанное цитотоксическое средство представляет собой мейтанзин DM4 формулы



55. Конъюгат по п.52, отличающийся тем, что указанное цитотоксическое средство представляет собой производное томеймицина, выбранное из группы, состоящей из

- 8,8'-[1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[1,5-пентандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[1,4-бутандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[3-метил-1,5-пентандиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[2,6-пиридиндиилбис(окси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбониламинопропилокси)-2,6-пиридиндиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(3-аминопропилокси)-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбониламинопропил)-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)пропилокси]-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-ацетилтиометил-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[(S)-2-метилден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- трет-бутиловый эфир бис{2-[(S)-2-метилден-7-метокси-5-оксо-1,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-илокси]этил}карбаминовой кислоты;
- 8,8'-[3-(2-ацетилтиоэтил)-1,5-пентандиилбис(окси)]бис[(S)-2-метилден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноил)амино-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилден-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(N-4-метилдитио-4,4-диметилбутаноил)амино-1,3-бензолдиилбис(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилден-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилэтил)амино-1,3-бензолдиил(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилден-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитио-2,2-диметилэтил)амино-1,3-бензолдиил(метиленокси)]бис[7-метокси-2-метилден-1,2,3,11а-тетрагидро-5Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамидоэтокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидоэтокси)бензол-3,5-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];
- 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидопропокси)пиридин-2,6-диметил)диокси]бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидобутоксипиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноил)пиперазин-1-ил]пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноил)пиперазин-1-ил]пропил)бензол-3,5-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)этокси]этокси}этокси)пиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси}этокси)бензол-3,5-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)этокси]этокси}этокси)бензол-3,5-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноиламино)этокси]этокси}этокси)этокси]этокси)пиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(1-(2-[метил(2-метил-2-метилдисульфанилпропил)амино]этокси)бензол-3,5-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(3-[метил(4-метил-4-метилдисульфанилпентаноил)амино]пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(4-(3-[метил(2-метил-2-метилдисульфанилпропил)амино]пропил)пиридин-2,6-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он];

8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфанил)пентанамидо)бензол-3,5-диметил)диокси] бис[(S)-2-эт(Е)илиден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагидропирроло [2,1-с][1,4]бензодиазепин-5-он].

56. Конъюгат по п.52, отличающийся тем, что цитотоксическое средство представляет собой производное лептомицина, выбранное из группы, состоящей из

(2-метилсульфанилэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты; бис[(2-меркаптоэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты];

(2-меркаптоэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-метилдисульфанилэтил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-метил-2-метилдисульфанилпропил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты;

(2-меркапто-2-метилпропил)амид (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-гидрокси-3,5,7,9,11,15,17-гептаметил-19-((2S,3S)-3-метил-6-оксо-3,6-дигидро-2Н-пиран-2-ил)-8-оксононадека-2,10,12,16,18-пентаеновой кислоты.

57. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-48 либо конъюгат по любому из пп.49-56 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиенты.

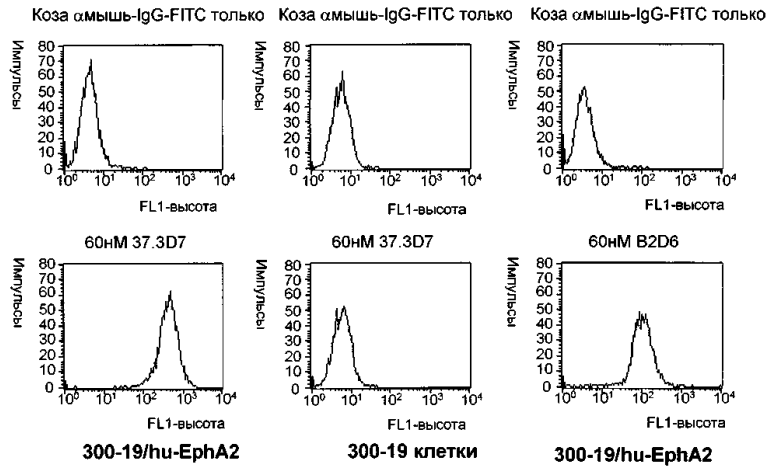
58. Полинуклеотид, кодирующий полипептид, входящий в состав антитела по любому из пп.1-48, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 78 и 80.

59. Полинуклеотид по п.58, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид обладает последовательностью, имеющей как минимум 80% гомологию с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 44, 46, 51, 73, 75, 77 и 79.

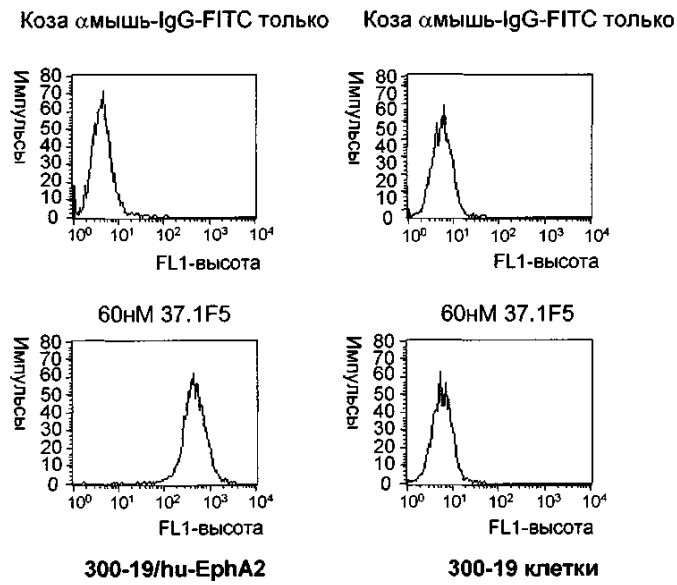
60. Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.58 и 59.

61. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.60.

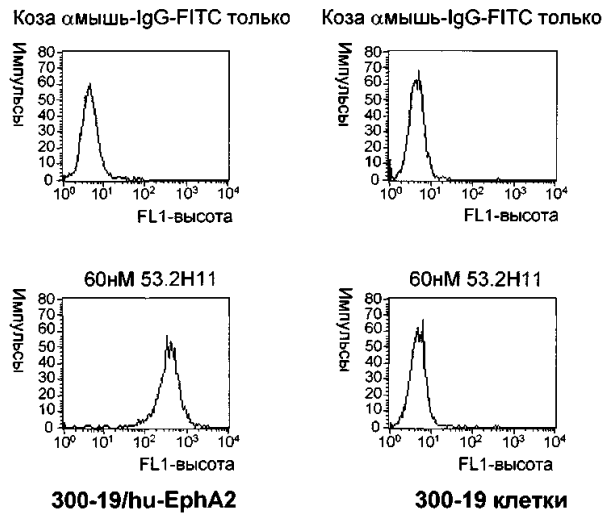
62. Гибридомная клеточная линия, отличающаяся тем, что ее выбирают из группы, состоящей из гибридомной клеточной линии, обозначенной 37.3D7 РТА-7660; гибридомной клеточной линии, обозначенной 37.1F5 РТА-7661; гибридомной клеточной линии, обозначенной 53.2Н11 РТА-7662; гибридомной клеточной линии, обозначенной EphA2-N1 РТМ-8407; или гибридомной клеточной линии, обозначенной EphA2-N2 РТМ-8408, продуцирующая антитело по п.1.



Фиг. 1А

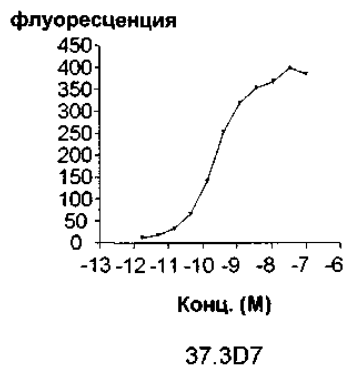
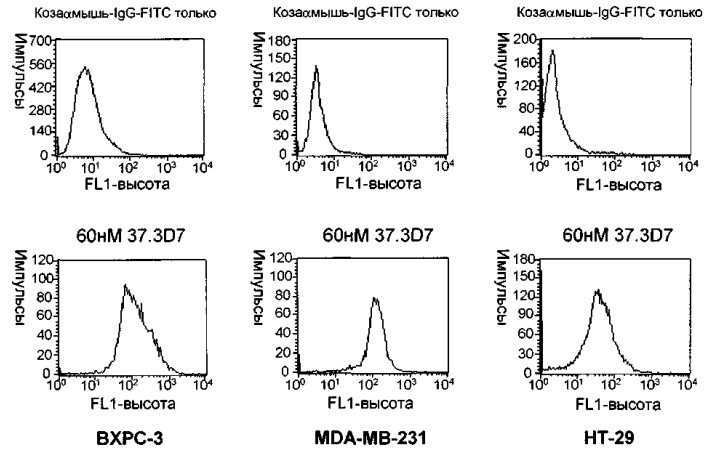


Фиг. 1В



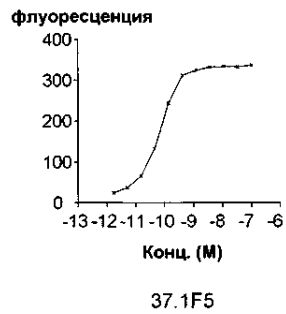
Фиг. 1С

020324



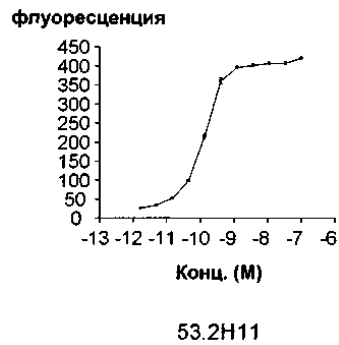
300-19/hu-EphA2

Фиг. 3А



300-19/hu-EphA2

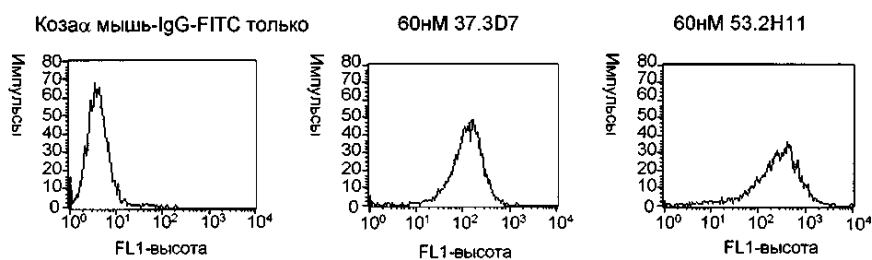
Фиг. 3В



300-19/hu-EphA2

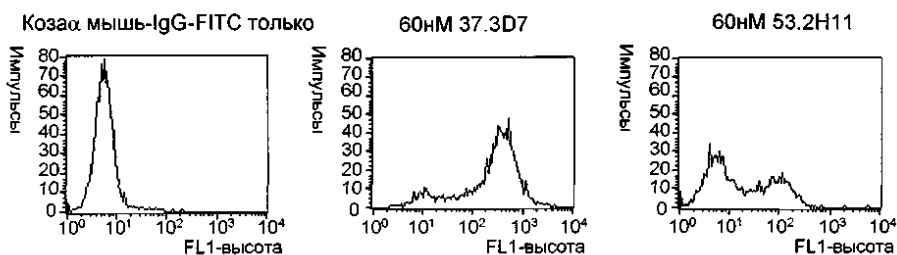
Фиг. 3С

300-19/μ-EphA2

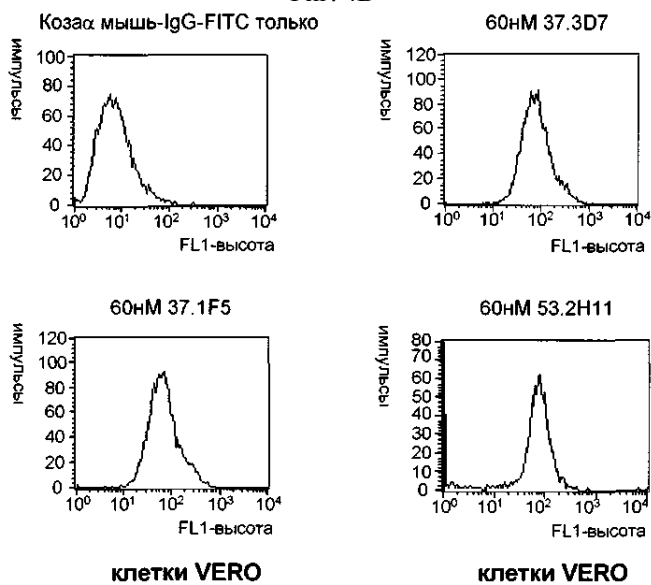


Фиг. 4А

300-19/Rat-EphA2



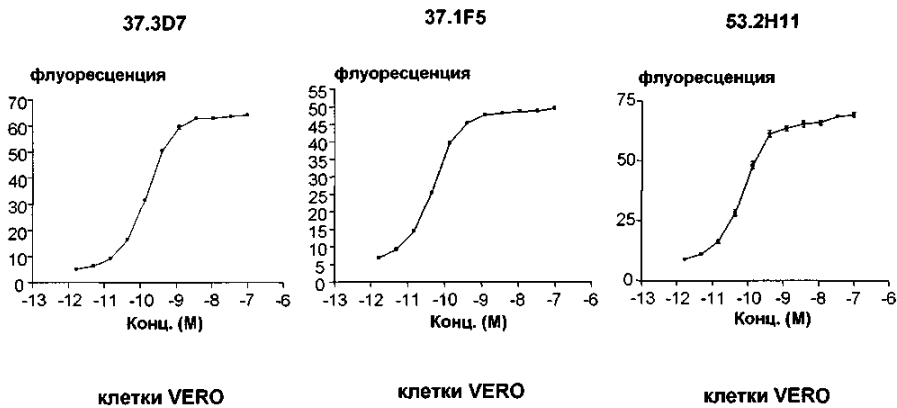
Фиг. 4В



клетки VERO

клетки VERO

Фиг. 5А

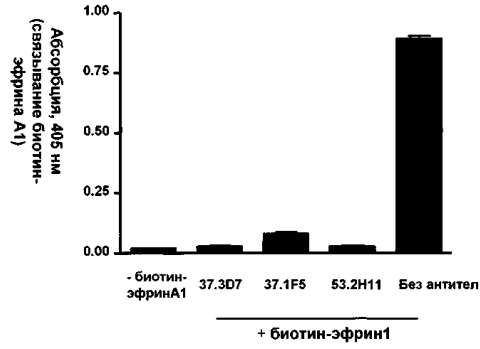


клетки VERO

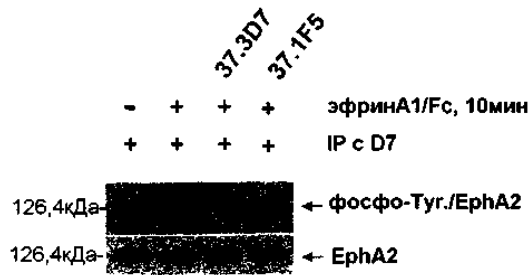
клетки VERO

клетки VERO

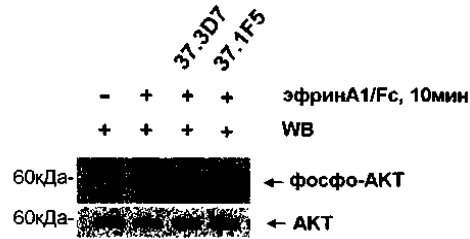
Фиг. 5В



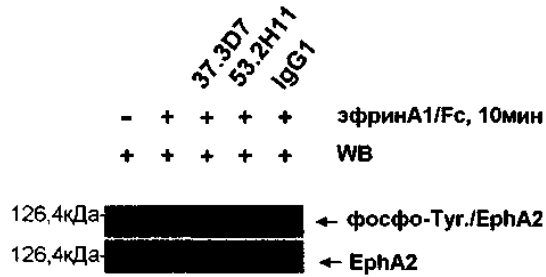
Фиг. 6



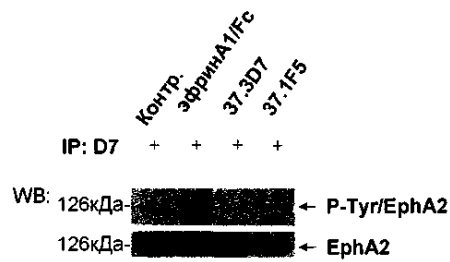
Фиг. 7А



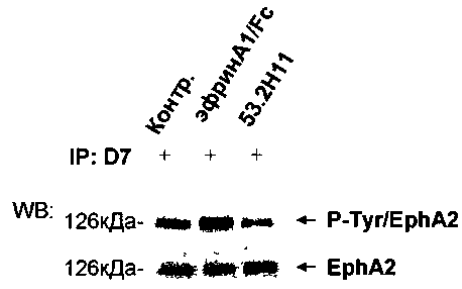
Фиг. 7В



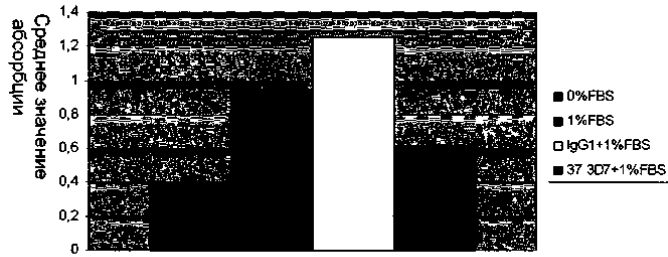
Фиг. 7С



Фиг. 8А

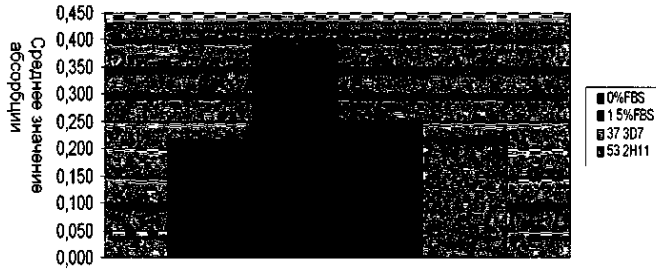


Фиг. 8В



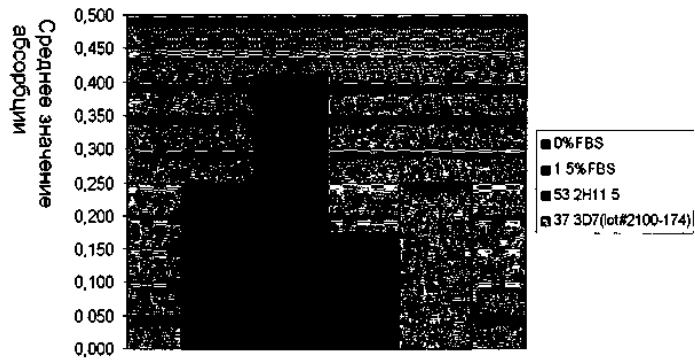
HT-клетки на 3-ий день

Фиг. 9А



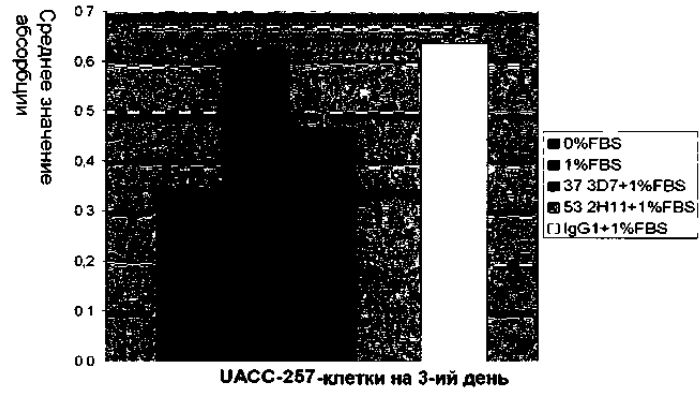
Клетки Lovo на 3-ий день

Фиг. 9В

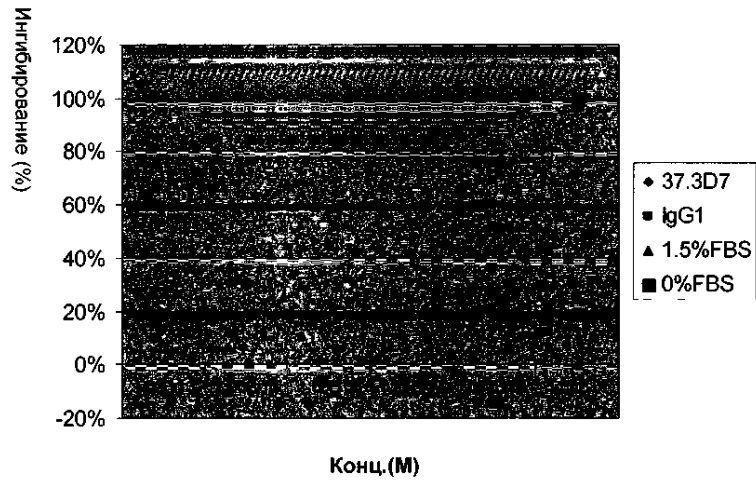


CFPAC-1-клетки на 3-ий день

Фиг. 9С



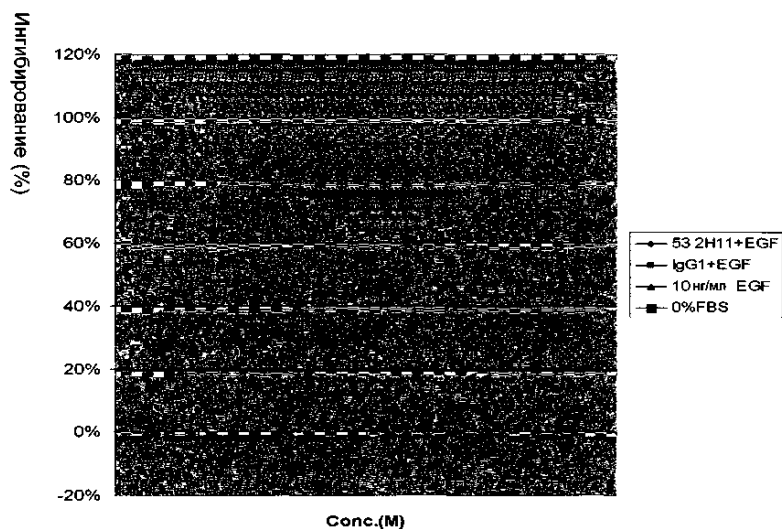
Фиг. 9D



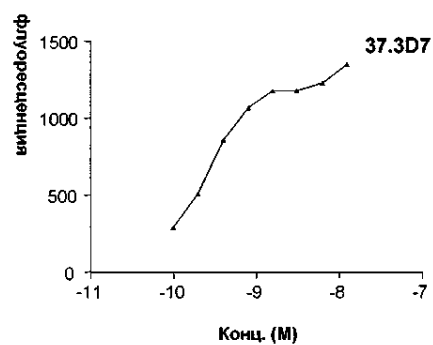
Фиг. 10А



Фиг. 10В

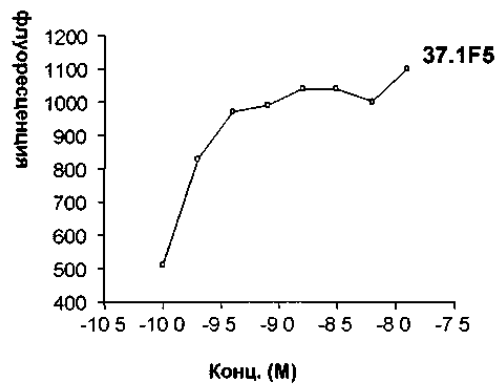


Фиг. 10С



HUVEC

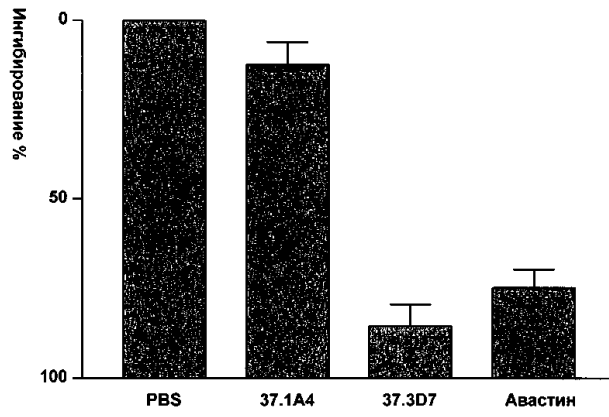
Фиг. 11А



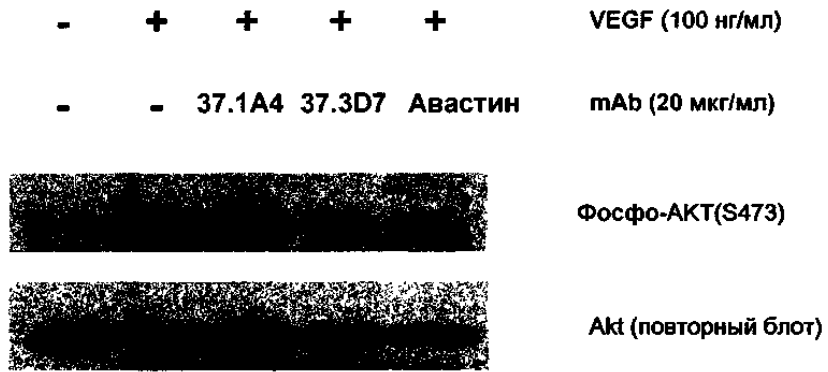
HUVEC

Фиг. 11В

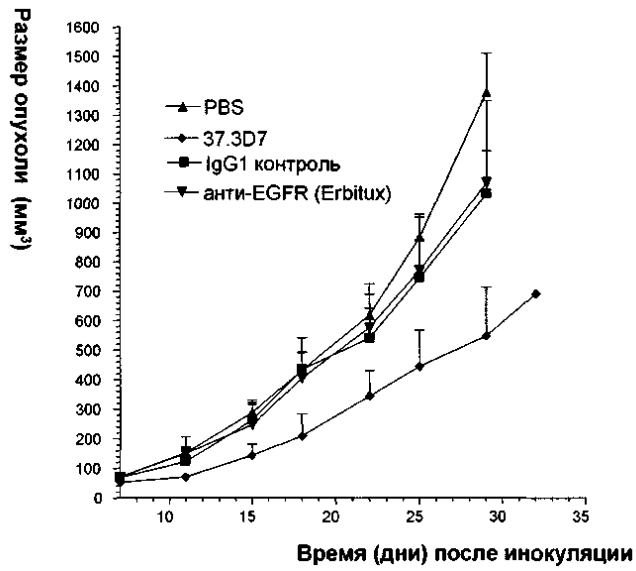
020324



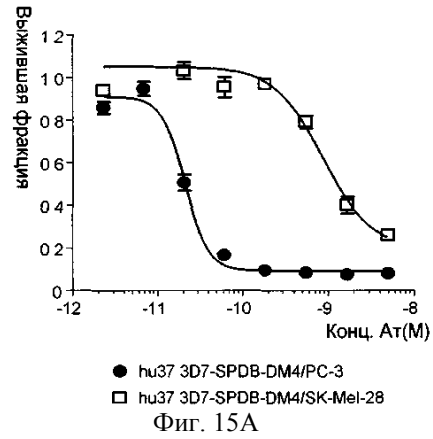
Фиг. 12



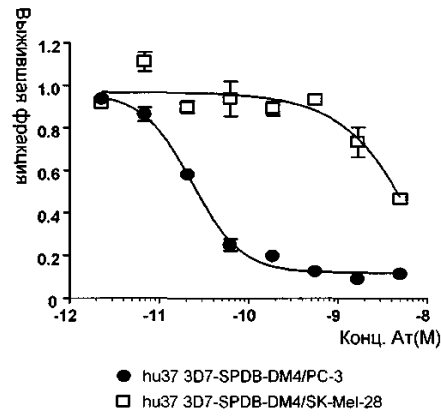
Фиг. 13



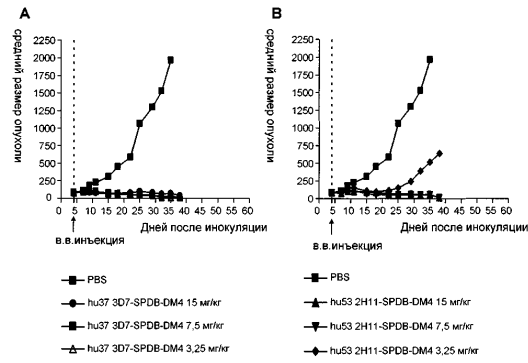
Фиг. 14



Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 16

