УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119047** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2016 04040**

(22) Дата подання заявки: **10.10.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.04.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/890,098, 61/890,104**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **11.10.2013, 11.10.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2019, Бюл.№ 8**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/GB2014/053057, 10.10.2014**

(72) Винахідник(и):
Терретт Джонатан Александер (US),
Акройд Джеймс Едвард (GB)

(73) Власник(и):
БЕРЛІН-ХЕМІ АГ,
Glienicker Weg 125-127, 12489 Berlin, Germany (DE)

(74) Представник:
Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 9623882, 08.08.1996
Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells / Premkumar Vummidi Giridhar, Holly M. Funk, Catherine A. Gallo et al. // Clinical & Experimental Metastasis. – 2011. –Vol. 28 (8). – P. 887–897
WO 2009061996 A2, 14.05.2009

UA 119047 C2

(54) КОН'ЮГОВАНЕ АНТИТІЛО ДО LY75 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла або його антигензв'язувальної частини, які зв'язуються з LY75, та містять ковалентно приєднаний цитотоксичний лікарський засіб. Винахід також стосується фармацевтичної композиції та способу лікування раку, опосередкованого LY75.

ВСТУП

Дане розкриття в цілому стосується галузей імунології та молекулярної біології. Конкретніше, у даному документі наведено антитіла та інші терапевтичні білки, спрямовані проти LY75, нуклеїнові кислоти, які кодують такі антитіла і терапевтичні білки, способи одержання моноклональних антитіл та інших терапевтичних білків і способи лікування захворювань, таких як форми раку, опосередковані експресією/активністю LY75 і/або асоційовані з аномальною експресією/активністю його лігандів.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Лімфоцитарний антиген 75 діє як ендоцитозний рецептор, що спрямовує захоплені антигени з позаклітинного простору у спеціалізований антиген-процесуючий компартмент, і, як вважають, викликає зниження проліферації В-лімфоцитів. Експресія лімфоцитарного антигену 75 спостерігалася при формах раку підшлункової залози, яєчника, молочної залози, ободової і прямої кишки, стравоходу, шкіри, щитоподібної залози і легені (недрібноклітинному), а також при множинній мієломі і багатьох різних підтипах лімфоми і лейкозу.

У WO 2009/061996 розкриті виділені моноклональні антитіла, що зв'язуються з DEC-205 (LY75) людини, і споріднені композиції і молекули на основі антитіл. Також розкриті фармацевтичні композиції, що містять антитіла, а також терапевтичні і діагностичні способи застосування антитіл.

У WO 2008/104806 розкриті афінні реагенти, здатні до зв'язування з LY75, для застосування в лікуванні або профілактиці раку.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході представлені антитіла, спрямовані проти LY75, нуклеїнові кислоти, які кодують такі антитіла, клітини-хазяї, що містять такі нуклеїнові кислоти, які кодують антитіла за даним винаходом, способи одержання антитіл до LY75 і способи лікування захворювань, таких як порушення, опосередковані LY75, наприклад, форми раку у людини, що включають рак підшлункової залози, рак яєчника, рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак стравоходу, рак шкіри, рак щитоподібної залози, рак легені, рак голови і шиї, рак сечового міхура, рак шлунка, лейкоз, множинну мієлому і лімфому.

В одному аспекті у даному винаході представлені антитіло або його антигензв'язувальна частина, які: (a) зв'язуються з епітопом на LY75, що розпізнається антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID NO:1, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID NO:2, або (b) конкурують за зв'язування з LY75 з антитілом, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID NO:1, і варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, наведену під SEQ ID NO:2.

В одному варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язувальна частина зв'язуються з LY75 людини і містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить 1, 2 або 3 CDR, вибрані з групи, що включає CDR, що містять SEQ ID NO:5, 6 і 7, і/або варіабельну область легкого ланцюга, що містить 1, 2 або 3 CDR, вибрані з групи, що включає CDR, що містять SEQ ID NO:8, 9 і 10.

У переважних варіантах здійснення вказані антитіла є виділеними антитілами.

У деяких варіантах здійснення антитіла за даним винаходом зв'язуються з LY75 (SEQ ID NO: 15) і інтерналізуються клітиною, що експресує LY75, викликають реакцію антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) у присутності ефекторних клітин або викликають цитотоксичну Т-клітинну реакцію у присутності ефекторних клітин.

В іншому варіанті здійснення антитіло містить області, які визначають комплементарність (CDR), або варіабельні області (VR) важких і/або легких ланцюгів конкретного антитіла, описаного у даному документі (наприклад, згадуваного у даному документі як "LY75_A1"). Відповідно, в одному варіанті здійснення антитіло містить домени CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) антитіла LY75_A1, що має послідовність, показану під SEQ ID NO:1, і/або домени CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області легкого ланцюга (VL) LY75_A1, що має послідовність, показану під SEQ ID NO:2. В іншому варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5; другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6; і третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7; і/або варіабельну область легкого ланцюга, що містить першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8; другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9; і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10, де необов'язково будь-яка одна або більше CDR незалежно містять одну, дві, три, чотири або п'ять амінокислотних замін, додавань або делецій.

В іншому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом зв'язуються з LY75 людини і

містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:1 і/або її консервативні модифікації послідовності. Антитіло може додатково містити варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:2 і/або її консервативні модифікації послідовності.

У додатковому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом зв'язуються з LY75 людини і містять варіабельну область важкого ланцюга і варіабельну область легкого ланцюга, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і/або 2, і їхні консервативні модифікації послідовності.

Виділені антитіла, що містять варіабельні області важких і легких ланцюгів, що характеризуються щонайменше 80 %, або щонайменше 85 %, або щонайменше 90 %, або щонайменше 91 %, або щонайменше 92 %, або щонайменше 93 %, або щонайменше 94 %, або щонайменше 95 %, або щонайменше 96 %, або щонайменше 97 %, або щонайменше 98 %, або щонайменше 99 %, або більшою ідентичністю послідовності з будь-якої з вищенаведених послідовностей, також включені у даний винахід. Проміжні діапазони вищевказаних значень, наприклад, варіабельні області важких і легких ланцюгів, що характеризуються щонайменше 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % або 95-100 % ідентичністю послідовності з будь-якої з вищенаведених послідовностей, також маються на увазі як такі, які охоплені даним винаходом. В одному варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:1 або послідовність, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну SEQ ID NO:1. В іншому варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:2 або послідовність, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну SEQ ID NO:2. В іншому варіанті здійснення антитіло містить каркасну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну каркасній області варіабельної області важкого ланцюга з SEQ ID NO: 1, як показано під SEQ ID NO: 16, 17, 18 і 19. В іншому варіанті здійснення антитіло містить каркасну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну каркасній області варіабельної області легкого ланцюга з SEQ ID NO:2, як показано під SEQ ID NO: 20, 21,22 і 23.

Також даним винаходом охоплюються антитіла, які конкурують за зв'язування з LY75 з антитілами за даним винаходом. У конкретному варіанті здійснення антитіло конкурує за зв'язування з LY75 з антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і 2, або амінокислотні послідовності, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичні їм. В іншому варіанті здійснення антитіло конкурує за зв'язування з LY75 з антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, наведені під SEQ ID NO:1 і 2 (LY75_A1).

Інші антитіла за даним винаходом зв'язуються з тим же епітопом або епітопом на LY75, що розпізнається антитілами, описаними у даному документі. В іншому конкретному варіанті здійснення антитіло зв'язується з епітопом на LY75, що розпізнається антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і 2, або амінокислотні послідовності, щонайменше на 80 % ідентичні їм. В іншому варіанті здійснення антитіло зв'язується з епітопом на LY75, що розпізнається антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, наведені під SEQ ID NO:1 і 2 (LY75_A1).

У додатковому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом специфічно зв'язуються з одним або більше, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, пептидами, вибраними з групи, що включає SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 або 37, або їхніми фрагментами, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або

щонайменше 10 суміжних амінокислот. У додатковому варіанті здійснення епітоп, що розпізнається антитілами за даним винаходом, містить один або більше пептидів, два або більше або три або більше пептидів, вибраних з групи, що включає SEQ ID NO: 27, 29, 30, 34, 35, 36 або 37, або їхніми фрагментами, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 суміжних амінокислот. У додатковому варіанті здійснення епітоп, що розпізнається антитілами за даним винаходом, містить один або більше пептидів, наприклад, два або три пептиди, вибрані з групи, що включає SEQ ID NO: 30, 36 і 37, або їхніми фрагментами, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 суміжних амінокислот.

У додатковому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом містять відмінні CDR порівняно з вихідними антитілами, описаними у даному документі. Таким чином, у даному винаході представлені варіанти антитіл, що містять варіанти варіабельних областей вихідного антитіла, де вихідне антитіло містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5, другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6, третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7, першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8, другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9, і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10, і де варіант антитіла у сукупності має 1, 2, 3, 4, 5 або 6 амінокислотних замін у наборі з першої vhCDR, другої vhCDR, третьої vhCDR, першої vlCDR, другої vlCDR і третьої vlCDR, при цьому 1-4, 1-3 або 1-2 заміни є особливо застосовуваними, і де антитіло зберігає специфічне зв'язування з LY75.

Антитіла за даним винаходом можуть бути антитілами повної довжини, наприклад, будь-якого з наступних ізотипів: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, секреторний компонент IgA, IgD і IgE. В альтернативному випадку антитіла можуть являти собою фрагменти, такі як антигензв'язувальна частина або одноланцюгове антитіло (наприклад, Fab, $F(ab')_2$, Fv, одноланцюговий Fv-фрагмент, виділена область, що визначає комплементарність (CDR), або комбінація двох або більше виділених CDR). Антитіла можуть бути антитілами будь-якого типу, в тому числі, без обмежень, людськими, гуманізованими і химерними антитілами.

В інших варіантах здійснення антитіла за даним винаходом знаходяться у формі імунокон'югата (тобто додатково містять ковалентно приєднаний компонент). У конкретному варіанті здійснення компонент являє собою лікарський засіб, такий як майтанзиноїд, доластатин, ауристатин, трихотецен, каліхеаміцин, CC1065 або їхні похідні. У переважному варіанті здійснення компонент-лікарський засіб являє собою DM1 або DM4.

В інших варіантах здійснення антитіла за даним винаходом додатково охоплюють біспецифічну молекулу і у такій якості можуть викликати реакцію антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) у присутності ефекторних клітин, знешкоджуючи, таким чином, клітини, які експресують LY75.

В інших варіантах здійснення антитіла за даним винаходом додатково охоплюють біспецифічну молекулу і у такій якості можуть викликати цитотоксичну Т-клітинну реакцію у присутності ефекторних клітин, знешкоджуючи, таким чином, клітини, які експресують LY75.

В іншому аспекті у даному винаході представлені нуклеїнові кислоти, які кодують варіабельні області важких і/або легких ланцюгів антитіл за даним винаходом. В одному варіанті здійснення представлена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, яка кодує важкий ланцюг антитіла за даним винаходом або його антигензв'язувальну частину. В іншому варіанті здійснення представлена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, яка кодує легкий ланцюг антитіла за даним винаходом або його антигензв'язувальну частину. У додатковому варіанті здійснення представлена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, яка кодує варіабельні області важких і легких ланцюгів антитіл за даним винаходом.

В одному варіанті здійснення у даному винаході представлено виділене моноклональне антитіло, що зв'язується з LY75 людини, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга і варіабельну область легкого ланцюга, які кодуються послідовностями нуклеїнової кислоти, що відповідно включають в себе SEQ ID NO:3 і 4, або послідовностями нуклеїнової кислоти, які характеризуються щонайменше 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю з вищезгаданими послідовностями нуклеїнової кислоти або послідовностями, відмінними від SEQ ID NO: 3 і 4 внаслідок виродженості генетичного коду.

В іншому аспекті даного винаходу представлені вектори експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують варіабельні області важких і/або легких ланцюгів антитіл за даним винаходом, функціонально зв'язані з одним або більше регуляторними елементами.

В іншому аспекті у даному винаході представлені клітини-хазяї, що містять нуклеїнові

кислоти, які кодують варіабельні області важких і/або легких ланцюгів вищезгаданих антитіл або їхніх антигензв'язувальних частин. Переважно, при цьому клітина-хазяїн експресує вказані варіабельні області важких і/або легких ланцюгів або їхніх антигензв'язувальних частин, якщо клітину-хазяїна вирощують в умовах, у яких експресується (експресуються) нуклеїнова(нуклеїнові) кислота(кислоти).

У переважному варіанті здійснення клітина-хазяїн містить: (і) вектор експресії згідно з даним винаходом або

(іі) перший вектор експресії, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг антитіла за даним винаходом або його антигензв'язувальну частину, і другий вектор експресії, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг антитіла за даним винаходом або його антигензв'язувальну частину.

У додатковому аспекті даного винаходу представлено одержання антитіла або його антигензв'язувальної частини, що включає культивування клітини-хазяїна згідно з даним винаходом в умовах, у яких експресуються антитіло або його антигензв'язувальна частина, і необов'язково виділення антитіла або його антигензв'язувальної частини.

У додатковому аспекті представлений спосіб лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, антитіла або його антигензв'язувальної частини згідно з даним винаходом, де антитіло або його антигензв'язувальна частина інтерналізуються клітиною, що експресує LY75, при цьому вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина містять ковалентно приєднаний кон'югований лікарський засіб. Буде зрозуміло, що антитіло або його антигензв'язувальна частина за даним винаходом зв'язуються з LY75 (SEQ ID NO:15). В одному варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5; другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6; і третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7; і варіабельну область легкого ланцюга, що містить першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8; другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9; і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10, а також ковалентно приєднаний кон'югований лікарський засіб.

У додатковому аспекті представлений спосіб лікування раку, де пацієнту, який потребує цього, вводять антитіло або антитіла або їхні антигензв'язувальні частини за даним винаходом, і де таке антитіло або антитіла або їхні антигензв'язувальні частини за даним винаходом викликають реакцію ADCC у присутності ефекторних клітин. Переважно, антитіло або його антигензв'язувальна частина містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5; другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6; і третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7; і варіабельну область легкого ланцюга, що містить першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8; другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9; і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10.

У додатковому аспекті представлений спосіб лікування раку, де пацієнту, який потребує цього, вводять антитіло або антитіла або їхні антигензв'язувальні частини за даним винаходом, і де таке антитіло або антитіла або їхні антигензв'язувальні частини за даним винаходом викликають цитотоксичну Т-клітинну реакцію у присутності ефекторних клітин. Переважно, антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5; другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6; і третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7; і варіабельну область легкого ланцюга, що містить першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8; другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9; і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10.

У додатковому аспекті даного винаходу представлені одне або більше антитіл за даним винаходом для застосування в лікуванні раку.

Також представлено застосування одного або більше антитіл за даним винаходом у виробництві лікарського препарату для лікування раку.

У деяких варіантах здійснення рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак нирки, рак печінки, рак яєчника, рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак стравоходу, рак голови і шиї, рак шкіри, рак щитоподібної залози, рак сечового міхура, рак шлунка, рак легені, лейкоз, мієлому, переважно множинну мієлому, і лімфому. Особливо переважні форми раку включають неходжкінську лімфому, дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому (DLBCL), В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому, гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, рак сечового міхура, рак підшлункової залози і тричі негативний рак молочної залози.

Згідно з ще одним додатковим аспектом даного винаходу представлений спосіб виявлення,

діагностики і/або скринінгу або спостереження прогресування раку, де при вказаному раку експресується LY75, або спостереження ефекту протиракового лікарського засобу або терапії, спрямованих на вказаний рак, у суб'єкта, що включає виявлення наявності або рівня антитіл, здатних до імуноспецифічного зв'язування з LY75, або одного або більше їхніх фрагментів.

Переважно, рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак нирки, рак печінки, рак яєчника, рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак стравоходу, рак голови і шиї, рак шкіри, рак щитоподібної залози, рак сечового міхура, рак шлунка, рак легені, лейкоз, мієлому, переважно множинну мієлому, і лімфому. Особливо переважні форми раку включають неходжкінську лімфому, дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому (DLBCL), В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому, гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, рак сечового міхура, рак підшлункової залози і тричі негативний рак молочної залози.

Також у межах обсягу даного винаходу знаходяться набори, що містять композиції (наприклад, антитіла) за даним винаходом і необов'язково інструкції щодо застосування. Набір може додатково містити щонайменше один додатковий реагент або одне або більше додаткових антитіл за даним винаходом.

Інші ознаки і переваги даного винаходу будуть очевидними з наступного детального опису і формули винаходу.

КОРОКТИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фігурі 1 представлено вирівнювання важкого ланцюга LY75_A1 (SEQ ID NO:1), VH 3-15 людини зародкового типу (SEQ ID NO:11) і JH4 людини зародкового типу (SEQ ID NO:12). CDR-області важкого ланцюга LY75_A1 підкреслені.

На фігурі 2 представлено вирівнювання легкого ланцюга LY75_A1 (SEQ ID NO:2), VK 012 людини зародкового типа (SEQ ID NO:13) і JK4 людини зародкового типа (SEQ ID NO:14). CDR-області легкого ланцюга LY75_A1 підкреслені.

На фігурі 3a представлена цитотоксична активність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1, по відношенню до HT-29 і показано, що при тому, що більшість антитіл зв'язуються з LY75, тільки деякі з них проявляють ефективність.

На фігурі 3b представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до HT-29.

На фігурі 3c представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин RAJI.

На фігурі 3d представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин Namalwa.

На фігурі 3e представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин Karpas 299.

На фігурі 3f представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин BxPC3.

На фігурі 3g представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин HupT4.

На фігурі 3h представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин HPAFFII.

На фігурі 3i представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин EHEB.

На фігурі 3j представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин Mec-1.

На фігурі 3k представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин AML-193.

На фігурі 3l представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин HCC 70.

На фігурі 3m представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин HCC 1806.

На фігурі 3n представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин MDA-MB-468.

На фігурі 3o представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин RT4.

На фігурі 3p представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин 5637.

На фігурі 3q представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин SW780.

На фігурі 3r представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин SCC-9.

На фігурі 3s представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин OE 19.

На фігурі 3t представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин OVCAR-3.

На фігурі 3u представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин SK-OV-3.

На фігурі 3v представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин MOLP-8.

На фігурі 3w представлена цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин RPMI8226.

На фігурі 4a представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин Raji лімфоми Беркітта в ксенотрансплантатній моделі на мишах з SCID.

На фігурі 4b представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин Namalwa лімфоми Беркітта в ксенотрансплантатній моделі на мишах з SCID.

На фігурі 4c представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин HPAFII аденокарциноми підшлункової залози в ксенотрансплантатній моделі на безтимусних "голих" мишах.

На фігурі 4d представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин SW780 карциноми сечового міхура людини в ксенотрансплантатній моделі на мишах з SCID.

На фігурі 4e представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин MDA-MB-468 в ксенотрансплантатній моделі на безтимусних "голих" мишах.

На фігурі 4f представлена ефективність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 або DM4, по відношенню до клітин COLO205 аденокарциноми ободової і прямої кишки в ксенотрансплантатній моделі на безтимусних "голих" мишах.

На фігурі 5a показано конкурентне зв'язування mAb до LY75 і mAb до LY75, кон'югованого з MCC-DM1.

На фігурі 5b показано неконкурентне зв'язування LY75_A1 і mAb до LY75, кон'югованого з MCC-DM1.

На фігурах 6a-6j показані графічні представлення зв'язування антитіла LY75_A1 з пептидами LY75 в пептидній мікроматриці.

На фігурі 7 показано вирівнювання амінокислотних послідовностей пептидів, з якими зв'язується антитіло LY75_A1, як у мікроматричному аналізі пептидів, так і в аналізі пептидів за методом соосадження. Виділені пептиди, ймовірно, утворюють епітоп, що розпізнається антитілом LY75_A1.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Дане розкриття стосується виділених антитіл, що зв'язуються з білком LY75, які описані під SEQ ID NO:15, як стисло викладено у даному документі.

На додаток, антитіла до LY75 за даним винаходом можуть являти собою біспецифічну молекулу і у такій якості можуть викликати реакцію антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) у присутності ефекторних клітин, знешкоджуючи, таким чином, клітини, які експресують LY75.

На додаток, антитіла до LY75 за даним винаходом можуть являти собою біспецифічну молекулу і у такій якості можуть викликати цитотоксичну Т-клітинну реакцію у присутності ефекторних клітин, знешкоджуючи, таким чином, клітини, які експресують LY75.

На додаток, антитіла до LY75 за даним винаходом можуть інтерналізуватися при контакті з клітинами, які експресують рецептор LY75. Як обговорюється у даному документі, рецептор LY75 надекспресується і/або диференціально експресується у визначених ракових клітинах, у тому числі, без обмежень, при раку нирки, раку печінки, раку стравоходу, раку голови і шиї, раку шкіри, раку щитоподібної залози, раку шлунка, раку ободової і прямої кишки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, раку молочної залози, раку яєчника, раку сечового міхура, лейкозі, переважно гострому мієлоїдному лейкозі або хронічному лімфоцитарному лейкозі,

мієломі, переважно множинній мієломі, лімфомі, переважно DLBCL, В-клітинній лімфомі, фолікулярній лімфомі, мантійноклітинній лімфомі, лімфомі з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинній лімфомі, збагаченій Т-клітинами/гістіоцитами, лімфомі Беркітта, лімфоплазмоцитарній лімфомі, дрібноклітинній лімфоцитарній лімфомі, лімфомі з клітин маргінальної зони, Т-клітинній лімфомі, периферійній Т-клітинній лімфомі, анапластичній великоклітинній лімфомі і ангіоімунобластній Т-клітинній лімфомі, а також раку легені.

У зв'язку з цим, якщо антитіла до LY75 за даним винаходом кон'юговані з лікарськими засобами (як іноді називаються у даному документі "кон'югатами антитіло-лікарський засіб" або "ADC"), то інтерналізація цих молекул ADC раковими клітинами призводить до загибелі клітин і, таким чином, лікування пухлини.

У даному винаході представлені антитіла, які мають конкретні структурні особливості, такі як CDR-області з конкретними амінокислотними послідовностями. У даному документі описаний набір CDR, які можуть утворювати афінний реагент, наприклад, антитіло, який характеризується зв'язуванням з LY75.

Таким чином, у даному розкритті представлені антитіла, переважно виділені антитіла (які, як стисло викладено нижче, включають велику різноманітність добре відомих структур, похідних, міметиків і кон'югатів антитіл), нуклеїнові кислоти, які кодують ці антитіла, клітини-хазяї, застосовувані для одержання антитіл, способи одержання антитіл і фармацевтичні композиції, що містять антитіла і необов'язково фармацевтичний носій, способи лікування і діагностики, що включають застосування антитіл, і застосування антитіл для лікування форм раку.

Білки LY75

Лімфоцитарний антиген 75 діє як ендоцитозний рецептор, що спрямовує захоплені антигени з позаклітинного простору у спеціалізований антиген-процесуючий компартмент, і, як вважають, викликає зниження проліферації В-лімфоцитів.

Згідно з SWISS-PROT лімфоцитарний антиген 75 експресується в селезінці, тимусі, товстій кишці і лімфоцитах периферійної крові. Він був виявлений у лініях мієлоїдних клітин і лімфоїдних В-клітин. Ізоформи, позначені у даному документі як OGTA076b і OGTA076c, експресуються у злоякісних клітинах лімфоми Ходжкіна, які називаються клітинами Ходжкіна і Рид-Штернберга (HRS). LY75 діє як ендоцитозний рецептор, що спрямовує захоплені антигени з позаклітинного простору у спеціалізований антиген-процесуючий компартмент. Він викликає зниження проліферації В-лімфоцитів.

Експресія LY75 спостерігалася при раку підшлункової залози, сечового міхура, яєчника, молочної залози (у тому числі тричі негативному), ободової і прямої кишки, стравоходу, шкіри, щитоподібної залози і легені (недрібноклітинному), а також при множинній мієломі і багатьох різних підтипах лімфоми (у тому числі DLBCL) і лейкозу.

Антитіло за даним винаходом у деяких випадках може перехресно реагувати з LY75 від виду, відмінного від людини. Наприклад, для полегшення проведення клінічного випробування антитіла за даним винаходом можуть перехресно реагувати з молекулами LY75 мишей або приматів. В альтернативному випадку у деяких варіантах здійснення антитіла можуть мати повну специфічність до LY75 людини і можуть не характеризуватися видовою перехресною реактивністю або іншими її типами по відношенню до молекул, відмінних від людських.

Антитіла

У даному винаході представлені антитіла до LY75, зазвичай терапевтичні і/або діагностичні антитіла, описані у даному документі. Антитіла, що знаходять застосування у даному винаході, можуть приймати ряд форматів, описаних у даному документі, що включають традиційні антитіла, а також похідні, фрагменти і міметики антитіл, описані нижче. В одному варіанті здійснення у даному винаході представлені структури антитіл, що містять набір з 6 CDR, визначених у даному документі (що містять невелику кількість амінокислотних змін, описаних нижче).

"Антитіло", як використовується у даному документі, включає велику різноманітність структур, зрозумілих фахівцям у даній галузі, які у деяких варіантах здійснення містять як мінімум набір з 6 CDR, визначених у даному документі; що включають, без обмежень, традиційні антитіла (у тому числі як моноклональні, так і поліклональні антитіла), гуманізовані і/або химерні антитіла, фрагменти антитіл, сконструйовані антитіла (наприклад, які мають амінокислотні модифікації, стисло викладені нижче), поліспецифічні антитіла (у тому числі біспецифічні антитіла) і інші аналоги, відомі з рівня техніки.

Структурні одиниці традиційних антитіл зазвичай включають в себе тетрамер. Кожний тетрамер зазвичай містить дві ідентичні пари поліпептидних ланцюгів, при цьому кожна пара має один "легкий" (який зазвичай має молекулярну масу приблизно 25 кДа) і один "важкий" ланцюг (який зазвичай має молекулярну масу приблизно 50-70 кДа). Легкі ланцюги людини

класифікуються як легкі каппа- і лямбда-ланцюги. Важкі ланцюги класифікуються як мю, дельта, гамма, альфа або епсилон і відповідно визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgG, IgA і IgE. IgG має декілька підкласів, що включають, без обмежень, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. IgM має підкласи, що включають, без обмежень, IgM1 і IgM2. Таким чином, "ізотип", як використовується у даному документі, означає будь-який з підкласів імуноглобулінів, визначуваних хімічними і антигенними характеристиками їхніх константних областей. Відомими ізотипами імуноглобулінів людини є IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD і IgE. Слід розуміти, що терапевтичні антитіла також можуть включати гібриди з будь-якої комбінації ізотипів і/або підкласів.

У багатьох варіантах здійснення у даному винаході застосовуються ізотипи IgG, при цьому у ряді шляхів застосування особливе застосування знаходить IgG1.

Амінокінцева частина кожного ланцюга містить варіабельну область з приблизно 100-110 або більше амінокислот, які несуть основну відповідальність за розпізнавання антигену. У варіабельній області в у кожному з V-доменів важкого ланцюга і легкого ланцюга три петлі зібрані разом з утворенням антигензв'язувальної ділянки. Кожна з петель називається областю, що визначає комплементарність (далі у даному документі згадуваної як "CDR"), у якій мінливість амінокислотної послідовності є найбільш значною. "Варіабельний" стосується того факту, що визначені сегменти варіабельної області істотно відрізняються за послідовністю серед антитіл. Варіабельність у межах варіабельної області розподілена нерівномірно. Насправді V-області містять відносно інваріантні ділянки, названі каркасними областями (FR), з 15-30 амінокислот, розділені більш короткими областями надзвичайної варіабельності, званими "гіперваріабельними областями", кожна з яких має довжину 9-15 амінокислот або більше.

Кожна VH і VL містить три гіперваріабельні області ("області, що визначають комплементарність", "CDR") і чотири FR, розміщені від амінокінця до карбоксильного кінця у наступному порядку: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Гіперваріабельна область зазвичай охоплює амінокислотні залишки з амінокислотних залишків приблизно 24-34 (LCDR1; "L" означає легкий ланцюг), 50-56 (LCDR2) і 89-97 (LCDR3) у варіабельній області легкого ланцюга і десь приблизно 31-35B (HCDR1; "H" означає важкий ланцюг), 50-65 (HCDR2) і 95-102 (HCDR3) у варіабельній області важкого ланцюга; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), і/або залишки, що утворюють гіперваріабельну петлю (наприклад, залишки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) і 91-96 (LCDR3) у варіабельній області легкого ланцюга і 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) і 96-101 (HCDR3) у варіабельній області важкого ланцюга; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Конкретні CDR за даним винаходом описані нижче.

У всьому даному описі при посиланні на залишок у варіабельному домені (приблизно залишки 1-107 варіабельної області легкого ланцюга і залишки 1-113 варіабельної області важкого ланцюга) зазвичай застосовується система нумерації за Kabat (наприклад, Kabat et al., вище (1991)).

CDR вносять вклад в утворення антигензв'язувальної або, більш конкретно, епітопзв'язувальної ділянки антитіл. Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" стосується ділянки на антигені, з якою специфічно зв'язується імуноглобулін або антитіло. Епітопи можуть бути утворені як суміжними амінокислотами, так і несуміжними амінокислотами, розміщеними поряд завдяки згортанню білка у третинну структуру. Епітопи, утворені суміжними амінокислотами, зазвичай зберігаються під впливом денатуруючих розчинників, тоді як епітопи, утворені завдяки згортанню в третинну структуру, зазвичай втрачаються при обробці денатуруючими розчинниками. Епітоп зазвичай містить щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Описані у даному документі способи визначення того, з якими епітопами зв'язується вказане антитіло (тобто картування епітопів), добре відомі з рівня техніки і включають, наприклад, аналізи за методами імуноблотингу і імунопреципітації, де пептиди, які перекриваються, або суміжні пептиди LY75 досліджують по відношенню до реактивності з вказаним антитілом до LY75. Способи визначення просторової конформації епітопів включають методики, відомі з рівня техніки, і методики, описані у даному документі, наприклад, рентгенівську кристалографію і 2-мерну спектроскопію ядерного магнітного резонансу (див., наприклад, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Термін "картування епітопів" стосується способу ідентифікації молекулярних детермінант розпізнавання антигену антитілом.

Карбоксикінцева частина кожного ланцюга визначає константну область, яка несе основну відповідальність за ефекторну функцію. Kabat і соавт. зібрали дані про ряд первинних послідовностей варіабельних областей важких ланцюгів і легких ланцюгів. На основі ступеня консервативності послідовностей вони віднесли окремі первинні послідовності до CDR і

каркасних ділянок і склали їхній перелік (див. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

У підкласі імуноглобулінів IgG у важкому ланцюзі знаходиться декілька доменів імуноглобулінів. Під "доменом імуноглобуліну (Ig)" у даному документі мається на увазі область імуноглобуліну, яка має чітко виражену третинну структуру. У даному винаході інтерес становлять домени важких ланцюгів, що включають константні домени важких ланцюгів (CH) і шарнірні домени. Стосовно антитіл IgG кожний з ізотипів IgG має три CH-області. Відповідно, "CH"-домени стосовно IgG є наступними: "CH1" стосується положень 118-220 згідно з EU-індексом за Kabat. "CH2" стосується положень 237-340 згідно з EU-індексом за Kabat, а "CH3" стосується положень 341-447 згідно з EU-індексом за Kabat.

Іншим типом домену важкого ланцюга Ig є шарнірна область. Під "шарнірною ділянкою", або "шарнірною областю", або "шарнірною областю антитіла", або "шарнірною областю імуноглобуліну" у даному документі мається на увазі гнучкий поліпептид, що містить амінокислоти між першим і другим константними доменами антитіла. У структурному плані CH1-домен IgG закінчується положенням 220 згідно з EU, а CH2-домен IgG починається з положення залишку 237 згідно з EU. Таким чином, для антитіла IgG шарнірна ділянка у даному документі визначається як така, що включає положення з 221 (D221 в IgG1) до 236 (G236 в IgG1), де нумерація відповідає EU-індексу за Kabat. У деяких варіантах здійснення, наприклад, стосовно Fc-області, включена нижня шарнірна ділянка, при цьому "нижня шарнірна ділянка" зазвичай стосується положень 226 або 230.

Особливий інтерес у даному винаході становлять Fc-області. Під "Fc", або "Fc-областю", або "Fc-доменом", як використовується у даному документі, мається на увазі поліпептид, що містить константну область антитіла, за виключенням першого домену константної області імуноглобуліну і у деяких випадках частини шарнірної ділянки. Таким чином, Fc стосується останніх двох доменів константної області імуноглобулінів IgA, IgD і IgG, останніх трьох доменів константної області імуноглобулінів IgE і IgM і гнучкої шарнірної ділянки, розміщеної у напрямку N-кінця від цих доменів. У випадку IgA і IgM Fc може містити J-ланцюг. У випадку IgG Fc-домен містить домени імуноглобулінів Cγ2 і Cγ3 (Cγ2 і Cγ3) і нижню шарнірну область між Cγ1 (Cγ1) і Cγ2 (Cγ2). Хоча межі Fc-області можуть варіювати, Fc-область важкого ланцюга IgG людини зазвичай визначається як така, що включає залишки від C226 або P230 до її карбоксильного кінця, де нумерація відповідає EU-індексу за Kabat. У деяких варіантах здійснення, як більш детально описано нижче, амінокислотні модифікації виробляють в Fc-область, наприклад, зі змінюванням зв'язування з одним або більше FcγR-рецепторами або з FcRn-рецептором.

У деяких варіантах здійснення антитіла є антитілами повної довжини. Під "антитілом повної довжини" у даному документі мається на увазі структура, що є природною біологічною формою антитіла, що містить варіабельні і константні області, що містять одну або більше модифікацій, стисло викладених у даному документі.

В альтернативному випадку антитіла можуть являти собою ряд структур, що включають, без обмежень, фрагменти антитіл, моноклональні антитіла, біспецифічні антитіла, мініантитіла, доменні антитіла, синтетичні антитіла (іноді звані у даному документі "міметиками антитіл"), химерні антитіла, гуманізовані антитіла, продукти злиття антитіл (іноді звані у даному документі "кон'югатами антитіл") і відповідно фрагменти кожного з них. Структури, засновані на застосуванні набору CDR, включені у визначення "антитіла".

В одному варіанті здійснення антитіло являє собою фрагмент антитіла. Конкретні фрагменти антитіл включають, без обмежень, (i) Fab-фрагмент, що містить VL-, VH-, CL- і CH1-домени, (ii) Fd-фрагмент, що містить VH- і CH1-домени, (iii) Fv-фрагмент, що містить VL- і VH-домени окремого антитіла; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, включений шляхом посилання у всій своїй повноті), що містить окрему варіабельну область, (v) виділені CDR-області, (vi) F(ab')2-фрагменти, бівалентний фрагмент, що містить два зв'язаних Fab-фрагменти, (vii) одноланцюгові молекули Fv (scFv), де VH-домен і VL-домен зв'язані пептидним лінкером, що забезпечує об'єднання двох доменів з утворенням антигензв'язувальної ділянки (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, включений шляхом посилання у всій своїй повноті), (viii) біспецифічні одноланцюгові Fv (WO 03/11161, включена шляхом посилання у всій своїй повноті) і (ix) "діатіла" або "триатіла", полівалентні або поліспецифічні фрагменти, сконструйовані шляхом злиття генів (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO 94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті).

Химерні і гуманізовані антитіла

У деяких варіантах здійснення антитіло може являти собою комбінацію від різних видів, наприклад, химерне антитіло і/або гуманізоване антитіло. Інакше кажучи, у даному винаході

набори CDR можна застосовувати з каркасними і константними областями, відмінними від конкретно описаних у даному документі за послідовністю.

У цілому, як "химерні антитіла", так і "гуманізовані антитіла" стосуються антитіл, у яких об'єднані області від більше ніж одного виду. Наприклад, "химерні антитіла" традиційно містять варіабельну(варіабельні) область(області) від миші (або, у деяких випадках, пацюка) і константну(константні) область(області) від людини. "Гуманізовані антитіла" зазвичай стосуються антитіл, відмінних від людських, у яких каркасні області варіабельних доменів були замінені на послідовності, виявлені в антитілах людини. Як правило, у гуманізованому антитілі все антитіло, за виключенням CDR, кодується полінуклеотидом людського походження або за виключенням своїх CDR ідентично такому антитілу. CDR, деякі або всі з яких кодуються нуклеїновими кислотами, що походять від організму, відмінного від людини, трансплантують у каркасну ділянку зі структурою бета-листа у варіабельній області антитіла людини з одержанням антитіла, специфічність якого визначається трансплантованими CDR. Одержання таких антитіл описано, наприклад, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті. "Зворотна мутація" за типом заміни вибраних залишків акцепторних каркасних ділянок на відповідні донорні залишки часто необхідна для відновлення афінності, що втрачається конструктом після початкової трансплантації (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті). Гуманізоване антитіло в оптимальному випадку також містить щонайменше частину константної області імуноглобуліну, зазвичай імуноглобуліну людини, і, відповідно, зазвичай містить Fc-область людини. Гуманізовані антитіла також можна одержувати із застосуванням мишей з імунною системою, підданою генній інженерії. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, включений шляхом посилання у всій своїй повноті. З рівня техніки добре відомий ряд методик і способів гуманізації і реконструювання антитіл, відмінних від людських (див. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), і літературні джерела, згадувані там, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті). Способи гуманізації включають, без обмежень, способи, описані в Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; Heetal., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті. Гуманізація або інші способи зниження імуногенності варіабельних областей антитіл, відмінних від людських, може включати способи зміни поверхні, описані, наприклад, в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, включеному шляхом посилання у всій своїй повноті. В одному варіанті здійснення вихідне антитіло було піддане дозріванню афінності, відомому з рівня техніки. Для гуманізації і дозрівання афінності можна використовувати структурні способи, наприклад, описані в USSN 11/004590. Для гуманізації і/або дозрівання афінності варіабельних областей антитіл можна використовувати способи на основі відбору, у тому числі, без обмежень, способи, описані в Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272 (16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 (37):22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16 (10) 753-759, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті. Інші способи гуманізації можуть включати трансплантацію лише частин CDR, у тому числі, без обмежень, способи, описані в USSN 09/810510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті.

В одному варіанті здійснення антитіла за даним винаходом можуть являти собою поліспецифічні антитіла, і зокрема, біспецифічні антитіла, також іноді звані "діатілами". Ці антитіла, які зв'язуються з двома (або більше) різними антигенами або різними епітопами на одному і тому ж антигені. Діатіла можна одержувати за допомогою ряду способів, відомих з рівня техніки (Holligerand Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, включений шляхом посилання у всій своїй повноті), наприклад, одержувати хімічним шляхом або з міжвидової гібридоми.

В одному варіанті здійснення антитіло являє собою міні антитіло. Міні антитіла являють собою мінімізовані антитілоподібні білки, що містять scFv, з'єднаний з CH3-доменом. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, включений шляхом посилання у всій своїй повноті. У деяких випадках scFv може бути з'єднаний з Fc-областю і може містити деяку частину шарнірної області або всю її. Слід відмітити, що міні антитіла включені у визначення "антитіла", не

дивлячись на те, що вони не мають повний набір CDR.

Антитіла за даним винаходом зазвичай є виділеними або рекомбінантними. "Виділений", використовуваний для опису різних поліпептидів, розкритих у даному документі, означає поліпептид, який був ідентифікований і відокремлений від і/або вилучений з клітини або культури клітин, у якій він експресувався. Таким чином, виділене антитіло призначено для позначення антитіла, практично вільного від інших антитіл з іншою специфічністю до антигенів (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з LY75, практично вільне від антитіл, які специфічно зв'язуються з антигенами, відмінними від LY75). Таким чином, "виділене" антитіло знаходиться у формі, яка зазвичай не виявляється у природі (наприклад, яка не зустрічається у природі). Виділене антитіло, визначене у даному документі, може в одному варіанті здійснення містити щонайменше одну амінокислоту, яка не зустрічається в антитілі, "яке зустрічається у природі". Ця амінокислота може бути введена шляхом додавання або заміни. Буде зрозуміло, що введена амінокислота може бути амінокислотою, яка зустрічається у природі або не зустрічається у природі. У деяких варіантах здійснення антитіла за даним винаходом являють собою рекомбінантні білки, виділені білки або практично чисті білки. "Виділений" білок не супроводжується щонайменше деякою частиною матеріалу, з яким він зазвичай зв'язаний у своєму природному стані, наприклад, що становить щонайменше приблизно 5 % або щонайменше приблизно 50 % за вагою від загального білка у вказаному зразку. Зрозуміло, що виділений білок може становити від 5 до 99,9 % за вагою від вмісту загального білка залежно від обставин. Наприклад, білок може бути одержаний у значно більш високій концентрації шляхом застосування індукованого промотора або промотора, що забезпечує високу експресію, завдяки чому білок одержують при підвищених рівнях концентрації. У випадку рекомбінантних білків визначення включає одержання антитіла у більшій різноманітності організмів і/або клітин-хазяїв, відомих у даній галузі техніки, у яких воно не визначається у природних умовах. Зазвичай виділений поліпептид одержують за допомогою щонайменше одного етапу очищення. "Виділене антитіло" стосується антитіла, практично вільного від інших антитіл з іншою специфічністю до антигенів. Наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з LY75, практично вільне від антитіл, які специфічно зв'язуються з антигенами, відмінними від LY75.

Виділені моноклональні антитіла з різною специфічністю можна об'єднувати у чітко визначену композицію. Таким чином, наприклад, антитіло за даним винаходом можна необов'язково і окремо включити або не включити у склад, як додатково обговорюється нижче.

Антитіла до LY75 за даним винаходом специфічно зв'язуються з LY75 (наприклад, SEQ ID NO:15). "Специфічне зв'язування", або "специфічно зв'язується з", або "специфічний до" по відношенню до конкретного антигену або епітопа означає зв'язування, яке вимірюваним чином відмінне від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування можна виміряти, наприклад, шляхом визначення зв'язування молекули порівняно зі зв'язуванням контрольної молекули, яка зазвичай являє собою молекулу вихідної структури, яка не має активності зв'язування. Наприклад, специфічне зв'язування можна визначити за конкуренцією з контрольною молекулою, подібною до цільової.

Специфічне зв'язування з конкретним антигеном або епітопом може проявлятися, наприклад, антитілом, яке має K_D для антигену або епітопа, що становить щонайменше приблизно 10^{-4} М, щонайменше приблизно 10^{-5} М, щонайменше приблизно 10^{-6} М, щонайменше приблизно 10^{-7} М, щонайменше приблизно 10^{-8} М, щонайменше приблизно 10^{-9} М, в альтернативному випадку щонайменше приблизно 10^{-10} М, щонайменше приблизно 10^{-11} М, щонайменше приблизно 10^{-12} М або більше, де K_D стосується константи швидкості дисоціації при конкретній взаємодії антитіла й антигену. Антитіло, яке специфічно зв'язується з антигеном, зазвичай буде мати K_D, в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 або більше разів більшу для контрольної молекули порівняно з антигеном або епітопом. Однак, у даному винаході при введенні ADC на основі антитіл до LY75 за даним винаходом важливо, щоб K_D була достатньою для забезпечення інтерналізації і, отже, загибелі клітин без значних побічних ефектів.

Специфічне зв'язування з конкретним антигеном або епітопом також може проявлятися, наприклад, антитілом, яке має K_A або K_a для антигену або епітопа, щонайменше в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 або більше разів більшу для епітопа порівняно з контролем, де K_A або K_a стосується константи швидкості асоціації при конкретній взаємодії антитіла і антигену.

Стандартні аналізи для оцінки здатності антитіл до зв'язування з LY75 можуть виконуватися на рівні білків або клітин і відомі з рівня техніки, у тому числі, наприклад, різновиди ELISA, вестерн-блотингу, RIA, аналізи на BIAcore® і аналіз за методом проточної цитометрії. Підходящі аналізи детально описані у розділі "Приклади". Кінетику зв'язування (наприклад, афінність зв'язування) антитіл також можна оцінювати за допомогою стандартних аналізів, відомих з рівня

техніки, як, наприклад, за допомогою аналізу на системі Biacore®. Для оцінки зв'язування з клітинами Raji або Daudi B-клітинної пухлини клітини Raji (номер депонування в ATCC CCL-86) або Daudi (номер депонування в ATCC CCL-213) можна одержувати із загальнодоступних джерел, таких як Американська колекція типових культур, і застосовувати у стандартних аналізах, таких як аналізи за методом проточної цитометрії.

Антитіла до LY75

У даному винаході представлені антитіла до LY75, які зв'язуються з LY75 (SEQ ID NO:15) і можуть інтерналізуватися при контакті з клітинами, на клітинній поверхні яких експресується LY75, або можуть викликати реакцію ADCC у присутності ефекторних клітин або викликати цитотоксичну Т-клітинну реакцію у присутності ефекторних клітин. Ці антитіла згадуються у даному документі як "антитіла, які зв'язуються з LY75" або, для простоти опису, "антитіла до LY75".

Антитіла до LY75 інтерналізуються при контакті з клітинами, зокрема, пухлинними клітинами, на поверхні яких експресується LY75. Інакше кажучи, антитіла до LY75, визначені у даному документі, які також містять кон'юговані лікарські засоби, інтерналізуються пухлинними клітинами, що призводить до вивільнення лікарського засобу і наступної загибелі клітин, забезпечуючи лікування форм раку, що характеризуються експресією LY75. Інтерналізацію у даному випадку можна виміряти декількома способами. В одному варіанті здійснення антитіла до LY75 за даним винаходом приводять у контакт з клітинами, такими як лінія клітин, стисло описана у даному документі, за допомогою стандартних аналізів, як, наприклад, з використанням MabZap. Для фахівця у даній галузі буде очевидно, що аналіз з використанням MabZap ілюструє очікуваний ефект, який можна спостерігати для кон'югата антитіло-лікарський засіб (ADC). В останньому випадку ADC буде інтерналізуватися, подаючи таким чином лікарський засіб в клітину. Токсичний лікарський засіб буде мати здатність до знешкодження клітини, тобто до знешкодження цільової ракової клітини. Дані аналізів MabZap легко приймаються фахівцями у даній галузі як ілюстративні для аналізів ADC (Kohls, M and Lappi, D., [2000] Biotechniques, vol. 28, no. 1, 162-165).

У цих варіантах здійснення аналізів in vitro антитіла до LY75 за даним винаходом додають разом з антитілом до антитіл до LY75, що містить токсин; наприклад, антитіло до LY75 може бути мишиним або гуманізованим, а антитіло до антитіл до LY75 може бути антитілом до мишиних антитіл або антитілом до гуманізованих антитіл і містити токсин, такий як сапорин. Після утворення комплексу [антитіло до LY75 за даним винаходом]-[кон'югат антитіло до антитіла до LY75-лікарський засіб] комплекс інтерналізується, і лікарський засіб (наприклад, сапорин) вивільняється, викликаючи загибель клітин. Лікарський засіб вивільняється тільки після інтерналізації, і тому клітини за відсутності інтерналізації залишаються життєздатними. Як стисло викладено нижче, без обмеження будь-якою теорією, у терапевтичних шляхах застосування антитіло до антитіла до LY75 містить токсин, і після інтерналізації зв'язок між антитілом і токсином розщеплюється з вивільненням токсину і знешкодженням клітини.

На додаток, антитіла до LY75 у присутності ефекторних клітин викликають реакцію ADCC, зокрема, по відношенню до пухлинних клітин, на поверхні яких експресується LY75.

В одному варіанті здійснення антитіло містить області, які визначають комплементарність (CDR), або варіабельні області (VR) важких і легких ланцюгів конкретного антитіла, описаного у даному документі (наприклад, згадуваного у даному документі як "LY75_A1"). Відповідно, в одному варіанті здійснення антитіло містить домени CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) антитіла LY75_A1, що має послідовність, показану під SEQ ID NO:1, і домени CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області легкого ланцюга (VL) антитіла LY75_A1, що має послідовність, показану під SEQ ID NO:2.

В іншому варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить першу vhCDR, що містить SEQ ID NO:5; другу vhCDR, що містить SEQ ID NO:6; і третю vhCDR, що містить SEQ ID NO:7; і варіабельну область легкого ланцюга, що містить першу vlCDR, що містить SEQ ID NO:8; другу vlCDR, що містить SEQ ID NO:9; і третю vlCDR, що містить SEQ ID NO:10.

В іншому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом зв'язуються з LY75 людини і містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO:1, і її консервативні модифікації послідовності. Антитіло може додатково містити варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO:2, і її консервативні модифікації послідовності.

У додатковому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом зв'язуються з LY75 людини і містять варіабельну область важкого ланцюга і варіабельну область легкого ланцюга, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і/або 2, і їхні

консервативні модифікації послідовності. Як використовується у даному документі, термін "консервативна модифікація послідовності" стосується, наприклад, заміни амінокислоти амінокислотою, яка має аналогічні характеристики. Для фахівця у даній галузі зазвичай є загальновідомим, які з цих замін можуть вважатися консервативними. Інші модифікації, які можуть вважатися консервативними модифікаціями послідовності, включають, наприклад, глікозилювання.

Виділені антитіла, що містять варіабельні області важких і легких ланцюгів, що характеризуються щонайменше 80 %, або щонайменше 85 %, або щонайменше 90 %, або щонайменше 91 %, або щонайменше 92 %, або щонайменше 93 %, або щонайменше 94 %, або щонайменше 95 %, або щонайменше 96 %, або щонайменше 97 %, або щонайменше 98 %, або щонайменше 99 %, або більшою ідентичністю послідовності з будь-якої з вищенаведених послідовностей, також включені у даний винахід. Проміжні діапазони вищевказаних значень, наприклад, варіабельні області важких і легких ланцюгів, що характеризуються щонайменше 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % або 95-100 % ідентичністю послідовності з будь-якої з вищенаведених послідовностей, також маються на увазі як такі, які охоплені даним винаходом. В одному варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:1 або послідовність, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну SEQ ID NO:1. В іншому варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO:2 або послідовність, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну SEQ ID NO:2. В іншому варіанті здійснення антитіло містить каркасну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну каркасній області варіабельної області важкого ланцюга з SEQ ID NO:1, що містить SEQ ID NO:16, 17 і 18. В іншому варіанті здійснення антитіло містить каркасну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % ідентичну каркасній області варіабельної області легкого ланцюга з SEQ ID NO:2, що містить SEQ ID NO:19, 20 і 21.

В одному варіанті здійснення антитіло за даним винаходом являє собою антитіло до LY75 (зване у даному документі "антитілом LY75_A1"), що містить наступні CDR, а також його варіанти, що містять невелику кількість амінокислотних варіантів:

A1	SEQ ID NO
CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга	5
CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга	6
CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга	7
CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга	8
CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга	9
CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга	10

У даному документі також розкриті варіабельні області важких і легких ланцюгів, які містять набори CDR за даним винаходом, а також важкі і легкі ланцюги повної довжини (наприклад, що також містять константні області). Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, набори CDR за даним винаходом можна вбудувати у мишині, гуманізовані або людські константні області (у тому числі каркасні області). Відповідно, у даному винаході представлені варіабельні області важких і легких ланцюгів, щонайменше приблизно на 90 %-99 % ідентичні SEQ ID, розкритим у даному документі, при цьому всі з 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 і 99 % знаходять застосування у даному винаході.

Антитіла, які зв'язуються з тим же епітопом, що і антитіла до LY75 за даним винаходом

В іншому варіанті здійснення у даному винаході представлені антитіла, які зв'язуються з тим

же епітопом на LY75 людини, що і будь-яке з моноклональних антитіл до LY75 за даним винаходом. Термін "зв'язується з тим же епітопом" по відношенню до двох або більше антитіл означає, що антитіла конкурують за зв'язування з антигеном і зв'язуються з тими ж безперервними або переривчастими сегментами, що перекриваються або охоплюються, з амінокислот. Фахівці у даній галузі розуміють, що фраза "зв'язується з тим же епітопом" не обов'язково означає, що антитіла зв'язуються саме з тими ж амінокислотами, хоча в одному варіанті здійснення вона може бути визначена таким чином. В іншому варіанті здійснення точно визначені амінокислоти, з якими зв'язуються антитіла, можуть відрізнятися. Наприклад, перше антитіло може зв'язуватися з сегментом з амінокислот, повністю охоплених сегментом з амінокислот, з яким зв'язується друге антитіло. В іншому прикладі перше антитіло зв'язується з одним або більше сегментами з амінокислот, що значно перекриваються з одним або більше сегментами, з якими зв'язується друге антитіло. Для цілей даного документа такі антитіла вважаються "такими, що зв'язуються з тим же епітопом".

Відповідно, даний винахід в одному варіанті здійснення також охоплює антитіла, які зв'язуються з епітопом на LY75, що включає у себе весь епітоп, що розпізнається конкретними антитілами, описаними у даному документі, або його частину (наприклад, ту ж або область, що перекривається, або область, що знаходиться у межах даної області або охоплює її). Даний винахід також охоплює антитіла, які специфічно зв'язуються щонайменше з одним, наприклад, з 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, пептидом(пептидами), вибраними з групи, що включає SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33, 34, 35, 36 або 37, або їхніми фрагментами, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 суміжних амінокислот. У додатковому варіанті здійснення епітоп, що розпізнається антитілами за даним винаходом, містить щонайменше один пептид, щонайменше два або щонайменше три пептиди, вибрані з групи, що включає SEQ ID NO: 27, 29, 30, 34, 35, 36 або 37, або їхні фрагменти, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 суміжних амінокислот. У додатковому варіанті здійснення епітоп, що розпізнається антитілами за даним винаходом, містить щонайменше один пептид, наприклад, один, два або три пептиди, вибрані з групи, що включає SEQ ID NO:30, 36 і 37, або їхні фрагменти, де вказані фрагменти містять щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5, щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8, щонайменше 9 або щонайменше 10 суміжних амінокислот.

Даний винахід також охоплює антитіла, які зв'язуються з тим же епітопом, і/або антитіла, які конкурують за зв'язування з LY75 людини з антитілами, описаними у даному документі. Антитіла, які розпізнають той же епітоп або конкурують за зв'язування, можна ідентифікувати із застосуванням стандартних методик. Такі методики включають, наприклад, імунологічний аналіз, що демонструє здатність одного антитіла до блокування зв'язування іншого антитіла з цільовим антигеном, тобто аналіз конкурентного зв'язування. Конкурентне зв'язування визначають в аналізі, у якому досліджуваний імуноглобулін інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном, таким як LY75. Відомо ряд типів аналізів конкурентного зв'язування, наприклад, твердофазний прямий або непрямий радіоімунологічний аналіз (RIA), твердофазний прямий або непрямий імуноферментний аналіз (EIA), конкурентний сандвіч-аналіз (див. Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); твердофазний прямий EIA з використанням комплексу біотин-авідин (див. Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); твердофазний прямий аналіз з міченням, твердофазний прямий сандвіч-аналіз з міченням (див. Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазний прямий RIA з міченням з використанням мітки I-125 (див. Morel et at, Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); твердофазний прямий EIA з використанням комплексу біотин-авідин (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)) і прямий RIA з міченням (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). Зазвичай такий аналіз включає застосування очищеного антигену, зв'язаного з твердою поверхнею або клітинами, які несуть будь-який з них, неміченого досліджуваного імуноглобуліну і міченого еталонного імуноглобуліну. Конкурентне інгібування вимірюють шляхом визначення кількості мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або з клітинами, у присутності досліджуваного імуноглобуліну. Досліджуваний імуноглобулін зазвичай присутній у надлишку. Якщо конкуруюче антитіло присутнє у надлишку, воно зазвичай буде інгібувати специфічне зв'язування еталонного антитіла із загальним антигеном щонайменше на 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-99 % або більше.

Інші методики включають, наприклад, способи картування епітопів, такі як рентгенівські аналізи кристалів комплексів антиген:антитіло, що забезпечують атомне розділення епітопа. В інших способах відслідковують зв'язування антитіла з фрагментами антигенів або мутантними

варіантами антигенів, де втрата зв'язування внаслідок модифікації амінокислотного залишку у послідовності антигену часто вважається вказівкою на компонент епітопа. На додаток, також можна застосовувати обчислювальні комбінаторні способи для картування епітопів. Ці способи засновані на здатності антитіл, які становлять інтерес, до афінного виділення специфічних коротких пептидів з комбінаторних фаг-дисплейних бібліотек пептидів. Пептиди потім розглядають як лідерні для визначення епітопа, що відповідає антитілу, застосовуваному для скринінгу бібліотеки пептидів. Для картування епітопів також були розроблені обчислювальні алгоритми, які, як було показано, забезпечують картування конформаційних переривчастих епітопів.

У конкретному варіанті здійснення антитіло конкурує за зв'язування з LY75 з антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і 2, або амінокислотні послідовності, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентичні їм. В іншому варіанті здійснення антитіло конкурує за зв'язування з LY75 з антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, наведені під SEQ ID NO:1 і 2 (LY75_A1).

Інші антитіла за даним винаходом зв'язуються з епітопом на LY75, що розпізнається антитілами, описаними у даному документі. В іншому конкретному варіанті здійснення антитіло зв'язується з епітопом на LY75, що розпізнається антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, відповідно наведені під SEQ ID NO:1 і 2, або амінокислотні послідовності, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентичні їм. В іншому варіанті здійснення антитіло зв'язується з епітопом на LY75, що розпізнається антитілом, що містить варіабельні області важких і/або легких ланцюгів, що містять амінокислотні послідовності, наведені під SEQ ID NO:1 і 2 (LY75).

Встановлення характеристик моноклональних антитіл до LY75

Моноклональні антитіла за даним винаходом можна охарактеризувати за зв'язуванням з LY75 за допомогою ряду відомих методик. Як правило, антитіла спочатку характеризують за допомогою ELISA. Стисло, титраційні мікропланшети можна покривати очищеним LY75 в PBS, а потім блокувати нерелевантними білками, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), розведений у PBS. У кожну лунку додають розведення плазми крові мишей, імунізованих за допомогою LY75, і інкубують протягом 1-2 годин при 37 °C. Планшети промивають за допомогою PBS/Tween 20 і потім інкубують з поліклональним реагентом, антитілом кози до IgG людини, специфічним до Fc, кон'югованим з лужною фосфатазою, протягом 1 години при 37 °C. Після промивання планшети проявляють за допомогою субстрату ABTS і аналізують при OD 405. Переважно, для процедур злиття будуть використовувати мишей, у яких розвиваються найбільш високі титри.

Аналіз ELISA, описаний вище, можна застосовувати для скринінгу з виявленням антитіл і, отже, гібридом, які утворюють антитіла, які демонструють позитивну реактивність по відношенню до імуногена LY75. Гібридоми, які зв'язуються, переважно з високою афінністю, з LY75, можна потім пересіяти і додатково охарактеризувати. Один клон з кожної гібридоми, що зберігає реактивність вихідних клітин (за ELISA), можна потім вибрати для одержання клітинного банку і для очищення антитіл.

Для очищення антитіл до LY75 вибрані гібридоми можна вирощувати в обертових флаконах, дволітрових обертових колбах або інших системах культивування. Зразки надосадової рідини можна фільтрувати і концентрувати перед афінною хроматографією з білком A на сефарозі (Pharmacia, Піскатауей, Нью-Джерсі) для очищення білка. Після заміни буфера на PBS концентрацію можна визначити за OD_{280} із застосуванням коефіцієнта екстинкції 1,43 або, переважно, за допомогою нефелометричного аналізу. IgG можна перевірити за допомогою гель-електрофорезу і за допомогою антиген-специфічного способу.

Для визначення того, чи зв'язуються вибрані моноклональні антитіла до LY75 з унікальними епітопами, кожне антитіло можна біотинілювати за допомогою комерційно доступних реагентів (Pierce, Рокфорд, Іллінойс). Зв'язування біотинільованих mAb можна виявити за допомогою зонда, міченого стрептавідином. Для визначення ізотипу очищених антитіл можна проводити ізотипуючий ELISA із застосуванням методик, прийнятих у даній галузі техніки.

Наприклад, лунки титраційних мікропланшетів можна покрити 10 мкг/мл антитіла до Ig на ніч при 4 °C. Після блокування за допомогою 5 % BSA в планшетах проводять реакцію з 10 мкг/мл моноклональних антитіл або очищених ізотипових контролів при температурі навколишнього

середовища протягом двох годин. У лунках потім можна провести реакцію з кон'югованими зондами, специфічними до IgG1 або інших ізотипів. Планшети проявляють і аналізують, як описано вище.

Для дослідження зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують LY75, можна застосовувати проточну цитометрію. Стисло, лінії клітин і/або PBMC людини, які експресують мембранозв'язаний LY75 (вирощувані у стандартних умовах росту), змішують з моноклональними антитілами у різних концентраціях у PBS, що містить 0,1 % BSA при 4 °C, протягом 1 години. Після промивання проводять реакцію клітин з антитілом до IgG, міченим флуоресцеїном, у тих же умовах, що і при забарвленні первинним антитілом. Зразки можна аналізувати за допомогою приладу FACScan з використанням властивостей світлорозсіювання і бічного розсіювання для введення логічного обмеження за окремими клітинами і визначення зв'язування мічених антитіл. Можна застосовувати альтернативний аналіз із застосуванням флуоресцентної мікроскопії на додаток до аналізу за методом проточної цитометрії або замість нього. Клітини можна забарвлювати точно так, як описано вище, і вивчати за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Даний спосіб забезпечує візуалізацію окремих клітин, але може мати знижену чутливість залежно від щільності антигену.

Можна додатково досліджувати реактивність антитіл IgG до LY75 по відношенню до антигену LY75 за допомогою вестерн-блотингу. Стисло, можна одержувати клітинні екстракти з клітин, які експресують LY75, і піддавати електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію. Після електрофорезу відділені антигени переносять на нітроцелюлозні мембрани, блокують 20 % мишиною сироваткою крові і зондують моноклональними антитілами, які підлягають дослідженню. Зв'язування IgG можна виявити за допомогою антитіла до IgG, кон'югованого з лужною фосфатазою, і проявити за допомогою таблеток субстрату BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луїс, Міссурі).

Способи аналізу афінності зв'язування, перехресної реактивності і кінетики зв'язування різних антитіл до LY75 включають стандартні аналізи, відомі у даній галузі техніки, наприклад, аналіз поверхневого плазмонного резонансу (SPR) Biacore™ із застосуванням приладу для SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Уппсала, Швеція).

В одному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з LY75 людини, що містить SEQ ID NO:15. Переважно, антитіло за даним винаходом зв'язується з LY75 людини з високою афінністю.

Переважно, антитіло за даним винаходом зв'язується з білком LY75 з K_D 5 x 10^{-8} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 2 x 10^{-8} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 5 x 10^{-9} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 4 x 10^{-9} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 3 x 10^{-9} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 2 x 10^{-9} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 1 x 10^{-9} M або менше, зв'язується з білком LY75 з K_D 5 x 10^{-10} M або менше або зв'язується з білком LY75 з K_D 1 x 10^{-10} M або менше.

В одному варіанті здійснення антитіла за даним винаходом конкурують (наприклад, перехресно конкурують) за зв'язування з LY75 з конкретними антитілами до LY75, описаними у даному документі (наприклад, LY75_A1). Такі конкуруючі антитіла можна ідентифікувати на основі їхньої здатності до конкурентного інгібування зв'язування одного або більше mAb з LY75 у стандартних аналізах зв'язування з LY75. Наприклад, можна застосовувати стандартні аналізи ELISA, у яких рекомбінантний білок LY75 людини іммобілізований на планшеті, одне з антитіл є флуоресцентно міченим, і оцінюється здатність немічених антитіл до виведення міченого антитіла з конкуренції за зв'язування. Додатково або в альтернативному випадку можна застосовувати аналіз BIAcore для оцінки здатності антитіл до перехресної конкуренції. Здатність досліджуваного антитіла до інгібування зв'язування антитіла до LY75 за даним винаходом з LY75 людини демонструє, що досліджуване антитіло може конкурувати з антитілом за зв'язування з LY75 людини.

В одному варіанті здійснення конкуруюче антитіло являє собою антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом на LY75 людини, що і конкретні моноклональні антитіла до LY75, описані у даному документі (наприклад, LY75_A1). Стандартні методики картування епітопів, такі як рентгенівська кристалографія і 2-мерна спектроскопія ядерного магнітного резонансу, можна застосовувати для визначення того, чи зв'язується антитіло з тим же епітопом, що й еталонне антитіло (див., наприклад, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

В одному варіанті здійснення антитіло, яке конкурує за зв'язування з LY75 і/або зв'язується з тим же епітопом на LY75 людини, являє собою антитіло людини.

Після виділення одного вихідного mAb до LY75, що має бажані властивості, описані у даному документі, можуть бути одержані інші mAb з аналогічними властивостями, наприклад,

що мають той же епітоп. Наприклад, можна імунізувати мишей за допомогою LY75, як описано у даному документі, одержувати гібридоми і піддавати одержані mAb скринінгу з виявленням здатності до конкуренції з вихідним mAb за зв'язування з LY75. Мишей також можна імунізувати меншим фрагментом LY75, що містить епітоп, з яким зв'язується вихідне mAb. Локалізацію епітопа можна визначати шляхом, наприклад, скринінгу з виявленням зв'язування з рядом пептидів, що перекриваються і охоплюють LY75. В альтернативному випадку можна застосовувати спосіб з Jespers et al., Biotechnology 12:899, 1994, для керування відбором mAb, які мають той же епітоп і, отже, аналогічні властивості порівняно з вихідним mAb. За допомогою фагового дисплея спочатку важкий ланцюг вихідного антитіла спарюють з сукупністю (переважно людських) легких ланцюгів для відбору mAb, які зв'язуються з LY75, а потім новий легкий ланцюг спарюють з сукупністю (переважно людських) важких ланцюгів для відбору (переважно людських) mAb, які зв'язуються з LY75, що мають той же епітоп, що і вихідне mAb. В альтернативному випадку варіанти вихідного mAb можна одержувати шляхом мутагенезу кДНК, яка кодує важкі і легкі ланцюги антитіла.

Картування епітопів, наприклад, описане в Champe et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394, можна проводити для визначення того, чи зв'язується антитіло з епітопом, який становить інтерес. "Аланін-сканувальний мутагенез", описаний в Cunningham and Wells (1989) Science 244: 1081-1085, або будь-яку іншу форму точкового мутагенезу амінокислотних залишків в LY75 людини також можна застосовувати для визначення функціонального епітопа для антитіла до LY75 за даним винаходом. У дослідженнях мутагенезу, однак, також можуть виявляти амінокислотні залишки, критично важливі для загальної тривимірної структури LY75, але які безпосередньо не беруть участь у контактах антитіла і антигену, і тому для підтвердження функціонального епітопа, визначуваного за допомогою даного способу, можуть бути необхідні інші способи.

Епітоп, з яким зв'язується специфічне антитіло, також можна визначити шляхом оцінки зв'язування антитіла з пептидами, що містять фрагменти LY75 людини. Ряд пептидів, що перекриваються і охоплюють послідовність LY75, можна синтезувати і піддавати скринінгу з виявленням зв'язування, наприклад, у прямому ELISA, конкурентному ELISA (де пептид оцінюють за його здатністю до попередження зв'язування антитіла з LY75, зв'язаним з лункою титраційного мікропланшета) або на чипі. Такі способи скринінгу пептидів можуть бути нездатними виявити деякі переривчасті функціональні епітопи, тобто функціональні епітопи, що містять амінокислотні залишки, які не є суміжними уздовж первинної послідовності поліпептидного ланцюга LY75.

Епітоп, з яким зв'язуються антитіла за даним винаходом, також можна визначити за допомогою структурних способів, таких як рентгенівське визначення структури кристалів (наприклад, WO 2005/044853), молекулярне моделювання і спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР), у тому числі визначення швидкостей обміну H-D за допомогою ЯМР для активних атомів водню в амідній групі LY75 у вільному стані і зв'язаного у комплекс з антитілом, яке становить інтерес (Zinn-Justin et al. (1992) Biochemistry 31, 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993) Biochemistry 32, 6884-6891).

Що стосовно рентгенівської кристалографії, кристалізацію можна здійснювати за допомогою будь-якого із способів, відомих з рівня техніки (наприклад, Giege et al. (1994) Acta Crystallogr. D50:339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23), у тому числі метода мікросерій (наприклад, Chayen (1997) Structure 5:1269-1274), метода висячої краплини шляхом дифузії у парах (наприклад, McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251:6300-6303), протравлювання і діалізу. Бажано застосовувати білковий препарат, який має концентрацію щонайменше приблизно 1 мг/мл і переважно від приблизно 10 мг/мл до приблизно 20 мг/мл. Найкращої кристалізації можна досягнути в осаджувальному розчині, що містить поліетиленгліколь 1000-20000 (PEG; середня молекулярна маса варіює у діапазоні від приблизно 1000 до приблизно 20000 Да, переважно від приблизно 5000 до приблизно 7000 Да, більш переважно становить приблизно 6000 Да, при цьому концентрації варіюють у діапазоні від приблизно 10 % до приблизно 30 % (вага/об'єм)). Також може бути бажаним включення стабілізатора білка, наприклад, гліцерину, у концентрації, що варіює у діапазоні від приблизно 0,5 % до приблизно 20 %. В осаджувальному розчині також може бути бажаною підходяща сіль, така як хлорид натрію, хлорид літію або цитрат натрію, переважно у концентрації, що варіює у діапазоні від приблизно 1 мМ до приблизно 1000 мМ. Осаджувач переважно забуферений до pH від приблизно 3,0 до приблизно 5,0, переважно приблизно 4,0. Конкретні буфери, застосовувані в осаджувальному розчині, можуть відрізнятися і добре відомі з рівня техніки (Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Приклади застосовуваних буферів включають, без обмежень, HEPES, Tris, MES і ацетат. Кристали можуть рости у широкому

діапазоні температур, у тому числі при 2 °C, 4 °C, 8 °C і 26 °C.

Кристали комплексів антитіло:антиген можна вивчати за допомогою добре відомих методик рентгенівської дифракції і можна деталізувати за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення, такого як X-PLOR (Єльський університет, 1992, що розповсюджується Molecular Simulations, Inc.; див., наприклад, Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публікацію заявки на патент США № 2004/0014194) і BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323), розкриття яких включені у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті.

Конкурентні аналізи антитіл, описані у даному документі, можна застосовувати для визначення того, чи зв'язується антитіло "з тим же епітопом", що й інше антитіло. Як правило, конкуренція, що становить 50 % або більше, 60 % або більше, 70 % або більше, як, наприклад, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше, антитіла, про яке відомо, що воно взаємодіє з епітопом, з другим антитілом в умовах, у яких друге антитіло знаходиться у надлишку, а перше насичує всі ділянки, свідчить про те, що антитіла "зв'язуються з тим же епітопом". Для оцінки рівня конкуренції між двома антитілами можна застосовувати, наприклад, радіоімунологічні аналізи або аналізи з використанням інших міток для антитіл. Наприклад, антиген LY75 можна інкубувати з насичувальною кількістю першого антитіла до LY75 або його антигензв'язувального фрагмента, кон'югованих зі сполукою-міткою (наприклад, ^{3}H, ^{125}I, біотином або рубідієм), у присутності такої ж кількості другого неміченого антитіла до LY75.

Потім оцінюють кількість міченого антитіла, що зв'язується з антигеном у присутності неміченого блокувального антитіла, і порівнюють зі зв'язуванням за відсутності неміченого блокувального антитіла. Конкуренцію визначають за відсотковою зміною сигналів зв'язування у присутності неміченого блокувального антитіла порівняно з відсутністю блокувального антитіла.

Таким чином, якщо має місце 50 % інгібування зв'язування міченого антитіла у присутності блокувального антитіла порівняно зі зв'язуванням за відсутності блокувального антитіла, то має місце конкуренція між двома антитілами, що становить 50 %. Таким чином, посилання на конкуренцію між першим і другим антитілами, що становить 50 % або більше, 60 % або більше, 70 % або більше, як, наприклад, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше, означає, що перше антитіло інгібує зв'язування другого антитіла (або навпаки) з антигеном на 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше (порівняно зі зв'язуванням з антигеном другого антитіла за відсутності першого антитіла). Таким чином, інгібування зв'язування першого антитіла з антигеном другим антитілом, що становить 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше, означає, що два антитіла зв'язуються з тим же епітопом.

Модифікації антитіл

У даному винаході додатково представлені варіанти антитіл, іноді також звані "похідними антитіл" або "аналогами антитіл". Інакше кажучи, існує ряд модифікацій, які можна здійснювати по відношенню до антитіл за даним винаходом, у тому числі, без обмежень, амінокислотні модифікації CDR (дозрівання афінності), амінокислотні модифікації каркасних областей, амінокислотні модифікації Fc-області, варіанти глікозилювання, ковалентні модифікації інших типів (наприклад, для приєднання кон'югованих лікарських засобів тощо).

Під "варіантом" у даному документі мається на увазі поліпептидна послідовність, відмінна від такої у вихідного поліпептиду за рахунок щонайменше однієї амінокислотної модифікації. У даному випадку вихідний поліпептид являє собою або варіабельну область важкого або легкого ланцюга повної довжини, відповідно наведену під SEQ ID NO:1 або 2, або CDR-області, або каркасні області важких і легких ланцюгів, наведені під SEQ ID NO:5-10 і 16-21. Амінокислотні модифікації можуть включати заміни, вставки і делеції, при цьому перші у багатьох випадках є переважними. Буде зрозуміло, що амінокислотна заміна може являти собою консервативну або неконсервативну заміну, при цьому консервативні заміни є переважними.

Додатково, вказана заміна може являти собою заміну на амінокислоту, що зустрічається або не зустрічається у природі.

В цілому, варіанти можуть включати будь-яку кількість модифікацій, за умови, що функція антитіла буде все ще бути відсутньою, як описано у даному документі. Інакше кажучи, у випадку LY75_A1, наприклад, антитіло повинно все ще специфічно зв'язуватися з LY75 людини. Аналогічно, якщо амінокислотні варіанти одержують з Fc-областю, наприклад, то варіанти антитіл повинні зберігати функції зв'язування з рецепторами, необхідні для конкретного застосування антитіла або показання до нього.

"Варіанти" у даному випадку можна одержувати в наведених послідовностях CDR, каркасних або Fc-областях антитіла.

Однак, у цілому зазвичай використовують 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 амінокислотних замін, оскільки часто метою є зміна функції з мінімальною кількістю модифікацій. У деяких випадках має місце від 1 до 5 модифікацій (наприклад, окремих амінокислотних замін, вставок або делецій), при цьому 1-2, 1-3 і 1-4 також знаходять застосування у багатьох варіантах здійснення. Кількість модифікацій може залежати від розміру модифікованої області; наприклад, як правило, у CDR-областях бажаною є менша кількість модифікацій. Фахівцю у даній галузі буде зрозуміло, що навіть у CDR-областях місце розташування модифікації може значно змінювати ефект. В одному варіанті здійснення модифікації можна здійснювати у будь-якій з CDR1, CDR2 або CDR3 важких і/або легких ланцюгів. У додатковому варіанті здійснення модифікації здійснюють у будь-якій з CDR1 або CDR2 важких і/або легких ланцюгів. У ще одному додатковому варіанті здійснення модифікації розташовані у CDR1 важких і/або легких ланцюгів.

Слід відмітити, що ряд амінокислотних модифікацій може знаходитися у функціональних доменах: наприклад, може бути бажаним наявність 1-5 модифікацій у Fc-області білків дикого типу або сконструйованих білків, а також від 1 до 5 модифікацій у Fv-області, наприклад. Варіант поліпептидної послідовності переважно буде мати щонайменше приблизно 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність з вихідними послідовностями (наприклад, варіабельними областями, константними областями, і/або послідовностями важких і легких ланцюгів, і/або CDR LY75_A1). Слід відмітити, що залежно від розміру послідовності, відсоткова ідентичність буде залежати від кількості амінокислот.

Під "амінокислотною заміною" або "заміною" у даному документі мається на увазі заміщення амінокислоти у конкретному положенні вихідної поліпептидної послідовності іншою амінокислотою, яка може бути природною або амінокислотою, що не зустрічається у природі. Наприклад, заміна S100A стосується варіанта поліпептиду, у якому серин у положенні 100 заміщений аланіном. Під "амінокислотною вставкою" або "вставкою", що використовується у даному документі, мається на увазі додавання амінокислоти у конкретне положення вихідної поліпептидної послідовності. Під "амінокислотною делецією" або "делецією", що використовується у даному документі, мається на увазі вилучення амінокислоти у конкретному положенні вихідної поліпептидної послідовності.

Під "вихідним поліпептидом", "вихідним білком", "поліпептидом-попередником" або "білком-попередником", що використовується у даному документі, мається на увазі немодифікований поліпептид, який згодом модифікують з одержанням варіанта. Як правило, вихідні поліпептиди у даному документі являють собою LY75_A1. Відповідно, під “вихідним антитілом”, що використовується у даному документі, мається на увазі антитіло, яке модифікують з одержанням варіанта антитіла.

Під "диким типом", або "WT", або "нативним" у даному документі мається на увазі амінокислотна послідовність або нуклеотидна послідовність, виявлена у природі, у тому числі алельні варіанти. Білок, поліпептид, антитіло, імуноглобулін, IgG тощо WT мають амінокислотну послідовність або нуклеотидну послідовність, яка не була навмисно модифікована.

Під "варіантом Fc-області" у даному документі мається на увазі послідовність Fc, відмінна від послідовності Fc дикого типу за рахунок щонайменше однієї амінокислотної модифікації. Варіант Fc може стосуватися поліпептиду Fc як такого, композицій, що містять варіант поліпептиду Fc, або амінокислотної послідовності.

У деяких варіантах здійснення в одній або більше CDR LY75_A1 здійснюють одну або більше амінокислотних модифікацій. Як правило, у будь-якій окремій CDR заміняють лише 1, або 2, або 3 амінокислоти, і у наборі з 6 CDR зазвичай здійснюють не більше 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 змін.

Однак, слід розуміти, що будь-яку комбінацію з відсутністю замін, 1, 2 або 3 замін у будь-якій CDR можна незалежно і необов'язково поєднувати з будь-якою іншою заміною. Буде очевидно, що заміни можна здійснювати у будь-якій з 6 CDR. В одному варіанті здійснення заміни здійснюють у CDR1 важких і/або легких ланцюгів.

У деяких випадках амінокислотні модифікації у CDR називають "дозріванням афінності".

Антитіло, піддане "дозріванню афінності", має одну або більше змін в одній або більше CDR, які призводять до покращення афінності антитіла до антигену порівняно з вихідним антитілом, яке не має цю(цих) зміну(змін). У деяких випадках, хоча і рідких, може бути бажаним зниження афінності антитіла до його антигену, але це зазвичай не є переважним.

Дозрівання афінності можна здійснювати для підвищення афінності зв'язування антитіла з антигеном щонайменше на приблизно 10 %, приблизно 20 %, приблизно 30 %, приблизно 40 %,

приблизно 50 %, приблизно 60 %, приблизно 70 %, приблизно 80 %, приблизно 90 %, приблизно 100 %, приблизно 110 %, приблизно 120 %, приблизно 130 %, приблизно 140 %, приблизно 150 % або більше або у величину від 1, 2, 3, 4 до 5 разів порівняно з "вихідним" антитілом. Переважні антитіла, піддані дозріванню афінності, будуть характеризуватися наномолярними або навіть пікомолярними значеннями афінності до цільового антигену. Антитіла, піддані дозріванню афінності, одержують за допомогою відомих процедур. Див., наприклад, Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783, у якому описано дозрівання афінності шляхом перетасування доменів варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL). Випадковий мутагенез залишків CDR і/або каркасних ділянок описаний у Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; і Hawkins et al, 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896, наприклад.

В альтернативному випадку в одній або більше CDR антитіл за даним винаходом можна здійснювати амінокислотні модифікації, які є "мовчазними", наприклад, які незначно змінюють афінність антитіла до антигену. Їх можна виробляти з ряду причин, що включають оптимізацію експресії (яку можна здійснювати для нуклеїнових кислот, які кодують антитіла за даним винаходом).

Таким чином, у визначення CDR і антитіл за даним винаходом включені варіанти CDR і антитіл; інакше кажучи, антитіла за даним винаходом можуть містити амінокислотні модифікації в одній або більше CDR LY75_A1. На додаток, як стисло викладено нижче, амінокислотні модифікації можна також незалежно і необов'язково здійснювати у будь-якій області за межами CDR, у тому числі у каркасних і константних областях, описаних у даному документі.

У деяких варіантах здійснення антитіла до LY75 за даним винаходом містять варіант Fc-домену. Як відомо у даній галузі техніки, Fc-область антитіла взаємодіє з рядом Fc-рецепторів і лігандів, надаючи цілий ряд важливих функціональних здатностей, званих ефекторними функціями. Ці Fc-рецептори включають, без обмежень, (у людей) FcγRI (CD64), у тому числі ізоформи FcγRIa, FcγRIb і FcγRIc; FcγRII (CD32), у тому числі ізоформи FcγRIIa (у тому числі алотипи H131 і R131), FcγRIIb (у тому числі FcγRIIb-1 і FcγRIIb-2) і FcγRIIc; і FcγRIII (CD16), у тому числі ізоформи FcγRIIIa (у тому числі алотипи V158 і F158, пов'язані з антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC)) і FcγRIIIb (у тому числі алотипи FcγRIIIb-NA1 і FcγRIIIb-NA2), FcRn (неонатальний рецептор), C1q (білок системи комплементу, що бере участь у комплементзалежній цитотоксичності (CDC)) і FcRn (неонатальний рецептор, що бере участь у регуляції періоду напіввиведення з сироватки крові). Підходящі модифікації можна здійснювати в одному або більше положеннях, як у цілому викладено, наприклад, у заявці на патент США 11/841654 і літературних джерелах, згадуваних там, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341769, патенті США № 6737056, патенті США № 7670600, патенті США № 6086875, всі з яких явним чином включені шляхом посилання у всій своїй повноті, зокрема, що стосується конкретних амінокислотних замін, які підвищують зв'язування з Fc-рецепторами.

На додаток до модифікацій, викладених вище, можна здійснювати інші модифікації. Наприклад, молекули можна стабілізувати шляхом включення у їхній склад дисульфідних містків, які зв'язують VH- і VL-домени (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, включений шляхом посилання у всій своїй повноті).

На додаток, модифікації цистеїнових залишків є особливо застосовуваними у шляхах застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), додатково описаних нижче. У деяких варіантах здійснення константна область антитіла може бути сконструйована такою, що містить один або більше особливо "тіол-реактивних" цистеїнових залишків з метою забезпечення більш специфічного і регульованого розміщення компонента-лікарського засобу. Див., наприклад, патент США № 7521541, включений у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті.

На додаток, існує ряд ковалентних модифікацій антитіл, які можна здійснювати, як стисло викладено нижче.

Ковалентні модифікації антитіл включені в обсяг даного винаходу і зазвичай, але не завжди, здійснюються посттрансляційно. Наприклад, деякі типи ковалентних модифікацій антитіла вбудовують у молекулу шляхом реакції конкретних амінокислотних залишків антитіла з органічним дериватизуючим засобом, здатним до реакції з визначеними бічними ланцюгами або N- або C-кінцевими залишками.

Цистеїнільні залишки частіше всього піддають реакції з α-галогенацетатами (і відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, з одержанням карбоксиметильних або карбоксіамідометильних похідних. Цистеїнільні залишки також можна дериватизувати шляхом реакції з бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-імідазоліл)пропіоновою кислотою,

хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеімідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил-2-піридилдисульфідом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом тощо.

Гістидильні залишки дериватизують шляхом реакції з діетилпірокарбонатом при pH 5,5-7,0, оскільки даний засіб є відносно специфічним до бічного ланцюга гістидилу. Також застосовуваним є пара-бромфенацилбромід; реакцію переважно здійснюють у 0,1 М какодилаті натрію при pH 6,0.

Лізинільні й амінокінцеві залишки піддають реакції з ангідридами бурштинової або інших карбонових кислот. Дериватизація за допомогою цих засобів має ефект зміни заряду лізинільних залишків на протилежний. Інші підходящі реагенти для дериватизації залишків, що містять альфа-аміногрупи, включають імідоестери, такі як метилпіколінімідат; піридоксальфосфат; піридоксаль; хлорборогідрид; тринітробензолсульфонову кислоту; О-метилізосечовину; 2,4-пентандіон і гліоксилат у реакції, яку каталізують трансаміназою.

Аргінільні залишки модифікують шляхом реакції з одним або більше традиційними реагентами, серед яких фенілгліоксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон і нінгідрин. Дериватизація аргінінових залишків потребує, щоб реакцію проводили у лужних умовах, у зв'язку з високою pKa гуанідинової функціональної групи. Крім того, ці реагенти можуть реагувати з групами лізину, а також з епсилон-аміногрупою аргініну.

Можна здійснювати конкретні модифікації тирозильних залишків, при цьому особливий інтерес становить введення спектральних міток у тирозильні залишки шляхом реакції з ароматичними сполуками діазонію або тетранітрометаном. Для утворення О-ацетилтирозильних молекул і 3-нітропохідних частіше всього відповідно застосовують N-ацетилімідазол і тетранітрометан. Тирозильні залишки йодують за допомогою ^{125}I або ^{131}I з одержанням мічених білків для застосування у радіоімунологічному аналізі, при цьому спосіб із застосуванням хлораміну Т, описаний вище, є переважним.

Карбоксильні бічні групи (аспартил або глутаміл) вибірково модифікують шляхом реакції з карбодиімідами (R'—N=C=N--R'), де R і R' необов'язково являють собою різні алкільні групи, такі як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил)карбодиімід або 1-етил-3-(4-азоній-4,4-диметилпентил)карбодиімід. Крім того, аспартильні і глутамільні залишки перетворюють в аспарагінільні і глутамінільні залишки шляхом реакції з іонами амонію.

Дериватизація за допомогою біфункціональних засобів застосовувана для зшивання антитіл з нерозчинною у воді матрицею-підкладкою або поверхнею для застосування у ряді способів на додаток до способів, описаних нижче. Широко використовувані зшивальні засоби включають, наприклад, 1,1-біс(діазоацетил)-2-фенілетан, глутаровий альдегід, N-гідроксисукцинімідні естери, наприклад, естери 4-азидосаліцилової кислоти, гомобіфункціональні імідоестери, що включають дисукцинімідилові естери, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат), і біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеімідо-1,8-октан. Дериватизуючі засоби, такі як метил-3-[(п-азидофеніл)дитіо]пропіоімідат, забезпечують одержання фотоактивованих проміжних сполук, здатних утворювати поперечні зв'язки у присутності світла. В альтернативному випадку для іммобілізації білків використовують реакційноздатні нерозчинні у воді матриці, такі як активовані бромистим ціаногеном вуглеводні і реакційноздатні субстрати, описані у патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 і 4330440, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті.

Глутамінільні і аспарагінільні залишки часто дезамідують з одержанням відповідних глутамільних і аспартильних залишків, відповідно. В альтернативному випадку ці залишки дезамідують у слабокислих умовах. Будь-яка форма цих залишків знаходиться у межах обсягу даного винаходу.

Інші модифікації включають гідроксилювання проліну і лізину, фосфорилювання гідроксильних груп серильних або треонільних залишків, метилування α-аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну і гістидину (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], включений шляхом посилання у всій своїй повноті), ацетилювання N-кінцевої аміногрупи і амідування будь-якої С-кінцевої карбоксильної групи.

На додаток, як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, до антитіл (а також до інших композицій за даним винаходом) можна додавати будь-які мітки (у тому числі флуоресцентні, ферментні, магнітні, радіоактивні тощо).

Біспецифічні молекули

В іншому аспекті у даному винаході представлені біспецифічні молекули, що містять антитіло до LY75 або його фрагмент за даним винаходом. Антитіло за даним винаходом або його антигензв'язувальні частини можна дериватизувати або зв'язати з іншою функціональною

молекулою, наприклад, іншим пептидом або білком (наприклад, іншим антитілом або лігандом рецептора), з одержанням біспецифічної молекули, яка зв'язується щонайменше з двома різними ділянками зв'язування або цільовими молекулами. Антитіло за даним винаходом дійсно можна дериватизувати або зв'язати більш ніж з однією іншою функціональною молекулою з одержанням поліспецифічних молекул, які зв'язуються більш ніж з двома різними ділянками зв'язування і/або цільовими молекулами; такі поліспецифічні молекули також маються на увазі як такі, які охоплені терміном "біспецифічна молекула", що використовується у даному документі. Для одержання біспецифічної молекули за даним винаходом можна утворювати функціональний зв'язок антитіла за даним винаходом (наприклад, шляхом сполучення хімічним шляхом, злиття генів, нековалентного об'єднання або іншим способом) з однією або більше іншими зв'язувальними молекулами, такими як інше антитіло, фрагмент антитіла, пептид або зв'язувальний міметик, у результаті чого одержують біспецифічну молекулу.

Відповідно, даний винахід включає біспецифічні молекули, що містять щонайменше один перший фактор специфічності зв'язування з першим цільовим епітопом (тобто LY75) і другий фактор специфічності зв'язування з другим цільовим епітопом. Другий цільовий епітоп може бути присутнім на тому ж цільовому білку, що і зв'язуваний з першим фактором специфічності зв'язування; або другий цільовий епітоп може бути присутній на цільовому білку, відмінному від зв'язуваного першого білка, який зв'язується з першим фактором специфічності зв'язування. Другий цільовий епітоп може бути присутнім на тій же клітині, що і перший цільовий епітоп (тобто LY75); або другий цільовий епітоп може бути присутнім на цільовій молекулі, яка не представлена на клітині, на якій представлений перший цільовий епітоп. Як використовується у даному документі, термін "фактор специфічності зв'язування" стосується компонента, що містить щонайменше один варіабельний домен антитіла.

В одному варіанті здійснення даного винаходу другий цільовий епітоп являє собою Fc-рецептор, наприклад, FcγRI (CD64) людини або Fcα-рецептор (CD89) людини. Таким чином, даний винахід включає біспецифічні молекули, здатні до зв'язування з ефекторними клітинами, які експресують як FcγR, так і FcαR (наприклад, з моноцитами, макрофагами або поліморфноядерними клітинами (PMN)), і з цільовими клітинами, які експресують LY75. Ці біспецифічні молекули спрямовують клітини, які експресують LY75, до ефекторної клітини і запускають види активності ефекторних клітин, опосередковані Fc-рецепторами, такі як фагоцитоз клітин, які експресують LY75, антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC), вивільнення цитокінів або утворення супероксид-аніону.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу другий цільовий епітоп являє собою CD3 або CD5. Таким чином, даний винахід включає біспецифічні молекули, здатні до зв'язування з ефекторними клітинами, які експресують як CD3, так і CD5 (наприклад, цитотоксичними Т-клітинами, які експресують CD3 або CD5), і з цільовими клітинами, які експресують LY75. Ці біспецифічні молекули спрямовують клітини, які експресують LY75, до ефекторної клітини і запускають види активності ефекторних клітин, опосередковані CD3 або CD5, такі як клональна експансія Т-клітин і Т-клітинна цитотоксичність. У даному варіанті здійснення біспецифічне антитіло за даним винаходом може мати загалом або два, або три варіабельних домени антитіла, де перша частина біспецифічного антитіла здатна мобілізувати активність імунної ефекторної клітини людини шляхом специфічного зв'язування з ефекторним антигеном, розташованим на імунній ефекторній клітині людини, при цьому ефекторний антиген являє собою антиген CD3 людини або антиген CD5 людини, при цьому вказана перша частина містить один варіабельний домен антитіла, а друга частина біспецифічного антитіла здатна до специфічного зв'язування з цільовим антигеном, відмінним від ефекторного антигену, наприклад, LY75, при цьому вказаний цільовий антиген розташований на цільовій клітині, відмінній від вказаної імунної ефекторної клітини людини, і вказана друга частина містить один або два варіабельних домени антитіла.

У варіанті здійснення даного винаходу, у якому біспецифічна молекула є поліспецифічною, молекула може додатково містити третій фактор специфічності зв'язування на додаток до фактора специфічності зв'язування з Fc-рецептором або фактора специфічності зв'язування з CD3 або CD5 і фактора специфічності зв'язування з LY75. В одному варіанті здійснення третій фактор специфічності зв'язування являє собою частину антитіла до фактора підсилення (EF), наприклад, молекулу, яка зв'язується з поверхневим білком, що бере участь у цитотоксичній активності, і, таким чином, підвищує імунну відповідь проти цільової клітини. "Частина антитіла до фактора підсилення" може являти собою антитіло, функціональний фрагмент антитіла або ліганд, які зв'язуються з вказаною молекулою, наприклад, антигеном або рецептором, і, таким чином, призводять до підсилення ефекту детермінант зв'язування для Fc-рецептора або антигену цільової клітини. "Частина антитіла до фактора підсилення" може зв'язуватися з Fc-

рецептором або антигеном цільової клітини. В альтернативному випадку частина антитіла до фактора підсилення може зв'язуватися з об'єктом, відмінним від об'єкта, з яким зв'язуються перший і другий фактори специфічності зв'язування. Наприклад, частина антитіла до фактора підсилення може зв'язуватися з цитотоксичною Т-клітиною, наприклад, шляхом CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1, або з іншою імунною клітиною, що призводить до підвищення імунної відповіді проти цільової клітини.

В одному варіанті здійснення біспецифічні молекули за даним винаходом містять як фактор специфічності зв'язування щонайменше одне антитіло або фрагмент цього антитіла, що включає, наприклад, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb або одноланцюговий Fv. Антитіло також може являти собою димер легких ланцюгів або важких ланцюгів або будь-який його мінімальний фрагмент, такий як Fv або одноланцюговий конструкт, описаний у патенті США № 4946778, зміст якого явним чином включено шляхом посилання.

В одному варіанті здійснення специфічність зв'язування з Fcγ-рецептором забезпечується моноклональним антитілом, зв'язування якого не блокується імуноглобуліном G людини (IgG). Як використовується у даному документі, термін "рецептор IgG" стосується будь-якого з восьми генів γ-ланцюга, локалізованих у хромосомі 1. Ці гени кодують загалом дванадцять трансмембранних або розчинних ізоформ рецепторів, розподілених на три класи Fcγ-рецепторів: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) і FcγRIII (CD16). В одному переважному варіанті здійснення Fcγ-рецептор являє собою високоафінний FcγRI людини. FcγRI людини являє собою молекулу розміром 72 кДа, що демонструє високу афінність до мономерного IgG (10^8-10^9 M^{-1}).

Одержання і встановлення характеристик деяких переважних моноклональних антитіл до Fcγ описано у публікації за PCT WO 88/00052 і у патенті США № 4954617, ідеї яких у повній мірі включені у даний документ шляхом посилання. Ці антитіла зв'язуються з епітопом FcγRI, FcγRII або FcγRIII у ділянці, відмінній від ділянки зв'язування Fcγ-рецептора, і тому блокування їхнього зв'язування фізіологічними рівнями IgG є незначним. Конкретні антитіла до FcγRI, застосовувані у даному винаході, являють собою mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 і mAb 197. Гібридома, що утворює mAb 32, доступна з Американської колекції типових культур, № доступу в ATCC HB9469. В інших варіантах здійснення антитіло до Fcγ-рецептора є гуманізованою формою моноклонального антитіла 22 (H22). Одержання і встановлення характеристик антитіла H22 описано в Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 і публікації за PCT WO 94/10332. Лінія клітин, які утворюють антитіло H22, була депонована в Американській колекції типових культур під позначенням HA022CL1 і має номер доступу CRL 11177.

У ще інших переважних варіантах здійснення специфічність зв'язування з Fc-рецептором забезпечується антитілом, яке зв'язується з рецептором IgA людини, наприклад, з Fc-альфа-рецептором [FcαRI (CD89)], зв'язування з яким переважно не блокується імуноглобуліном A (IgA) людини. Термін "рецептор IgA" мається на увазі як такий, що включає продукт гена одного α-гена (FcαRI), локалізованого у хромосомі 19. Даний ген, як відомо, кодує декілька підданих альтернативному сплайсингу трансмембранних ізоформ розміром 55-110 кДа. FcαRI (CD89) характеризується конститутивною експресією на моноцитах/макрофагах, еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитах, але не у популяціях неефекторних клітин. FcαRI має середню афінність (≈ 5 x 10^7 M^{-1}) як до IgA1, так і до IgA2, яка підвищується під впливом цитокінів, таких як G-CSF або GM-CSF [Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440]. Були описані чотири специфічні до FcαRI моноклональні антитіла, ідентифіковані як A3, A59, A62 і A77, які зв'язуються з FcαRI за межами ліганд-зв'язувального домену для IgA [Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764].

FcαRI і FcγRI є переважними рецепторами для запуску для застосування з біспецифічними молекулами за даним винаходом, оскільки вони (1) експресуються головним чином на імунних ефекторних клітинах, наприклад, моноцитах, PMN, макрофагах і дендритних клітинах; (2) експресуються на високих рівнях (наприклад, 5000-100000 на клітину); (3) є медіаторами видів цитотоксичної активності (наприклад, ADCC, фагоцитозу) і (4) опосередковують покращену презентацію антигену для антигенів, у тому числі аутоантигенів, спрямованих до них.

Антитіла, які можна використовувати у біспецифічних молекулах за даним винаходом, є мишиними, людськими, химерними і гуманізованими моноклональними антитілами.

Біспецифічні молекули за даним винаходом можна одержувати шляхом кон'югування складових факторів специфічності зв'язування, наприклад, факторів специфічності зв'язування з FcR, CD3, CD5 і LY75, із застосуванням способів, відомих з рівня техніки. Наприклад, фактори специфічності зв'язування кожної біспецифічної молекули можна одержувати окремо, а потім кон'югувати один з одним. Якщо фактори специфічності зв'язування являють собою білки або пептиди, то для ковалентного кон'югування можна застосовувати ряд засобів сполучення або зшивальних засобів. Приклади зшивальних засобів включають білок A, карбодиімід, N-

сукцинімідил-S-ацетилтіоацетат (SATA), 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойну кислоту) (DTNB), о-фенілендималеімід (oPDM), N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) і сульфосукцинімідил-4-(N-малеімідометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) [див., наприклад, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648]. Інші способи включають описані в Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, і Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375. Переважними кон'югованими засобами є SATA і сульфо-SMCC, обидва з яких доступні від Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Іллінойс).

Якщо фактори специфічності зв'язування являють собою антитіла, вони можуть бути кон'юговані шляхом утворення зв'язків між сульфгідрильними групами С-кінцевих шарнірних областей двох важких ланцюгів. В особливо переважному варіанті здійснення шарнірну область модифікують з тим, щоб вона містила непарну кількість сульфгідрильних залишків, переважно один, перед кон'югуванням.

В альтернативному випадку обидва фактори специфічності зв'язування можуть кодуватися в одному і тому ж векторі і експресуватися і збиратися в одній і тій же клітині-хазяїні. Цей спосіб особливо застосовуваний, якщо біспецифічна молекула являє собою mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ або ліганд x білок злиття на основі Fab. Біспецифічна молекула за даним винаходом може являти собою одноланцюгову молекулу, що містить одне одноланцюгове антитіло і детермінанту зв'язування, або одноланцюгову біспецифічну молекулу, що містить дві детермінанти зв'язування. Біспецифічні молекули можуть містити щонайменше дві одноланцюгові молекули. Способи одержання біспецифічних молекул описані, наприклад, у патентах США №№ 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 і 5482858, всі з яких явним чином включені у даний документ шляхом посилання.

Антитіла за даним винаходом можуть бути біспецифічними активаторами Т-клітин (BiTE). BiTE являють собою клас штучних біспецифічних моноклональних антитіл. Вони керують імунною системою реципієнта, більш конкретно, цитотоксичною активністю Т-клітин по відношенню до ракових клітин. BiTE зазвичай являють собою білки злиття, що містять два одноланцюгових варіабельних фрагменти (scFv) різних антитіл, або амінокислотні послідовності з чотирьох різних генів, в одному пептидному ланцюгу, переважно розміром приблизно 55 кілодальтон. Переважно, один з scFv зв'язується з Т-клітинами шляхом CD3-рецептора, а інший - з пухлинною клітиною шляхом пухлинноспецифічної молекули.

Зв'язування біспецифічних молекул з їхніми специфічними мішенями можна підтвердити за допомогою, наприклад, твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), радіоімунологічного аналізу (RIA), FACS-аналізу, біологічного аналізу (наприклад, інгібування росту) або вестерн-блот-аналізу. У кожному з цих аналізів зазвичай виявляють наявність комплексів білок-антитіло, що становлять особливий інтерес, шляхом використання міченого реагенту (наприклад, антитіла), специфічного до комплексу, що представляє інтерес. Наприклад, комплекси FcR-антитіло можна виявити за допомогою, наприклад, мічених ферментом антитіла або фрагмента антитіла, які розпізнають комплекси антитіло-FcR і специфічно зв'язуються з ними. В альтернативному випадку комплекси можна виявити за допомогою будь-якого з ряду інших імунологічних аналізів. Наприклад, антитіло можна мітити радіоактивним ізотопом і застосовувати у радіоімунологічному аналізі (RIA) (див., наприклад, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, включений у даний документ шляхом посилання). Радіоактивний ізотоп можна виявити за допомогою таких способів, як застосування лічильника γ-опромінення або сцинтиляційного лічильника, або шляхом авторадіографії.

Глікозилювання

Іншим типом ковалентної модифікації є зміни глікозилювання. У деяких варіантах здійснення антитіла, розкриті у даному документі, можна модифікувати з тим, щоб вони містили одну або більше сконструйованих глікоформ. Під "сконструйованою глікоформою", як використовується у даному документі, мається на увазі вуглеводнева композиція, ковалентно приєднана до антитіла, де вуглеводнева композиція за хімічним складом відмінна від такої у вихідного антитіла. Сконструйовані глікоформи можуть бути застосовуваними для ряду цілей, у тому числі, без обмежень, підсилення або послаблення ефекторної функції. Наприклад, можна одержувати аглікозильоване антитіло (тобто антитіло, яке не має глікозилювання). Глікозилювання можна змінити для, наприклад, підвищення афінності антитіла до антигену. Такі вуглеводневі модифікації можна здійснити шляхом, наприклад, зміни однієї або більше ділянок глікозилювання у послідовності антитіла. Наприклад, можна здійснити одну або більше амінокислотних замін, що призводить до усунення однієї або більше ділянок глікозилювання каркасної ділянки варіабельної області з усуненням, таким чином, глікозилювання у даній

ділянці. Таке аглікозилювання може підвищувати афінність антитіла до антигену. Такий підхід більш детально описаний у патентах США №№ 5714350 і 6350861 Co et al., і може здійснюватися шляхом вилучення аспарагіну у положенні 297.

Переважною формою сконструйованої глікоформи є афукозилювання, яке, як було показано, корелює з підсиленням функції ADCC, переважно шляхом міцного зв'язування з FcγRIIIa-рецептором. У даному контексті "афукозилювання" означає, що більшість антитіл, утворених у клітинах-хазяях, практично не мають фукозу, наприклад, 90-95-98% одержаних антитіл не мають значної кількості фукози як складову вуглеводневого компонента антитіла (зазвичай приєднаного у N297 в Fc-області). Згідно з функціональним визначенням афукозильовані антитіла зазвичай проявляють щонайменше 50 % або більш високу афінність до FcγRIIIa-рецептора.

Сконструйовані глікоформи можуть бути одержані за допомогою ряду способів, відомих з рівня техніки (Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6602684; USSN 10/277370; USSN 10/113929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/29246 A1; PCT WO 02/31140 A1; PCT WO 02/30954 A1, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті; технологія POTELLIGENT® [Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерсі]; інженерна технологія глікозилювання GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Цюріх, Швейцарія]). Багато з цих методик засновані на регуляції рівня фукозильованих олігосахаридів і/або олігосахаридів, що мають N-ацетилглюкозамін у точках розгалуження, ковалентно приєднаних до Fc-області, наприклад, шляхом експресії IgG у різних організмах або лініях клітин, сконструйованих або інших (наприклад, у клітинах CHO Lec-13 або клітинах гібридоми пацюка YB2/0), шляхом регуляції активності ферментів, що беруть участь у шляху глікозилювання (наприклад, FUT8 [α-1,6-фукозилтрансферази] і/або β-1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III [GnTIII]) або шляхом модифікації вуглеводню(вуглеводнів) після експресії IgG. Наприклад, технологія "антитіл, одержуваних з використанням інженерії цукрів" або "SEA" Seattle Genetics функціонує шляхом додавання модифікованих сахаридів, які інгібують фукозилювання під час утворення; див., наприклад, US 2009/0317869, включений у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті. "Сконструйована глікоформа" зазвичай стосується іншого вуглеводню або олігосахариду порівняно з антитілом, одержаним за відсутності технології глікозилювання; таким чином, антитіло може містити сконструйовану глікоформу.

В альтернативному випадку сконструйована глікоформа може стосуватися варіанта IgG, що містить інший вуглеводень або олігосахарид. Як відомо з рівня техніки, профілі глікозилювання можуть залежати як від послідовності білка (наприклад, наявності або відсутності конкретних глікозильованих амінокислотних залишків, які обговорюються нижче), так і від клітини-хазяїна або організму, у яких утворюється білок. Конкретні системи експресії обговорюються нижче.

Глікозилювання поліпептидів зазвичай є N-зчепленим або O-зчепленим. N-зчеплене стосується приєднання вуглеводневого компонента до бічного ланцюга аспарагінового залишку. Послідовності трипептидів аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X являє собою будь-яку амінокислоту, за виключенням проліну, є послідовностями розпізнавання для ферментативного приєднання вуглеводневого компонента до бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, наявність будь-якої з цих послідовностей трипептидів у поліпептиді утворює потенційну ділянку глікозилювання. O-зчеплене глікозилювання стосується приєднання одного з цукрів N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози до гідроксіамінокислоти, частіше всього серину або треоніну, хоча також можна застосовувати 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізин.

Додавання ділянок глікозилювання до антитіла з метою зручності здійснюють шляхом зміни амінокислотної послідовності таким чином, щоб вона містила одну або більше з вищеописаних послідовностей трипептидів (для ділянок N-зчепленого глікозилювання). Зміну також можна здійснювати шляхом додавання одного або більше серинових або треонінових залишків до вихідної послідовності або заміни на них (для ділянок O-зчепленого глікозилювання). Для простоти амінокислотну послідовність антитіла переважно змінюють шляхом змін на рівні ДНК, зокрема, шляхом мутації ДНК, яка кодує цільовий поліпептид, у попередньо вибраних основах, так що одержують кодони, трансльовані у бажані амінокислоти.

Іншими способами збільшення кількості вуглеводневих компонентів в антитілі є з'єднання глікозидів з білком хімічним або ферментативним шляхом. Ці процедури є переважними, оскільки вони не потребують одержання білка у клітині-хазяїні, що має можливості глікозилювання для N- і O-зчепленого глікозилювання. Залежно від застосовуваного способу з'єднання цукор(цукри) можуть бути приєднані до (a) аргініну і гістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, таких як у цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, таких як у серину, треоніну або гідроксипроліну, (e) залишків ароматичних

амінокислот, таких як у фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (f) амідної групи глутаміну.

Ці способи описані у WO 87/05330 і в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, обидва з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті.

Вилучення вуглеводневих компонентів, які присутні у вихідному антитілі (наприклад, посттрансляційне), можна здійснювати хімічним або ферментативним шляхом. Хімічне деглікозилювання потребує здійснення впливу на білок сполукою трифторметансульфоновою кислотою або еквівалентною сполукою. Дана обробка призводить до відщеплення більшості або всіх цукрів, за виключенням зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозаміну або N-ацетилгалактозаміну), залишаючи при цьому поліпептид незайманим. Хімічне деглікозилювання описано у Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, і в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131, обидва з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті. Ферментативне відщеплення вуглеводневих компонентів від поліпептидів можна здійснювати шляхом застосування ряду ендо- і екзоглікозидаз, описаних у Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, включеному шляхом посилання у всій своїй повноті, у тому числі вилучення залишків фукози із застосуванням ферменту фукозидази, відомого з рівня техніки. Глікозилювання у потенційних ділянках глікозилювання можна попередити шляхом застосування сполуки тунікаміцину, описаної у Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, включеному шляхом посилання у всій своїй повноті. Тунікаміцин блокує утворення N-глікозидних зв'язків з білком.

Інший тип ковалентної модифікації антитіла включає зв'язування антитіла з різними небілковими полімерами, у тому числі, без обмежень, різні поліоли, такі як поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь або поліоксіалкілени, згідно з викладеним у, наприклад, каталозі PEG 2005-2006 від Nektar Therapeutics (доступному на веб-сайті Nektar), патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337, всі з яких включені шляхом посилання у всій своїй повноті. На додаток, як відомо з рівня техніки, амінокислотні заміни можна здійснювати у різних положеннях в антитілі для полегшення додавання полімерів, таких як PEG. Див., наприклад, публікацію заявки на патент США № 2005/0114037 A1, включену шляхом посилання у всій своїй повноті.

У додаткових варіантах здійснення, наприклад, у випадку застосування антитіл за даним винаходом з метою діагностики або виявлення, антитіла можуть містити мітку. Під “міченим” у даному документі мається на увазі, що сполука має щонайменше один елемент, ізотоп або хімічну сполуку, приєднані для забезпечення виявлення сполуки. Як правило, мітки підрозділяються на три класи: a) ізотопні мітки, які можуть являти собою радіоактивні або важкі ізотопи; b) магнітні, електричні, температурні мітки і c) кольорові або люмінесцентні барвники; хоча мітки також включають ферменти і частинки, такі як магнітні частинки. Переважні мітки включають, без обмежень, флуоресцентні комплекси лантаноїдів (у тому числі європію і тербію) і флуоресцентні мітки, що включають, без обмежень, квантові точки, флуоресцеїн, родамін, тетраметилродамін, еозин, еритрозин, кумарин, метилкумарини, пірен, малахітовий зелений, стильбен, люциферовий жовтий, Cascade синій, техаський червоний, барвники Alexa, ціанові барвники й інші, описані у 6-му випуску Molecular Probes Handbook під редакцією Richard P. Haugland, явним чином включеному у даний документ шляхом посилання.

Кон'югати антитіло-лікарський засіб

У деяких варіантах здійснення антитіла до LY75 за даним винаходом кон'югують з лікарськими засобами з утворенням кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC). Як правило, ADC застосовують у шляхах застосування в онкології, де застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб для локальної доставки цитотоксичних або цитостатичних засобів забезпечує цілеспрямовану доставку компонента-лікарського засобу у пухлину, що може забезпечити більш високу ефективність, більш низьку токсичність тощо. Огляд даної технології наведений у Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carteret al., Cancer J. 14(3): 154 (2008) і Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009), всі з яких включені у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті.

Таким чином, у даному винаході представлені антитіла до LY75, кон'юговані з лікарськими засобами. Як правило, кон'югування виконується шляхом ковалентного приєднання до антитіла, як детально описано нижче, і зазвичай засноване на застосуванні лінкеру, часто пептидного зв'язку (який, як описано нижче, може бути передбачений чутливим або нечутливим до розщеплення протеазами у цільовій ділянці). На додаток, як описано вище, зв'язування структурної одиниці лінкер-лікарський засіб (LU-D) можна виконувати шляхом приєднання до цистеїнових залишків в антитілі. Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, кількість компонентів-лікарських засобів на антитіло може змінюватися залежно від умов реакції, і співвідношення лікарський засіб:антитіло може варіювати від 1:1 до 10:1. Як буде зрозуміло

фахівцям у даній галузі, фактична кількість є середнім значенням.

Таким чином, у даному винаході представлені антитіла до LY75, кон'юговані з лікарськими засобами. Як описано нижче, лікарський засіб ADC може являти собою будь-яку кількість засобів, у тому числі, без обмежень, представлені цитотоксичні засоби, такі як хіміотерапевтичні засоби, інгібітори росту, токсини (наприклад, ферментативно активні токсини бактеріального, грибного, рослинного або тваринного походження або його фрагменти), або радіоактивні ізотопи (інакше кажучи, у радіокон'югаті). В інших варіантах здійснення у даному винаході додатково представлені способи застосування ADC.

Лікарські засоби для застосування у даному винаході включають цитотоксичні лікарські засоби, зокрема, застосовувані для терапії раку. Такі лікарські засоби включають, як правило, засоби, які пошкоджують ДНК, антиметаболіти, натуральні продукти і їхні аналоги. Ілюстративні класи цитотоксичних засобів включають інгібітори ферментів, такі як інгібітори дигідрофолатредуктази і інгібітори тимідилатсинтази, ДНК-інтеркалятори, засоби, які розщеплюють ДНК, інгібітори топоізомерази, лікарські засоби родини антрациклінів, лікарські засоби з барвінка, мітоміцини, блеоміцини, цитотоксичні нуклеозиди, лікарські засоби родини птеридинів, діінени, подофілотоксини, доластатини, майтанзиноїди, індуктори диференціювання і таксоли.

Представники цих класів включають, наприклад, таксол, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, арабінозид цитозину, мелфалан, лейрозин, лейросидеїн, актиноміцин, даунорубіцин, доксорубіцин, мітоміцин C, мітоміцин A, карміноміцин, аміноптерин, талізоміцин, подофілотоксин і похідні подофілотоксину, такі як етопозид або фосфат етопозиду, вінбластин, вінкристин, віндезин, таксани, у тому числі таксол, таксотер, ретиноєву кислоту, масляну кислоту, N8-ацетилспермідин, камптотецин, каліхеаміцин, есперамiцин, ендіїни, дуокарміцин A, дуокарміцин SA, каліхеаміцин, камптотецин, геміастерліни, майтанзиноїди (у тому числі DM1), монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF) і майтанзиноїди (DM4) і їхні аналоги.

Токсини можуть застосовуватися у складі кон'югатів антитіло-токсин і включають бактеріальні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин, низькомолекулярні токсини, такі як гелданаміцин (Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноїди (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) і каліхеаміцин (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), геміастерліни (WO 2004/026293; Zask et al., (2004) J. Med. Chem, 47: 4774-4786). Токсини можуть чинити свої цитотоксичні і цитостатичні ефекти за допомогою механізмів, що включають зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомерази.

Також можна застосовувати кон'югати антитіла до LY75 і одного або більше низькомолекулярних токсинів, таких як майтанзиноїди, доластатини, ауристатини, трихотецен, каліхеаміцин і CC1065, і похідні цих токсинів, які мають активність токсинів.

Майтанзиноїди

Сполуки майтанзину, підходящі для застосування як майтанзиноїдні компоненти-лікарські засоби, добре відомі у даній галузі техніки і можуть бути виділені з природних джерел згідно з відомими способами, бути одержані за допомогою методик генної інженерії (див. Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973), або являти собою майтанзинол і аналоги майтанзинолу, одержувані синтетично згідно з відомими способами. Як описано нижче, лікарські засоби можна модифікувати шляхом включення у їхній склад функціонально активної групи, такої як тіольна група або аміногрупа, для кон'югування з антитілом.

Ілюстративні майтанзиноїдні компоненти-лікарські засоби включають ті, які мають модифіковане ароматичне кільце, такі як C-19-дехлорпохідні (патент США № 4256746) (одержувані шляхом відновлення ансамітоцину P2 алюмогідридом літію); C-20-гідрокси- (або C-20-деметил-) +/-C-19-дехлорпохідні (патенти США №№ 4361650 і 4307016) (одержувані шляхом деметилування за допомогою Streptomyces або Actinomyces або дехлорування за допомогою LAH) і C-20-деметокси-, C-20-ацилокси- (-OCOR) +/-дехлорпохідні (патент США № 4294757) (одержувані шляхом ацилювання за допомогою хлорангідридів), і ті, які мають модифікації в інших положеннях.

Ілюстративні майтанзиноїдні компоненти-лікарські засоби також включають ті, які мають такі модифікації, як C-9-SH (патент США № 4424219) (одержувані шляхом реакції майтанзинолу з H2S або P2S5); C-14-алкоксиметил(деметокси/CH_2OR) (патент США № 4331598); C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил (CH_2OH або CH_2OAc) (патент США № 4450254) (одержувані з Nocardia); C-15-гідроксі/ацилоксі (патент США № 4364866) (одержувані шляхом перетворення

майтанзинолу під дією Streptomyces); C-15-метокси (патенти США №№ 4313946 і 4315929) (виділені з Trewia nudiflora); C-18-N-деметил (патенти США №№ 4362663 і 4322348) (одержувані шляхом деметилування майтанзинолу під дією Streptomyces) і 4,5-дезоксі (патент США № 4371533) (одержувані шляхом відновлення майтанзинолу трихлоридом титану/LAH).

Особливе застосування мають DM1 (розкритий у патенті США № 5208020, включеному шляхом посилання) і DM4 (розкритий у патенті США № 7276497, включеному шляхом посилання). Див. також ряд додаткових майтанзиноїдних похідних і способів у 5416064, WO/01/24763, 7303749, 7601354, USSN 12/631508, WO02/098883, 6441163, 7368565, WO02/16368 і WO04/1033272, всі з яких явним чином включені шляхом посилання у всій своїй повноті.

ADC, що містять майтанзиноїди, способи їхнього одержання і їхнє терапевтичне застосування розкриті, наприклад, у патентах США №№ 5208020; 5416064; 6441163 і європейському патенті EP 0 425 235 B1, розкриття яких явним чином включені у даний документ шляхом посилання. B Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996), описані ADC, що містять майтанзиноїд, позначений як DM1, зв'язаний з моноклональним антитілом C242, спрямованим проти раку ободової і прямої кишки людини.

Було виявлено, що кон'югат є досить цитотоксичним по відношенню до культивованих ракових клітин товстої кишки і демонструє протипухлинну активність в аналізі росту пухлини in vivo.

У Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описані ADC, у яких майтанзиноїд був кон'югований за допомогою дисульфідного лінкеру з мишиним антитілом A7, що зв'язується з антигеном у лініях ракових клітин товстої кишки, або з іншим мишиним моноклональним антитілом TA. 1, що зв'язується з онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичність кон'югата TA.1-майтанзиноїд досліджували in vitro у лінії ракових клітин молочної залози людини SK-BR-3, у якій експресується 3 x 105 поверхневих антигенів HER-2 на клітину. Кон'югований лікарський засіб досягав ступеня цитотоксичності, схожого з таким у вільного майтанзиноїдного лікарського засобу, який можна підвищити шляхом збільшення кількості молекул майтанзиноїдів на молекулу антитіла. Кон'югат A7-майтанзиноїд демонстрував низьку системну цитотоксичність у мишей.

Ауристатини і доластатини

У деяких варіантах здійснення ADC містить антитіло до LY75, кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами долостатинів і їхніми похідними ауристатинами (патенти США №№ 5635483; 5780588). Було показано, що доластатини і ауристатини порушують динамічні властивості мікротрубочок, гідроліз ГТФ і поділ ядра і клітини (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) і мають протиракову (патент США № 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Компонент-лікарський засіб доластатин або ауристатин може бути приєднаний до антитіла через N-кінець (аміно-) або C-кінець (карбоксильний) пептидного компонента-лікарського засобу (WO 02/088172).

Ілюстративні варіанти здійснення ауристатину включають зв'язані через N-кінець монометилауристатинові компоненти-лікарські засоби DE і DF, розкриті у Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, опублікованому 28 березня 2004 р., і описані у публікації заявки на патент США № 2005/0238648, розкриття якої явним чином включене шляхом посилання у всій своїй повноті.

Ілюстративний варіант здійснення ауристатину являє собою MMAE (показаний на фігурі 10, де хвиляста лінія вказує на ковалентне приєднання до лінкеру (L) кон'югата антитіло-лікарський засіб; див. патент США № 6884869, явним чином включений шляхом посилання у всій своїй повноті).

Інший ілюстративний варіант здійснення ауристатину являє собою MMAF, показаний на фігурі 10, де хвиляста лінія вказує на ковалентне приєднання до лінкеру (L) кон'югата антитіло-лікарський засіб (US 2005/0238649, 5767237 і 6124431, явним чином включені шляхом посилання у всій своїй повноті).

Додаткові ілюстративні варіанти здійснення, що містять MMAE або MMAF і різні лінкерні складові (додатково описані у даному документі), мають наступні структури і скорочення (де Ab означає антитіло, а p дорівнює від 1 до приблизно 8).

Зазвичай пептидні компоненти-лікарські засоби можна одержувати шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або фрагментами пептидів. Такі пептидні зв'язки можна одержувати, наприклад, згідно зі способом рідкофазового синтезу (див. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), добре відомим у галузі хімії пептидів. Ауристатинові/доластатинові компоненти-лікарські засоби можна

одержувати згідно зі способами з патенту США № 5635483; патенту США № 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863 і Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7)778-784.

Каліхеаміцин

В інших варіантах здійснення ADC містить антитіло за даним винаходом, кон'юговане з однією або більше молекулами каліхеаміцину. Наприклад, мілотарг є першим комерційним лікарським засобом за типом ADC, і як навантаження у ньому використовується каліхеаміцин γ1 (див. патент США № 4970198, включений шляхом посилання у всій своїй повноті). Додаткові похідні каліхеаміцину описані у патентах США №№ 5264586, 5384412, 5550246, 5739116, 5773001, 5767285 і 5877296, всі з яких явним чином включені шляхом посилання. Антибіотики родини каліхеаміцинів здатні викликати двониткові розриви ДНК у субпікомолярних концентраціях. Стосовно одержання кон'югатів родини каліхеаміцинів див. патенти США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (всі з яких належать компанії American Cyanamid). Структурні аналоги каліхеаміцину, які можна застосовувати, включають, без обмежень, γ1I, α2I, α2I, N-ацетил-γ1I, PSAG і θI1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) і вищезгадані патенти США American Cyanamid). Іншим протипухлинним лікарським засобом, з яким може бути кон'юговано антитіло, є QFA, який являє собою антифолат. Як каліхеаміцин, так і QFA мають внутрішньоклітинні місця прикладення дії і з труднощами перетинають плазматичну мембрану. Тому поглинання клітинами цих засобів шляхом опосередкованої антитілами інтерналізації значно підсилює їхні цитотоксичні ефекти.

Дуокарміцини

CC-1065 (див. 4169888, включений шляхом посилання) і дуокарміцини є представниками родини протипухлинних антибіотиків, використовуваних у ADC. Ці антибіотики, певно, діють шляхом вибіркового за послідовністю алкілування ДНК у N3 аденіну у малій борозенці, що ініціює каскад подій, що призводить до апоптозу.

Важливі представники дуокарміцинів включають дуокарміцин A (патент США № 4923990, включений шляхом посилання) і дуокарміцин SA (патент США № 5101038, включений шляхом посилання), а також велика кількість аналогів, описаних у патентах США №№ 7517903, 7691962, 5101038; 5641780; 5187186; 5070092; 5070092; 5641780; 5101038; 5084468, 5475092, 5585499, 5846545, WO 2007/089149, WO 2009/017394 A1, 5703080, 6989452, 7087600, 7129261, 7498302 і 7507420, всі з яких явним чином включені шляхом посилання.

Піролобензодіазепіни

Піролобензодіазепіни (PBD) (Journal of Medicinal Chemistry 2001, 44, 737-748) є засобами, які взаємодіють з ДНК, які мають значну цитотоксичність. Було виділено тринадцять структур з цієї родини, у тому числі такі сполуки, як антраміцин, мазетраміцин, поротраміцин, протракарцин, сибаноміцин, томаіміцин, сибіроміцин, хікаміцин A, неотраміцин A, B і DC-81 (Medicinal Chemistry and Drug Design, ISBN: 978-953-51-0513-8, Ahmed Kamal et al. DOI: 10.5772/38869). Інші аналоги з цієї родини були одержані і були кон'юговані з антитілами, як описано у патентах №№ WO 2011/130598 і WO 2011/130616, явним чином включених шляхом посилання.

Інші цитотоксичні засоби

Інші протипухлинні засоби, які можуть бути кон'юговані з антитілами за даним винаходом, включають BCNU, стрептозоцин, вінкристин і 5-фторурацил, родину засобів, відомих під загальною назвою "комплекс LL-E33288", описану у патентах США №№ 5053394, 5770710, а також есперамiцини (патент США № 5877296).

Ферментативно активні токсини і їхні фрагменти, які можна застосовувати, включають A-ланцюг дифтерійного токсину, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг екзотоксину A (з Pseudomonas aeruginosa), A-ланцюг рицину, A-ланцюг абрину, A-ланцюг модесину, альфа-сарцин, білки Aleurites fordii, діантинові білки, білки Phytolaca americana (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор з Momordica charantia, курцин, кротин, інгібітор з Saponaria officinalis, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени. Див., наприклад, WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р.

Даний винахід додатково передбачає ADC, що утворюється між антитілом і сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для вибіркового руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивний атом. Для одержання радіокон'югованих антитіл доступний ряд радіоактивних ізотопів. Приклади включають At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 і радіоактивні ізотопи Lu.

Радіоактивні або інші мітки можуть бути включені у склад кон'югата відомими способами. Наприклад, пептид можна одержувати шляхом біосинтезу або можна синтезувати шляхом хімічного синтезу амінокислот із застосуванням підходящих попередників амінокислот, що містять, наприклад, фтор-19 замість водню. Мітки, такі як Tc99m або I123, Re186, Re188 і In111, можуть бути приєднані шляхом цистеїнового залишку у пептиді. Ітрій-90 можна приєднати шляхом лізинового залишку. Спосіб з використанням йодогена (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) можна застосовувати для включення йоду-123. У "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) детально описані інші способи.

Для композицій, що містять ряд антитіл, навантаження лікарським засобом представлене у вигляді p, середньої кількості молекул лікарського засобу на антитіло. Навантаження лікарським засобом може варіювати від 1 до 20 молекул лікарського засобу (D) на антитіло. Середню кількість молекул лікарського засобу на антитіло у препараті, одержаному шляхом реакцій кон'югування, можна охарактеризувати за допомогою традиційних способів, таких як мас-спектроскопія, аналіз ELISA і HPLC. Також можна визначити кількісний розподіл кон'югатів антитіло-лікарський засіб за p.

У деяких випадках відділення, очищення однорідних кон'югатів антитіло-лікарський засіб, де p являє собою визначене значення, від кон'югатів антитіло-лікарський засіб з іншим навантаженням лікарським засобом і встановлення їхніх характеристик можна здійснювати за допомогою таких способів, як зворотно-фазова HPLC або електрофорез. В ілюстративних варіантах здійснення p дорівнює 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 або є їхнім дробом.

Одержання сполук-кон'югатів антитіло-лікарський засіб можна здійснювати згідно з будь-якою методикою, відомою фахівцю у даній галузі. Стисло говорячи, сполуки-кон'югати антитіло-лікарський засіб можуть містити антитіло до LY75 як структурну одиницю-антитіло, лікарський засіб і необов'язково лінкер, який з'єднує лікарський засіб і зв'язувальний засіб.

Ряд різних реакцій доступний для ковалентного приєднання лікарських засобів і/або лінкерів зі зв'язувальними засобами. Це можна здійснити шляхом реакції з амінокислотними залишками зв'язувального засобу, наприклад, молекули антитіла, що включають аміногрупи лізину, вільні групи карбонової кислоти глутамінової і аспарагінової кислот, сульфгідрильні групи цистеїну і різні компоненти ароматичних амінокислот. Широко застосовуваним неспецифічним способом ковалентного приєднання є карбодиімідна реакція зв'язування карбоксильної (або аміно-) групи сполуки з аміно- (або карбоксильними) групами антитіла. Додатково, біфункціональні засоби, такі як діальдегіди або імідоестери, застосовувалися для зв'язування аміногрупи сполуки з аміногрупами молекули антитіла.

Також для приєднання лікарських засобів до зв'язувальних засобів доступна реакція утворення основи Шиффа. Даний спосіб включає окиснення періодатом лікарського засобу, що містить гліколеві групи або гідроксигрупи, з утворенням, таким чином, альдегіду, який потім піддають реакції зі зв'язувальним засобом. Приєднання виникає шляхом утворення основи Шиффа з аміногрупами зв'язувального засобу. Ізотіоціанати також можна застосовувати як засоби сполучення для ковалентного приєднання лікарських засобів до зв'язувальних засобів. Інші методики відомі фахівцю у даній галузі і знаходяться у межах обсягу даного винаходу.

У деяких варіантах здійснення проміжну сполуку, що являє собою попередник лінкеру, піддають реакції з лікарським засобом у відповідних умовах. В інших варіантах здійснення застосовують реакційноздатні групи у лікарському засобі і/або проміжній сполуці. Продукт реакції між лікарським засобом і проміжною сполукою, або дериватизований лікарський засіб, потім піддають реакції з антитілом до LY75 за даним винаходом у відповідних умовах.

Буде зрозуміло, що у бажаній сполуці також можна здійснювати хімічні модифікації, щоб зробити реакції цієї сполуки більш придатними з метою одержання кон'югатів за даним винаходом. Наприклад, функціональну групу, наприклад, аміногрупу, гідроксильну або сульфгідрильну групу, можна приєднати до лікарського засобу у положенні, що здійснює мінімальний або допустимий ефект на активність або інші властивості лікарського засобу.

Лінкерні структурні одиниці

Як правило, сполуки-кон'югати антитіло-лікарський засіб містять лінкерну структурну одиницю між структурною одиницею-лікарським засобом і структурною одиницею-антитілом. У деяких варіантах здійснення лінкер розщеплюється у внутрішньоклітинних або позаклітинних умовах, так що при розщепленні лінкеру з антитіла вивільняється структурна одиниця-лікарський засіб у відповідне середовище. Наприклад, солідні пухлини, які секретують визначені протеази, можуть слугувати як цільові для лінкеру, що розщеплюється; в інших варіантах здійснення використовуються саме внутрішньоклітинні протеази. У ще декількох інших варіантах здійснення лінкерна структурна одиниця не є такою, що розщеплюється, і лікарський засіб вивільняється, наприклад, шляхом руйнування антитіл у лізосомах.

У деяких варіантах здійснення лінкер розщеплюється за допомогою розщеплювального засобу, присутнього у внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, у лізосомі, або ендосомі, або у кавеолі). Лінкер може являти собою, наприклад, пептидильний лінкер, що розщеплюється під дією внутрішньоклітинного ферменту пептидази або протеази, у тому числі, без обмежень, лізосомальної або ендосомальної протеази. У деяких варіантах здійснення пептидильний лінкер має довжину щонайменше дві амінокислоти або має довжину щонайменше три амінокислоти або більше.

Розщеплювальні засоби можуть включати, без обмежень, катепсини B і D і плазмін, про всі з яких відомо, що вони гідролізують дипептидні похідні лікарських засобів, що призводить до вивільнення активного лікарського засобу всередині цільових клітин (див., наприклад, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Пептидильні лінкери розщеплюються ферментами, присутніми у клітинах, які експресують LY75. Наприклад, можна застосовувати пептидильний лінкер, що розщеплюється тіол-залежною протеазою катепсином B, що характеризується високим рівнем експресії у раковій тканині (наприклад, лінкер Phe-Leu або Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: X)). Інші приклади таких лінкерів описані, наприклад, у патенті США № 6214345, включеному у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті і у всіх відношеннях.

У деяких варіантах здійснення пептидильний лінкер, що розщеплюється внутрішньоклітинною протеазою, являє собою лінкер Val-Cit або лінкер Phe-Lys (див., наприклад, патент США № 6214345, у якому описаний синтез доксорубіцину за допомогою лінкеру Val-Cit).

В інших варіантах здійснення лінкер, що розщеплюється, є pH-чутливим, інакше кажучи, чутливим до гідролізу при визначених значеннях pH. Як правило, pH-чутливий лінкер гідролізується у кислих умовах. Наприклад, можна застосовувати кислотонестійкий лінкер, що гідролізується у лізосомі (наприклад, гідразон, семікарбазон, тіосемікарбазон, амід цис-аконітової кислоти, ортоестер, ацеталь, кеталь тощо). (Див., наприклад, патенти США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Такі лінкери є відносно стабільними в умовах нейтрального pH, як, наприклад, у крові, але є нестабільними при pH нижче 5,5 або 5,0, приблизному pH у лізосомі. У визначених варіантах здійснення лінкер, що гідролізується, являє собою тіоетерний лінкер (такий як, наприклад, тіоетер, приєднаний до терапевтичного засобу за допомогою ацилгідразонового зв'язку (див., наприклад, патент США № 5622929).

У ще декількох інших варіантах здійснення лінкер розщеплюється у відновлювальних умовах (наприклад, дисульфідний лінкер). З рівня техніки відомий ряд дисульфідних лінкерів, у тому числі, наприклад, тих, які можуть утворюватися із застосуванням SATA (N-сукцинімідил-5-ацетилтіоацетату), SPDP (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонату), SPDB (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)бутирату) і SMPT (N-сукцинімідилоксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридилдитіо)толуолу), SPDB і SMPT. (Див., наприклад, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Див. також патент США № 4880935).

В інших варіантах здійснення лінкер являє собою малонатний лінкер (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), малеімідобензоїльний лінкер (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1299-1304) або 3'-N-амідний аналог (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1305-12).

У ще декількох інших варіантах здійснення лінкерна структурна одиниця не є такою, що розщеплюється, і лікарський засіб вивільняється шляхом руйнування антитіл. (Див. публікацію заявки на патент США № 2005/0238649, включену у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті і у всіх відношеннях).

У багатьох варіантах здійснення лінкер є таким, що сам розщеплюється. Використовуваний у даному документі термін "спейсер, що сам розщеплюється" стосується біфункціонального хімічного компонента, здатного до ковалентного з'єднання двох рознесених хімічних компонентів у стабільну молекулу з трьох частин. Він буде самовільно відділятися від другого хімічного компонента при розщепленні його зв'язку з першим компонентом. Див., наприклад, WO 2007/059404 A2, WO 06/110476 A2, WO 05/112919 A2, WO 2010/062171, WO 09/017394, WO 07/089149, WO 07/018431, WO 04/043493 і WO 02/083180, які стосуються кон'югатів лікарський засіб-субстрат, що розщеплюється, де лікарський засіб і субстрат, що розщеплюється, необов'язково зв'язані за допомогою лінкеру, що сам розщеплюється, і всі з яких явним чином включені шляхом посилання.

Лінкер часто є практично нечутливим до дії позаклітинного середовища. Як використовується у даному документі, "практично нечутливий до дії позаклітинного середовища" стосовно лінкеру означає, що у зразку сполуки-кон'югата антитіло-лікарський засіб

розщеплюється не більш ніж приблизно 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 % або не більш ніж приблизно 1 % лінкерів, якщо сполука-кон'югат антитіло-лікарський засіб присутній у позаклітинному середовищі (наприклад, у плазмі крові).

Те, чи є лінкер практично нечутливим до дії позаклітинного середовища, можна визначити, наприклад, шляхом інкубування сполуки-кон'югата антитіло-лікарський засіб з плазмою крові протягом попередньо визначеного періоду часу (наприклад, 2, 4, 8, 16 або 24 годин) і наступної кількісної оцінки кількості вільного лікарського засобу, присутнього у плазмі крові.

В інших варіантах здійснення, які взаємно не виключають один одного, лінкер сприяє клітинній інтерналізації. У визначених варіантах здійснення лінкер сприяє клітинній інтерналізації, будучи кон'югованим з терапевтичним засобом (інакше кажучи, у середовищі компонента лінкер-терапевтичний засіб сполуки-кон'югата антитіло-лікарський засіб, описаного у даному документі). У ще декількох варіантах здійснення лінкер сприяє клітинній інтерналізації, будучи кон'югованим як з ауристатиновою сполукою, так і з антитілами до LY75 за даним винаходом.

Ряд ілюстративних лінкерів, які можна застосовувати у композиціях і способах за даним винаходом, описаний у WO 2004/010957, публікації заявки на патент США № 2006/0074008, публікації заявки на патент США № 2005/0238649 і публікації заявки на патент США № 2006/0024317 (кожна з яких включена у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті і у всіх відношеннях).

Навантаження лікарським засобом

Навантаження лікарським засобом представлене у вигляді p і є середньою кількістю компонентів-лікарських засобів на антитіло у молекулі. Навантаження лікарським засобом ("p") може становити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше компонентів (D) на антитіло, хоча часто середня кількість є дробовим числом або десятковим дробом. Зазвичай навантаження лікарським засобом від 1 до 4 є часто застосовуваним, і від 1 до 2 також є застосовуваним. ADC за даним винаходом включають групи антитіл, кон'югованих з рядом компонентів-лікарських засобів у кількості від 1 до 20, наприклад, 1-15, 1-10, 2-9, 3-8, 4-7, 5-6. Середню кількість компонентів-лікарських засобів на антитіло у препаратах ADC, одержаних у результаті реакцій кон'югування, можна охарактеризувати за допомогою традиційних способів, таких як мас-спектроскопія і аналіз ELISA.

Також можна визначити кількісний розподіл ADC за p. У деяких випадках відділення, очищення однорідних ADC, де p являє собою визначене значення, від ADC з іншим навантаженням лікарським засобом і встановлення їхніх характеристик можна здійснювати за допомогою таких способів, як електрофорез.

Для деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб p може бути обмежено кількістю ділянок приєднання в антитілі. Наприклад, якщо приєднання виникає за тіольною групою цистеїну, як у вищеописаних ілюстративних варіантах здійснення, антитіло може мати тільки одну або декілька тіольних груп цистеїну або може мати тільки одну або декілька достатньо реакційноздатних тіольних груп, за допомогою яких може бути приєднаний лінкер. У визначених варіантах здійснення більш високе навантаження лікарським засобом, наприклад, $p > 5$, може викликати агрегацію, нерозчинність, токсичність визначених кон'югатів антитіло-лікарський засіб або втрату клітинної проникності для них. У визначених варіантах здійснення навантаження лікарським засобом для ADC за даним винаходом варіює у діапазоні від 1 до приблизно 8; від приблизно 2 до приблизно 6; від приблизно 3 до приблизно 5; від приблизно 3 до приблизно 4; від приблизно 3,1 до приблизно 3,9; від приблизно 3,2 до приблизно 3,8; від приблизно 3,2 до приблизно 3,7; від приблизно 3,2 до приблизно 3,6; від приблизно 3,3 до приблизно 3,8 або від приблизно 3,3 до приблизно 3,7. У дійсності було показано, що для визначених ADC оптимальний показник кількості компонентів-лікарських засобів на антитіло може становити менше 8 і може становити від приблизно 2 до приблизно 5. Див. US 2005/0238649 A1 (включений у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті).

У визначених варіантах здійснення у ході реакції кон'югування з антитілом кон'югують компоненти-лікарські засоби у кількості, меншій, ніж теоретичний максимум. Антитіло може містити, наприклад, лізинові залишки, які не реагують з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом, як обговорюється нижче. Антитіла зазвичай містять небагато вільних і реакційноздатних тіольних груп цистеїну, які можуть бути зв'язані з компонентом-лікарським засобом; у дійсності більшість тіольних груп цистеїнових залишків в антитілах існують як дисульфідні містки. У визначених варіантах здійснення антитіло можна відновити за допомогою відновлювача, такого як дитіотреїтол (DTT) або трикарбонілетилфосфін (TCEP), в умовах часткового або повного відновлення з утворенням реакційноздатних тіольних груп цистеїну. У визначених варіантах здійснення антитіло піддають впливу денатуруючих умов з

виявленням реакційноздатних нуклеофільних груп, таких як у лізині або цистеїні.

Навантаження (співвідношення лікарський засіб/антитіло) в ADC можна регулювати різними способами, наприклад, шляхом: (i) обмеження молярного надлишку проміжної сполуки лікарський засіб-лінкер або лінкерного реагенту порівняно з антитілом, (ii) обмеження тривалості або температури реакції кон'югування, (iii) застосування умов часткового або обмеженого відновлення для модифікації тіольних груп цистеїну, (iv) конструювання за допомогою рекомбінантних методик амінокислотної послідовності антитіла таким чином, щоб модифікувати кількість і положення цистеїнових залишків для регулювання кількості і/або положення приєднуваних компонентів лінкер-лікарський засіб (як, наприклад, у випадку тіо-Mab або тіо-Fab, одержуваних згідно з розкритим у даному документі і в WO 2006/034488 (включеній у даний документ шляхом посилання у всій своїй повноті)).

Слід розуміти, що у випадку, якщо більш ніж одна нуклеофільна група реагує з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом, а потім з реагентом компонентом-лікарським засобом, то одержуваний продукт являє собою суміш сполук ADC з розподілом одного або більше компонентів-лікарських засобів, приєднаних до антитіла. У суміші можна розрахувати середню кількість лікарських засобів на антитіло за допомогою подвійного аналізу антитіл ELISA, специфічного для антитіла і специфічного для лікарського засобу. Окремі молекули ADC можна ідентифікувати у суміші за допомогою мас-спектроскопії і розділити за допомогою HPLC, наприклад, хроматографії гідрофобних взаємодій.

У деяких варіантах здійснення однорідний ADC з єдиним значенням навантаження можна виділити з суміші кон'югатів за допомогою електрофорезу або хроматографії.

Способи визначення цитотоксичного ефекту ADC

Відомі способи визначення того, чи викликає лікарський засіб або кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичний і/або цитотоксичний ефект по відношенню до клітини. Як правило, цитотоксичну або цитостатичну активність кон'югата антитіло-лікарський засіб можна виміряти шляхом здійснення впливу на клітини ссавців, які експресують цільовий білок, кон'югата антитіло-лікарський засіб у середовищі для культури клітин; культивування клітин протягом періоду від приблизно 6 годин до приблизно 5 днів і вимірювання життєздатності клітин. Клітинні аналізи in vitro можна застосовувати для вимірювання життєздатності (проліферації), цитотоксичності й індукції апоптозу (активації каспаз) кон'югатом антитіло-лікарський засіб.

Для визначення того, чи викликає кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичний ефект, можна застосовувати аналіз включення тимідину. Наприклад, ракові клітини, які експресують цільовий антиген при щільності 5000 клітин/лунка в 96-лункових планшетах, можна культивувати протягом періоду 72 годин і піддавати впливу 0,5 мкКі ^{3}H-тимідину протягом останніх 8 годин 72-годинного періоду. Включення ^{3}H-тимідину у клітини культури вимірюють у присутності і за відсутності кон'югата антитіло-лікарський засіб.

Для визначення цитотоксичності можна виміряти некроз або апоптоз (запрограмовану загибель клітин). Некроз зазвичай супроводжується підвищенням проникності плазматичної мембрани; набряком клітини і розривом плазматичної мембрани. Апоптоз зазвичай характеризується утворенням пузирів мембрани, конденсацією цитоплазми і активацією ендогенних ендонуклеаз. Визначення будь-якого з цих ефектів по відношенню до ракових клітин вказує на те, що кон'югат антитіло-лікарський засіб є застосовуваним у лікуванні форм раку.

Життєздатність клітин можна виміряти шляхом визначення у клітині поглинання барвника, такого як нейтральний червоний, трипановий синій або ALAMAR™ синій (див., наприклад, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). У такому аналізі клітини інкубують у середовищі, що містить барвник, клітини промивають, і барвник, що залишився, який відбиває поглинання клітинами барвника, вимірюють спектрофотометрично. Зв'язувальний з білками барвник сульфородамін B (SRB) також можна застосовувати для вимірювання цитотоксичності (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

В альтернативному випадку сіль тетразолію, таку як MTT, застосовують у кількісному колориметричному аналізі виживання і проліферації клітин ссавців шляхом визначення живих, але не мертвих, клітин (див., наприклад, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

Апоптоз можна оцінити кількісним шляхом вимірювання, наприклад, фрагментації ДНК. Доступні комерційно фотометричні способи кількісного визначення фрагментації ДНК in vitro. Приклади таких аналізів, що включають TUNEL (у якому виявляють включення мічених нуклеотидів у фрагментовану ДНК) і аналізи на основі ELISA, описані у Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Апоптоз також можна визначити шляхом вимірювання морфологічних змін у клітині. Наприклад, як і у випадку некрозу, втрату цілісності плазматичної мембрани можна визначити

шляхом вимірювання поглинання визначених барвників (наприклад, флуоресцентного барвника, такого як, наприклад, акридиновий жовтогарячий або бромід етидію). Спосіб вимірювання кількості апоптозних клітин був описаний у Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Також можна мітити клітини барвником для ДНК (наприклад, акридиновим жовтогарячим, бромідом етидію або йодидом пропідію) і спостерігати у клітинах конденсацію хроматину і його крайове розташування уздовж внутрішньої ядерної мембрани. Інші морфологічні зміни, які можна виміряти для визначення апоптозу, включають, наприклад, конденсацію цитоплазми, підвищене утворення пузирів мембрани і стиснення клітини.

Наявність апоптозних клітин можна виміряти як у закріпленому, так і в "плаваючому" компартментах культур. Наприклад, обидва компартменти можна зібрати шляхом вилучення надосадової рідини, трипсинізації закріплених клітин, об'єднання препаратів після етапу промивання шляхом центрифугування (наприклад, протягом 10 хвилин при 2000 об./хв.) і виявлення апоптозу (наприклад, шляхом вимірювання фрагментації ДНК). (Див., наприклад, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16).

In vivo ефект терапевтичної композиції антитіла до LY75 за даним винаходом можна оцінити у підходящій тваринній моделі. Наприклад, можна застосовувати ксеногенні моделі раку, де експлантати ракових пухлин або пасировані ксенотрансплантатні тканини вводять тваринам з послабленим імунітетом, таким як "голі" або які мають SCID миші (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Ефективність можна виміряти за допомогою аналізів, у яких вимірюють інгібування утворення пухлини, регресії пухлини або метастазування тощо.

Терапевтичні композиції, застосовувані у практичному здійсненні вищеописаних способів, можна складати у фармацевтичні композиції, що містять носій, підходящий для бажаного способу доставки. Підходящі носії включають будь-який матеріал, який при об'єднанні з терапевтичною композицією зберігає протипухлинну функцію терапевтичної композиції і на який зазвичай не реагує імунна система пацієнта. Приклади включають, без обмежень, будь-який з ряду стандартних фармацевтичних носіїв, таких як стерильні забуферені фосфатом фізіологічні розчини, бактеріостатична вода тощо (див. у загальному плані Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Способи одержання антитіл за даним винаходом

У даному винаході додатково представлені способи одержання розкритих антитіл до LY75. Ці способи охоплюють культивування клітини-хазяїна, що містить виділену(виділені) нуклеїнову(нуклеїнові) кислоту(кислоти), які кодують антитіла за даним винаходом. Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, це можна виконувати рядом способів залежно від природи антитіла. У деяких варіантах здійснення у тому випадку, коли антитіла за даним винаходом являють собою традиційні антитіла повної довжини, наприклад, варіабельна область важкого ланцюга і варіабельна область легкого ланцюга знаходяться у таких умовах, що антитіло утворюється і може бути виділено.

Варіабельні ділянки важких і легких ланцюгів LY75_A1 розкриті у даному документі (послідовності як білка, так і нуклеїнової кислоти); як буде зрозуміло у даній галузі, їх можна легко збільшувати з одержанням важких і легких ланцюгів повної довжини. Інакше кажучи, за наявності фрагментів ДНК, які кодують V_H- і V_K-сегменти, стисло описані у даному документі, ці фрагменти ДНК можна піддати додатковим маніпуляціям за допомогою стандартних методик рекомбінантних ДНК, наприклад, для перетворення генів варіабельних областей у гени ланцюгів антитіл повної довжини, у гени Fab-фрагментів або у ген scFv. У ході цих маніпуляцій утворюють функціональний зв'язок фрагмента ДНК, який кодує V_K або V_H, з іншим фрагментом ДНК, який кодує інший білок, такий як константна область антитіла або гнучкий лінкер. Термін "функціонально зв'язаний", як використовується у даному контексті, мається на увазі як такий, що означає, що два фрагменти ДНК з'єднані таким чином, що амінокислотні послідовності, які кодуються двома фрагментами ДНК, залишаються всередині рамки зчитування.

Виділену ДНК, яка кодує V_H-область, можна перетворити у ген важкого ланцюга повної довжини шляхом утворення функціонального зв'язку ДНК, яка кодує V_H, з іншою молекулою ДНК, яка кодує константні області важкого ланцюга (C_H1, C_H2 і C_H3). Послідовності генів мишиних константних областей важких ланцюгів відомі з рівня техніки [див., наприклад, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], і фрагменти ДНК, які охоплюють ці області, можна одержувати шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації.

Константна область важкого ланцюга може являти собою константну область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD, але найбільш переважно являє собою константну область IgG1 або IgG4. У випадку гена важкого ланцюга Fab-фрагмента можна утворювати

функціональний зв'язок ДНК, яка кодує V_H, з іншою молекулою ДНК, яка кодує тільки константну область C_H1 важкого ланцюга.

Виділену ДНК, яка кодує VL/VK-область, можна перетворити у ген легкого ланцюга повної довжини (а також ген легкого ланцюга Fab) шляхом утворення функціонального зв'язку ДНК, яка кодує V_L, з іншою молекулою ДНК, яка кодує константну область легкого ланцюга C_L. Послідовності генів мишиних константних областей легких ланцюгів відомі з рівня техніки [див., наприклад, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], і фрагменти ДНК, які охоплюють ці області, можна одержувати шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. У переважних варіантах здійснення константна область легкого ланцюга може являти собою константну область каппа- або лямбда-ланцюга.

Для одержання гена scFv утворюють функціональний зв'язок фрагментів ДНК, які кодують V_H- і V_L/V_K, з іншим фрагментом, який кодує гнучкий лінкер, наприклад, який кодує амінокислотну послідовність $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, так що послідовності V_H і V_L/V_K можуть експресуватися у вигляді безперервного одноланцюгового білка, при цьому V_L/V_K- і V_H-області з'єднані гнучким лінкером [див., наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423- 426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554].

Зазвичай представлені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіла за даним винаходом. Такі полінуклеотиди кодують як варіабельні, так і константні області кожного з важкого і легкого ланцюгів, хоча інші комбінації також передбачені даним винаходом згідно з композиціями, описаними у даному документі. Даний винахід також передбачає олігонуклеотидні фрагменти, одержані з розкритих полінуклеотидів і послідовностей нуклеїнових кислот, комплементарних цим полінуклеотидам.

Полінуклеотиди можуть знаходитися у формі РНК або ДНК. Полінуклеотиди у формі ДНК, кДНК, геномної ДНК, аналогів нуклеїнових кислот і синтетичних ДНК знаходяться у межах обсягу даного винаходу. ДНК може бути двонитковою або однонитковою, і у випадку однониткової може являти собою кодуючу (смислову) нитку або некодуючу (антисмислову) нитку. Кодуюча послідовність, яка кодує поліпептид, може бути ідентична кодуючій послідовності, представленій у даному документі, або може бути іншою кодуючою послідовністю, чия послідовність внаслідок надлишковості або виродженості генетичного коду кодує ті ж поліпептиди, що і ДНК, представлена у даному документі.

У деяких варіантах здійснення нуклеїнова(нуклеїнові) кислота(кислоти), які кодують антитіла за даним винаходом, включені у склад векторів експресії, які можуть бути позахромосомними або призначеними для інтегрування у геном клітини-хазяїна, у яку їх вводять. Вектори експресії можуть містити будь-яку кількість відповідних регуляторних послідовностей (що включають, без обмежень, послідовності для контролю транскрипції і трансляції, промотори, сайти зв'язування рибосоми, енхансери, точки початку реплікації тощо) або інші компоненти (селектовані гени тощо), всі з яких функціонально зв'язані, як добре відомо з рівня техніки. У деяких випадках застосовують дві нуклеїнові кислоти, і кожну поміщають в окремий вектор експресії (наприклад, важкий ланцюг у перший вектор експресії, легкий ланцюг у другий вектор експресії) або, в альтернативному випадку, їх можна помістити в один і той же вектор експресії. Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що конструкція вектора(векторів) експресії, у тому числі вибір регуляторних послідовностей, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-хазяїна, бажаний рівень експресії білка тощо.

Нуклеїнові кислоти і/або системи експресії зазвичай можна вводити у підходящу клітину-хазяїна з одержанням рекомбінантної клітини-хазяїна за допомогою будь-якого способу, підходящого для вибраної клітини-хазяїна (наприклад, трансформації, трансфекції, електропорації, інфікування), таким чином, що молекула(молекули) нуклеїнової кислоти функціонально зв'язані з одним або більше елементами контролю експресії (наприклад, у векторі, у конструкті, одержаному за допомогою процесів у клітині, інтегрованому у геном клітини-хазяїна). Одержану у результаті рекомбінантну клітину-хазяїна можна витримувати в умовах, підходящих для експресії (наприклад, у присутності індуктора, у підходящій відмінній від людини тварині, у підходящому культуральному середовищі, доповненому відповідними солями, карбодиімідами росту, антибіотиками, харчовими добавками тощо), у результаті чого утворюються кодований(кодовані) поліпептид(поліпептиди). У деяких випадках важкі ланцюги утворюються в одній клітині, а легкі ланцюги - в іншій.

Лінії клітин ссавців, доступних як хазяїв для експресії, відомі з рівня техніки і включають велику кількість імморталізованих ліній клітин, доступних з Американської колекції типових культур (ATCC), Манассас, Вірджинія, у тому числі, без обмежень, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), клітини HEK293, клітини NSO, клітини HeLa, клітини нирки новонародженого

хом'яка (BHK), клітини нирки мавпи (COS), клітини гепатоцелюлярної карциноми людини (наприклад, Hep G2) і ряд інших ліній клітин. Клітини, відмінні від клітин ссавців, що включають, без обмежень, клітини бактерій, дріжджів, комах і рослин, також можна застосовувати для експресії рекомбінантних антитіл. У деяких варіантах здійснення антитіла можна одержувати у трансгенних тварин, таких як корови або курки.

Загальні способи молекулярної біології, експресії, очищення і скринінгу антитіл добре відомі, див., наприклад, патенти США №№ 4816567, 4816397, 6331415 і 7923221, а також Antibody Engineering під редакцією Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 і 2010, Hayhurst & Georgiou, 2001, CurrOpin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; і Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

Фармацевтичні композиції

В іншому аспекті у даному винаході представлена композиція, наприклад, фармацевтична композиція, що містить одне або комбінацію з антитіл до LY75 або їхніх антигензв'язувальних частин за даним винаходом, складені разом з фармацевтично прийнятним носієм. Такі композиції можуть містити одне або комбінацію з (наприклад, два або більше різних) антитіл, або імунокон'югатів, або біспецифічних молекул за даним винаходом. Наприклад, фармацевтична композиція за даним винаходом може містити комбінацію антитіл (або імунокон'югатів, або біспецифічних молекул), які зв'язуються з різними епітопами на цільовому антигені або які мають взаємодоповнюючі види активності.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом також можна вводити у ході комбінованої терапії, тобто у комбінації з іншими засобами. Наприклад, комбінована терапія може передбачати антитіло за даним винаходом у комбінації щонайменше з одним іншим протипухлинним засобом або протизапальним або імунодепресивним засобом. Приклади терапевтичних засобів, які можна застосовувати у комбінованій терапії, більш детально описані нижче у розділі, що стосується шляхів застосування антитіл за даним винаходом.

Як використовується у даному документі, "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які можливі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні засоби і засоби, що сповільнюють всмоктування тощо, які є фізіологічно сумісними. Носій переважно підходить для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, парентерального, спінального або епідермального введення (наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії). Залежно від шляху введення активна сполука, тобто антитіло, імунокон'югат або біспецифічна молекула, можуть бути покриті матеріалом для захисту сполуки від дії кислот і інших природних умов, які можуть інактивувати сполуку.

Фармацевтичні сполуки за даним винаходом можуть включать у себе одну або більше фармацевтично прийнятних солей. "Фармацевтично прийнятна сіль" стосується солі, яка зберігає бажану біологічну активність вихідної сполуки і не викликає ніяких небажаних токсичних ефектів [див., наприклад, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]. Приклади таких солей включають солі приєднання кислоти і солі приєднання основи. Солі приєднання кислоти включають солі, одержані з нетоксичних неорганічних кислот, таких як хлористоводнева, азотна, фосфорна, сірчана, бромистоводнева, йодистоводнева, фосфориста тощо, а також з нетоксичних органічних кислот, таких як аліфатичні моно- і дикарбонові кислоти, фенілзаміщені алканові кислоти, гідроксіалканові кислоти, ароматичні кислоти, аліфатичні й ароматичні сульфонові кислоти тощо. Солі приєднання основи включають солі, одержані з лужноземельних металів, таких як натрій, калій, магній, кальцій тощо, а також з нетоксичних органічних амінів, таких як N,N'-дибензилетилендіамін, N-метилглюкамін, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, етилендіамін, прокаїн тощо.

Фармацевтична композиція за даним винаходом також може містити фармацевтично прийнятний антиоксидант. Приклади фармацевтично прийнятних антиоксидантів включають: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, гідрохлорид цистеїну, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфіт натрію тощо; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутильований гідроксіанізол (BHA), бутильований гідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол тощо; і (3) засоби, які хелатують метали, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота тощо.

Приклади підходящих водних і неводних носіїв, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях за даним винаходом, включають воду, етанол, поліоли (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь тощо) і їхні підходящі суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, і ін'єкційні органічні естери, такі як етилолеат. Відповідну текучість можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування матеріалів покриття, таких як лецитин, шляхом підтримування потрібного розміру частинок у випадку дисперсій і шляхом застосування

поверхнево-активних речовин.

Ці композиції також можуть містити допоміжні засоби, такі як консерванти, змочувальні засоби, емульгатори і диспергатори. Попередження наявності мікроорганізмів можна забезпечувати як за допомогою процедур стерилізації, описаних вище, так і шляхом включення різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабену, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти тощо. Також може бути бажаним включення у композиції ізотонічних засобів, таких як цукри, хлорид натрію тощо. На додаток, пролонгованого всмоктування ін'єкційної фармацевтичної форми можна досягти шляхом включення засобів, які сповільнюють всмоктування, таких як моностеарат алюмінію і желатин.

Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії та стерильні порошки для одержання стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій для негайного прийому. Застосування таких середовищ та засобів для фармацевтично активних речовин відомо з рівня техніки. За винятком випадків, коли які-небудь традиційні середовища або засоби несумісні з активною сполукою, передбачається їхнє застосування у фармацевтичних композиціях за даним винаходом. У склад композицій також можуть бути включені додаткові активні сполуки.

Терапевтичні композиції, як правило, повинні бути стерильними і стабильними в умовах виробництва і зберігання. Композицію можна скласти у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, підходящої для високої концентрації лікарського засобу. Носій може являти собою розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь тощо) і їхні підходящі суміші. Відповідну текучість можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримування потрібного розміру частинок у випадку дисперсії і шляхом застосування поверхнево-активних речовин. У багатьох випадках буде переважним включення у композицію ізотонічних засобів, наприклад, цукрів, багатоатомних спиртів, таких як маніт, сорбіт, або хлориду натрію. Пролонгованого всмоктування ін'єкційних композицій можна досягти шляхом включення у композицію засобу, який сповільнює всмоктування, наприклад, моностеаратних солей і желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини можна одержувати шляхом включення активної сполуки у необхідній кількості у відповідному розчиннику з одним або комбінацією з інгредієнтів, перерахованих вище, при необхідності, з наступною стерилізаційною мікрофільтрацією. Дисперсії, як правило, одержують шляхом включення активної сполуки у стерильний наповнювач, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами одержання є вакуумна сушка і сублімаційна сушка (ліофілізація), за допомогою яких одержують порошкову форму активного інгредієнта, а також будь-якого додаткового бажаного інгредієнта з їхнього розчину, раніше підданого стерилізуючій фільтрації.

Кількість активного інгредієнта, яку можна об'єднати з матеріалом носія з одержанням одиничної лікарської форми, буде варіювати залежно від суб'єкта, якого піддають лікуванню, і конкретного способу введення. Кількість активного інгредієнта, яку можна об'єднати з матеріалом носія з одержанням одиничної лікарської форми, як правило, буде являти собою таку кількість композиції, яка викликає терапевтичний ефект. Зі 100 відсотків ця кількість зазвичай буде варіювати у діапазоні від приблизно 0,01 відсотка до приблизно 99 відсотків активного інгредієнта, переважно від приблизно 0,1 відсотка до приблизно 70 відсотків, найбільш переважно від приблизно 1 відсотка до приблизно 30 відсотків активного інгредієнта у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Режими дозування коректують для одержання оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної відповіді). Наприклад, можна вводити одноразову болюсну дозу, можна вводити декілька розділених доз протягом деякого часу, або дозу можна пропорційно знизити або підвищити, на що вказують потреби терапевтичної ситуації. Особливо переважним є складання парентеральних композицій у стандартній лікарській формі для простоти введення і рівномірності дозування. Стандартна лікарська форма, як використовується у даному документі, стосується фізично дискретних одиниць, підходящих як одноразові дози для суб'єктів, яких піддають лікуванню; кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активної сполуки, розраховану для одержання бажаного терапевтичного ефекту, спільно з необхідним фармацевтичним носієм. Технічні вимоги до стандартних лікарських форм за даним винаходом обумовлені (a) унікальними характеристиками активної сполуки і конкретним терапевтичним ефектом, якого слід досягти, і (b) властивими обмеженнями у галузі приготування такої активної сполуки по відношенню до лікування індивідуумів з чутливістю, і безпосередньо залежать від

них.

Для введення антитіла доза варіює у діапазоні від приблизно 0,0001 до 100 мг/кг, наприклад, від 0,001 до 50 мг/кг, від 0,005 до 20 мг/кг, від 0,01 до 10 мг/кг і частіше від 0,01 до 5 мг/кг маси тіла реципієнта. Наприклад, дози можуть становити 0,05 мг/кг маси тіла, 0,1 мг/кг маси тіла, 0,3 мг/кг маси тіла, 0,3 мг/кг маси тіла, 0,5 мг/кг маси тіла, 1 мг/кг маси тіла, 2 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла, 4 мг/кг маси тіла, 5 мг/кг маси тіла, 6 мг/кг маси тіла, 7 мг/кг маси тіла, 8 мг/кг маси тіла, 9 мг/кг маси тіла, 10 мг/кг маси тіла, 12 мг/кг маси тіла, 15 мг/кг маси тіла, 20 мг/кг маси тіла, 25 мг/кг маси тіла, 30 мг/кг маси тіла або знаходитися у діапазоні 0,1-20 мг/кг, 0,5-15 мг/кг, 1-10 мг/кг, 2-8 мг/кг, 3-7 мг/кг, 4-6 мг/кг. Ілюстративний режим лікування включає у себе введення один раз на день, один раз у 2 дні, один раз на тиждень, один раз у два тижні, один раз у три тижні, один раз у чотири тижні, один раз на місяць, один раз у 6 тижнів, один раз у 3 місяці або один раз у три-6 місяців. Переважні режими дозування антитіла до LY75 за даним винаходом включають 1 мг/кг маси тіла або 3 мг/кг маси тіла за допомогою внутрішньовенного введення, при цьому антитіло приймають з використанням однієї з таких схем дозування: (i) кожні чотири тижні для шести доз, потім кожні три місяці; (ii) кожні три тижні; (iii) 3 мг/кг маси тіла одноразово, а потім 1 мг/кг маси тіла кожні три тижні.

У деяких способах одночасно вводять два або більше моноклональних антитіла з різними специфічностями зв'язування, і у цьому випадку доза кожного введеного антитіла входить у вказані діапазони. Антитіло зазвичай вводять декілька разів. Інтервали між прийомами окремих доз можуть відповідати, наприклад, введенню раз у день, два рази на тиждень, раз на тиждень, раз на місяць, кожні три місяці, кожні шість місяців або один раз на рік. Інтервали можуть бути нерегулярними, на що вказує вимірювання рівнів антитіла до цільового антигену у крові пацієнта. У деяких способах дозу коригують для досягнення концентрації антитіла у плазмі крові, що становить приблизно 1-1000 мкг/мл, 5-750 мкг/мл, 10-600 мкг/мл, 15-500 мкг/мл, 20-400 мкг/мл і у деяких способах приблизно 25-300 мкг/мл.

В альтернативному випадку антитіло можна вводити як склад зі сповільненим вивільненням, і у цьому випадку потрібно менш часте введення. Доза і частота варіюють залежно від періоду напіввиведення антитіла з організму пацієнта. Як правило, найбільш тривалий період напіввиведення демонструють антитіла людини, за якими слідують гуманізовані антитіла, химерні антитіла і антитіла, відмінні від людських. Доза і частота введення може варіювати залежно від того, чи лікування є профілактичним або терапевтичним. У профілактичних шляхах застосування відносно низьку дозу вводять з відносно нечастими інтервалами протягом тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують одержувати лікування до кінця свого життя. У терапевтичних шляхах застосування іноді потрібно введення відносно високих доз з відносно короткими інтервалами до зменшення або припинення прогресування захворювання і переважно до тих пір, поки пацієнт не продемонструє часткового або повного зменшення інтенсивності симптомів захворювання. Після цього у відношенні пацієнта можна застосовувати профілактичний режим.

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях за даним винаходом можна змінювати для того, щоб одержати кількість активного інгредієнта, ефективну для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретних пацієнта, композиції та способу введення без токсичності для пацієнта. Вибраний рівень дози буде залежати від ряду фармакокінетичних факторів, що включають активність конкретних використовуваних композицій за даним винаходом або їхніх естеру, солі або аміду, шляху введення, часу введення, швидкості екскреції конкретної використовуваної сполуки, тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук та/або матеріалів, застосовуваних у комбінації з конкретними використовуваними композиціями, віку, статі, маси, стану, загального стану здоров'я та анамнезу пацієнта, якого піддають лікуванню, і подібних факторів, добре відомих у галузі медицини.

"Терапевтично ефективна доза" антитіла до LY75 за даним винаходом переважно призводить до зменшення тяжкості симптомів захворювання, збільшення частоти і тривалості безсимптомних періодів захворювання або попередження погіршення стану або втрати працездатності у зв'язку з ураженням захворюванням. Наприклад, для лікування пухлин, опосередкованих LY75, "терапевтично ефективна доза" переважно інгібує ріст клітин або ріст пухлини щонайменше на приблизно 20 %, щонайменше на приблизно 30 %, більш переважно щонайменше на приблизно 40 %, щонайменше на приблизно 50 %, ще більш переважно щонайменше на приблизно 60 %, щонайменше на приблизно 70 % і навіть ще більш переважно щонайменше на приблизно 80 % або щонайменше приблизно на 90 % порівняно зі суб'єктами, які не одержували лікування. Здатність сполуки до інгібування росту пухлини можна оцінити у тваринній модельній системі, що пророкує ефективність по відношенню до пухлин людини. В

альтернативному випадку дану властивість композиції можна оцінити шляхом вивчення здатності сполуки до інгібування росту клітин, при цьому таке інгібування можна виміряти in vitro за допомогою аналізів, відомих практикуючому фахівцю. Терапевтично ефективна кількість терапевтичної сполуки може забезпечувати зменшення розміру пухлини або іншим чином зменшувати інтенсивність симптомів у суб'єкта. Середній фахівець у даній галузі буде здатний визначити такі кількості на основі таких факторів, як габарити суб'єкта, тяжкість симптомів суб'єкта і конкретна композиція або вибраний шлях введення.

Композицію за даним винаходом можна вводити за допомогою одного або більше шляхів введення за допомогою одного або більше з ряду способів, відомих з рівня техніки. Як буде зрозуміло фахівцю у даній галузі, шлях і/або спосіб введення будуть варіювати залежно від бажаних результатів Переважні шляхи введення антитіл за даним винаходом включають внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньошкірний, внутрішньоочеревинний, підшкірний, спінальний або інші парентеральні шляхи введення, наприклад, за допомогою ін'єкції або інфузії. Фраза "парентеральне введення", як використовується у даному документі, означає способи введення, відмінні від ентерального та місцевого введення, зазвичай за допомогою ін'єкції, і включає, без обмежень, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну, інтратекальну, внутрішньокапсулярну, внутрішньоочну, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньоочеревинну, транстрахеальну, підшкірну, субкутикулярну, внутрішньосуглобову, субкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, епідуральну і внутрішньогрудну ін'єкцію й інфузію.

В альтернативному випадку антитіло за даним винаходом можна вводити за допомогою непарентерального шляху, такого як місцевий, епідермальний або черезслизовий шлях введення, наприклад, інтраназально, перорально, вагінально, ректально, сублінгвально або місцево.

Активні сполуки можна одержувати з носіями, які будуть захищати сполуку від швидкого вивільнення, як, наприклад, у складі з контрольованим вивільненням, у тому числі імплантатах, трансдермальних пластирах і мікроінкапсульованих системах доставки. Можна застосовувати біосумісні полімери, які біорозкладаються, такі як сополімер етилену та вінілацетату, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоестери і полімолочна кислота. Багато способів одержання таких складів запатентовані або загальновідомі фахівцям у даній галузі [див., наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Терапевтичні композиції можна вводити за допомогою медичних пристроїв, відомих з рівня техніки. Наприклад, у переважному варіанті здійснення терапевтичну композицію за даним винаходом можна вводити за допомогою безголкового пристрою для підшкірних ін'єкцій, такого як пристрої, розкриті у патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 або 4596556. Приклади добре відомих імплантатів і модулів, застосовуваних у даному винаході, включають: придатну для імплантації мікроінфузійну помпу для дозування ліків з контрольованою швидкістю, розкриту у патенті США № 4487603; терапевтичний пристрій для введення лікарських препаратів через шкіру, розкритий у патенті США № 4486194; помпу для інфузії ліків для доставки ліків з точною швидкістю інфузії, розкриту у патенті США № 4447233; придатний для імплантації інфузійний прилад зі змінним об'ємом подачі для безперервної доставки лікарського засобу, розкритий у патенті США № 4447224; осмотичну систему доставки лікарських засобів, яка має багатокамерні відділи, розкриту у патенті США № 4439196; і осмотичну систему доставки лікарських засобів, розкриту у патенті США № 4475196. Ці патенти включені у даний документ шляхом посилання. Фахівцям у даній галузі відомо багато інших таких імплантатів, систем доставки і модулів.

У визначених варіантах здійснення моноклональні антитіла за даним винаходом можна скласти для забезпечення належного розподілу in vivo. Наприклад, гематоенцефалічний бар'єр (BBB) не пропускає багато високогідрофільних сполук. Для забезпечення перетинання BBB терапевтичними сполуками за даним винаходом (за бажанням) їх можна скласти, наприклад, у ліпосомах. Стосовно способів одержання ліпосом див., наприклад, патенти США 4522811; 5374548 і 5399331. Ліпосоми можуть містити один або більше компонентів, які вибірково транспортуються у конкретні клітини або органи, що, таким чином, підвищує якість цілеспрямованої доставки лікарських засобів [див., наприклад, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685]. Ілюстративні націлюючі компоненти включають фолат або біотин (див., наприклад, патент США 5416016); манозиди [Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Common. 153:1038]; антитіла [P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]; рецептор поверхнево-активного білка A [Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090]; див. також

K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Шляхи застосування і способи

Антитіла, композиції антитіл і способи за даним винаходом мають численні види діагностичної і терапевтичної корисності in vitro та in vivo, що включають діагностику і лікування порушень, опосередкованих LY75.

У деяких варіантах здійснення ці молекули можна вводити в клітини у культурі in vitro або ex vivo або суб'єктам-людям, наприклад, in vivo, для лікування, попередження і діагностики ряду порушень. Як використовується у даному документі, термін "суб'єкт" розуміється як такий, що включає людину і відмінних від людини тварин. Відмінні від людини тварини включають всіх хребетних тварин, наприклад, ссавців і не ссавців, таких як відмінні від людини примати, вівці, собаки, кішки, корови, коні, курки, земноводні і плазуни. Переважні суб'єкти включають пацієнтів-людей, які мають порушення, опосередковані активністю LY75. Способи особливо підходять для лікування пацієнтів-людей, які мають порушення, асоційоване з аномальною експресією LY75. Якщо антитіла до LY75 вводять разом з іншим засобом, то ці два засоби можна вводити у будь-якому порядку або одночасно.

З урахуванням специфічного зв'язування антитіл за даним винаходом з LY75 антитіла за даним винаходом можна застосовувати для специфічного виявлення експресії LY75 на поверхні клітин і, більш того, можна застосовувати для очищення LY75 шляхом імуноафінного очищення.

Крім того, з урахуванням експресії LY75 на пухлинних клітинах антитіла, композиції антитіл і способи за даним винаходом можна застосовувати для лікування суб'єкта з онкогенним порушенням, наприклад, порушенням, що характеризується наявністю пухлинних клітин, які експресують LY75, або у виробництві лікарського препарату для лікування такого порушення, що включає, наприклад, рак шлунка, рак нирки, рак щитоподібної залози, рак стравоходу, рак голови і шиї, рак шкіри, рак печінки, рак підшлункової залози, рак ободової і прямої кишки, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак молочної залози, у тому числі тричі негативний рак молочної залози, рак яєчника, рак легені, мієлому, лейкоз, у том числі хронічний лімфоцитарний лейкоз і гострий мієлоїдний лейкоз, неходжкінську лімфому, у тому числі DLBCL, В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому. Було продемонстровано, що LY75 інтерналізується при зв'язуванні з антитілом, як проілюстровано у прикладах 5 і 7 нижче, що, таким чином, забезпечує застосування антитіл за даним винаходом у будь-якому механізмі дії з навантаженням, наприклад, у підході з ADC, у радіоімунокон'югаті або у підході ADEPT.

В одному варіанті здійснення антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, фрагменти антитіл, Nanobody®, поліспецифічні і біспецифічні молекули і композиції тощо) за даним винаходом можна застосовувати для виявлення рівнів LY75 або рівнів клітин, які містять LY75 на поверхні своєї мембрани, для рівнів яких може бути потім встановлений зв'язок з визначеними симптомами захворювань. В альтернативному випадку антитіла, які зазвичай вводять у вигляді ADC, можна застосовувати для інгібування або блокування функції LY75, для якого, у свою чергу, може бути встановлений зв'язок з попередженням або зменшенням інтенсивності визначених симптомів захворювання, що, таким чином, має на увазі LY75 як медіатор захворювання. Цього можна досягти шляхом приведення зразка і контрольного зразка у контакт з антитілом до LY75 в умовах, які забезпечують утворення комплексу між антитілом і LY75. У зразку і контрольному зразку виявляють і порівнюють будь-які комплекси, які утворюються між антитілом і LY75.

В іншому варіанті здійснення антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули і композиції) за даним винаходом можна спочатку досліджувати по відношенню до активності зв'язування, пов'язаної з терапевтичним або діагностичним застосуванням in vitro. Наприклад, композиції за даним винаходом можна досліджувати із застосуванням аналізів за методом проточної цитометрії, описаних у прикладах нижче.

Антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули, імунокон'югати і композиції) за даним винаходом мають додаткову корисність у терапії і діагностиці захворювань, пов'язаних з LY75. Наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні або біспецифічні молекули і імунокон'югати можна застосовувати для того, щоб викликати in vivo або in vitro один або більше з наступних видів біологічної активності: інгібування росту і/або знищення клітин, які експресують LY75; опосередкування фагоцитозу

або ADCC клітин, які експресують LY75, у присутності ефекторних клітин людини, або блокування зв'язування ліганду LY75 з LY75.

У конкретному варіанті здійснення антитіла (наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули і композиції) застосовують in vivo для лікування, попередження або діагностики ряду захворювань, пов'язаних з LY75. Приклади захворювань, пов'язаних з LY75, включають, серед інших, представлені раковими тканинами людини рак шлунка, рак ободової і прямої кишки, рак передміхурової залози, рак молочної залози, рак яєчника, рак нирки, рак щитоподібної залози, рак стравоходу, рак голови і шиї, рак шкіри, рак печінки, рак підшлункової залози, рак сечового міхура, мієлому, лейкоз, у тому числі хронічний лімфоцитарний лейкоз, гострий мієлоїдний лейкоз, неходжкінську лімфому, у тому числі DLBCL, В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому, а також рак легені.

Підходящі шляхи введення композицій антитіл (наприклад, моноклональних антитіл, поліспецифічних і біспецифічних молекул і імунокон'югатів) за даним винаходом in vivo і in vitro добре відомі з рівня техніки і можуть бути вибрані середніми фахівцями у даній галузі. Наприклад, композиції антитіл можна вводити шляхом ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної або підшкірної). Підходящі дози застосовуваних молекул будуть залежати від віку і маси суб'єкта, а також концентрації і/або складу композиції антитіла.

Як було описано раніше, антитіла до LY75 за даним винаходом можна вводити разом з одним або більше іншими терапевтичними засобами, наприклад, цитотоксичним засобом, радіотоксичним засобом або імунодепресантом. Антитіло може бути пов'язано із засобом (у вигляді імунного комплексу) або може вводитися окремо від засобу. В останньому випадку (роздільне введення) антитіло можна вводити до, після введення засобу або одночасно з ним або можна вводити разом із застосуванням інших відомих видів терапії, наприклад, протиракової терапії, наприклад, променевої терапії. Такі терапевтичні засоби включають, серед інших, протипухлинні засоби, такі як доксорубіцин (адріаміцин), цисплатин, сульфат блеоміцину, кармустин, хлорамбуцил, а також циклофосфамід і гідроксисечовина, які самі по собі є ефективними тільки на рівнях, які є токсичними або субтоксичними для пацієнта. Цисплатин вводять внутрішньовенно у вигляді дози 100 мг/кг один раз в чотири тижні, а адріаміцин вводять внутрішньовенно у вигляді дози 60-75 мг/мл один раз на 21 день. Інші засоби, підходящі для сумісного введення з антитілами за даним винаходом, включають інші засоби, застосовувані для лікування форм раку, наприклад, раку шлунка, раку ободової і прямої кишки, раку передміхурової залози, раку молочної залози, раку яєчника або раку легені, такі як Avastin®, 5FU і гемцитабін. Сумісне введення антитіл до LY75 або їхніх антигензв'язувальних фрагментів за даним винаходом з хіміотерапевтичними засобами забезпечує два протиракових засоби, що діють за допомогою різних механізмів, які забезпечують досягнення цитотоксичного ефекту відносно пухлинних клітин людини. Таке спільне введення може вирішувати проблеми, зумовлені розвитком стійкості до лікарських засобів або зміною антигенності пухлинних клітин, що може зробити їх такими, що не реагують з антитілом.

Мішень-специфічні ефекторні клітини, наприклад, ефекторні клітини, пов'язані з композиціями (наприклад, моноклональними антитілами, поліспецифічними і біспецифічними молекулами) за даним винаходом, також можна застосовувати як терапевтичні засоби. Ефекторні клітини для здійснення цілеспрямованого впливу можуть являти собою лейкоцити людини, такі як макрофаги, нейтрофіли або моноцити. Інші клітини включають еозинофіли, природні клітини-кілери й інші клітини, що несуть рецептори IgG або IgA. При бажанні ефекторні клітини можна одержати від суб'єкта, який підлягає лікуванню. Мішень-специфічні ефекторні клітини можна вводити у вигляді суспензії клітин у фізіологічному прийнятному розчині. Кількість клітин, які вводять, може становити порядку 10^8-10^9, але буде варіювати залежно від терапевтичної мети. Як правило, кількість буде достатньою для досягнення цільової локалізації у клітині, наприклад, у пухлинній клітині, яка експресує LY75, і для здійснення знищення клітин за допомогою, наприклад, фагоцитозу. Шляхи введення також можуть варіювати.

Терапію за допомогою мішень-специфічних ефекторних клітин можна проводити у поєднанні з іншими методиками для усунення цільових клітин. Наприклад, протипухлинну терапію із застосуванням композицій (наприклад, моноклональних антитіл, поліспецифічних і біспецифічних молекул) за даним винаходом і/або ефекторних клітин, "озброєних" цими композиціями, можна застосовувати у поєднанні з хіміотерапією. Додатково, можна

застосовувати комбіновану імунотерапію для спрямування двох різних популяцій цитотоксичних ефекторних клітин на відторгнення пухлинних клітин. Наприклад, антитіла до LY75, пов'язані з антитілом до Fc-гамма-RI або антитілом до CD3, можна застосовувати у поєднанні зі зв'язувальними засобами, специфічними до рецепторів IgG або IgA.

Біспецифічні і поліспецифічні молекули за даним винаходом також можна застосовувати для модулювання FcγR або рівнів FcγR на ефекторних клітинах, як, наприклад, шляхом кепінгу і усунення рецепторів на клітинній поверхні. З цією метою також можна застосовувати суміші антитіл до Fc-рецепторів.

Композиції (наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули і імунокон'югати) за даним винаходом, які мають ділянки зв'язування з компонентами системи комплементу, такі як частини IgG1, -2 або -3 або IgM, які зв'язуються з компонентами системи комплементу, також можна застосовувати у присутності системи комплементу. В одному варіанті здійснення обробку ex vivo популяції клітин, що включає цільові клітини, зв'язувальним засобом за даним винаходом і відповідними ефекторними клітинами можна доповнювати додаванням системи комплементу або сироватки крові, що містить систему комплементу. Фагоцитоз цільових клітин, покритих зв'язувальним засобом за даним винаходом, можна покращити шляхом зв'язування з білками системи комплементу. В іншому варіанті здійснення цільові клітини, покриті композиціями (наприклад, моноклональними антитілами, поліспецифічними і біспецифічними молекулами) за даним винаходом, також можуть піддаватися лізису під дією системи комплементу. У ще одному варіанті здійснення композиції за даним винаходом не активують систему комплементу.

Композиції (наприклад, моноклональні антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули і імунокон'югати) за даним винаходом також можна вводити разом з системою комплементу. У визначених варіантах здійснення у даному розкритті представлені композиції, що містять антитіла, поліспецифічні або біспецифічні молекули і сироватку крові або систему комплементу. Ці композиції можуть бути переважними, якщо система комплементу знаходиться у безпосередній близькості до антитіл, поліспецифічних або біспецифічних молекул. В альтернативному випадку антитіла, поліспецифічні або біспецифічні молекули за даним винаходом і систему комплементу або сироватку крові можна вводити окремо.

Також у межах обсягу даного винаходу знаходяться набори, що містять композиції антитіл за даними винаходом (наприклад, моноклональні антитіла, біспецифічні або поліспецифічні молекули або імунокон'югати) та інструкції щодо застосування. Набір може додатково містити один або більше додаткових реагентів, таких як імунодепресивний реагент, цитотоксичний засіб або радіотоксичний засіб, або одне або більше додаткових антитіл за даним винаходом (наприклад, антитіло, що має доповнюючу активність, яке зв'язується з епітопом на антигені LY75, відмінному від такого для першого антитіла).

Відповідно, пацієнтам, які одержують лікування за допомогою композицій антитіл за даним винаходом, можна додатково вводити (до введення антитіла за даним винаходом, одночасно з ним або після нього) інший терапевтичний засіб, такий як цитотоксичний або радіотоксичний засіб, що посилює або збільшує терапевтичний ефект антитіл.

В інших варіантах здійснення суб'єкт може одержувати додаткове лікування засобом, що модулює, наприклад, посилює або інгібує, експресію або активність Fcγ або Fcγ-рецепторів, за допомогою, наприклад, обробки суб'єкта цитокіном. Переважні цитокіни для введення у ході лікування поліспецифічною молекулою включають гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), інтерферон-γ (IFN-γ) і фактор некрозу пухлини (TNF).

Композиції (наприклад, антитіла, поліспецифічні і біспецифічні молекули) за даним винаходом також можна застосовувати по відношенню до цільових клітин, що експресують FcγR або LY75, наприклад, для мічення таких клітин. Для такого застосування зв'язувальний засіб може бути зв'язаний з молекулою, яку можна виявити. Таким чином, у даному винаході представлені способи визначення локалізації ex vivo або in vitro клітин, що експресують Fc-рецептори, такі як FcγR, або LY75. Мітка, яку можна виявити, може являти собою, наприклад, радіоактивний ізотоп, флуоресцентну сполуку, фермент або кофактор ферменту.

У конкретному варіанті здійснення у даному винаході представлені способи виявлення наявності антигену LY75 у зразку або вимірювання кількості антигену LY75, що включають приведення зразку і контрольного зразку у контакт з моноклональним антитілом або його антигензв'язувальною частиною, які специфічно зв'язуються з LY75, в умовах, що забезпечують утворення комплексу між антитілом або його частиною і LY75. Потім виявляють утворення комплексу, де відмінність в утворенні комплексу при порівнянні між зразком і контрольним зразком свідчить про наявність антигену LY75 у зразку.

В інших варіантах здійснення у даному винаході представлені способи лікування порушення, опосередкованого LY75, у суб'єкта, наприклад, форм раку людини, що включають рак шлунка, рак нирки, рак щитоподібної залози, рак стравоходу, рак голови і шиї, рак шкіри, рак печінки, рак підшлункової залози, рак ободової і прямої кишки, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак молочної залози, у тому числі тричі негативний рак молочної залози, рак яєчника, рак легені, мієлому, лейкоз, у том числі хронічний лімфоцитарний лейкоз і гострий мієлоїдний лейкоз, неходжкінську лімфому, у тому числі DLBCL, В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому і ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому.

У всіх варіантах здійснення даного винаходу переважні форми раку включають неходжкінську лімфому, гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, а також тричі негативний рак молочної залози, рак сечового міхура і рак підшлункової залози.

Всі літературні джерела, що згадуються у даному описі, включають, без обмежень, всі документи, публікації, патенти, заявки на патенти, презентації, тексти, звіти, рукописи, брошури, книги, інтернет-публікації, журнальні статті, періодичні видання, інформаційні бюлетені про продукти тощо, які включені у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті. Обговорення літературних джерел у даному документі призначене лише для узагальнення тверджень, зроблених їхніми авторами, і не робиться визнання того факту, що будь-яке літературне джерело складає частину попереднього рівня техніки, а заявники зберігають за собою право заперечувати достовірність і значущість згаданих літературних джерел.

Хоча вищезазначений винахід було досить детально описано за допомогою ілюстрації і прикладу з метою ясності розуміння, середнім фахівцям у даній галузі у світлі ідей даного винаходу буде легко зрозуміло, що у його відношенні можна здійснювати визначені зміни і модифікації без відступу від суті або обсягу залежних пунктів формули винаходу.

Даний винахід додатково проілюстровано за допомогою наступних прикладів, які не слід тлумачити як такі, що додатково обмежують.

Приклад 1. Одержання людських моноклональних антитіл проти антигену LY75

Відповідно до стандартних методик, мишей (xenomouse IgG1) імунізували клітинами CHO, трансфікованими LY75 повної довжини.

Специфічність антитіл, вироблених проти LY75, досліджували за допомогою проточної цитометрії з використанням клітин HEK293, трансфікованих LY75, і, згодом, з використанням клітин HT29, що експресують LY75. Для того щоб досліджувати здатність антитіл зв'язуватись з білком LY75 на клітинній поверхні, антитіла інкубували з клітинами, що експресують LY75. Клітини промивали буфером FACS (DPBS, 2 % FBS), центрифугували і ресуспендували в 100 мкл розведеного первинного антитіла до LY75 (також розведеного в буфері FACS). Комплекс антитіло-лінія клітин інкубували на льоду протягом 60 хв. і потім двічі промивали буфером FACS, описаним вище. Осад клітина-антитіло ресуспендували в 100 мкл розведеного вторинного антитіла (також розведеного в буфері FACS) та інкубували на льоду протягом 60 хв. на льоду. Осад промивали, як описано вище, і ресуспендували в 200 мкл буфера FACS. Зразки завантажували у проточний цитометр BD FACScanto II, і при цьому дані аналізували за допомогою програмного забезпечення BD FACSdiva (результати не наведені).

Приклад 2. Установлення структурних характеристик моноклональних антитіл до LY75

Послідовності кДНК, що кодують варіабельні області важких і легких ланцюгів моноклонального антитіла LY75_A1, одержували за допомогою стандартних методик ПЦР і секвенували за допомогою стандартних методик секвенування ДНК.

Послідовності антитіла можна піддати мутагенезу для повернення до залишків зародкового типу у положенні одного або більше залишків.

Нуклеотидна й амінокислотна послідовності варіабельної області важкого ланцюга LY75_A1 наведені відповідно під SEQ ID NO: 3 і 1.

Нуклеотидна і амінокислотна послідовності варіабельної області легкого ланцюга LY75_A1 наведені відповідно під SEQ ID NO: 4 і 2.

Порівняння послідовності важкого ланцюга імуноглобуліну LY75_A1 з відомими послідовностями зародкового типу важкого ланцюга імуноглобуліну людини продемонструвало, що у важкому ланцюзі LY75_A1 використовується V_H-сегмент з V_H 3-15 людини зародкового типу і J_H-сегмент з J_H JH4 людини зародкового типу. Подальший аналіз послідовності V_H LY75_A1 за допомогою системи Kabat для визначення області CDR привів до виявлення областей CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга, наведених під SEQ ID NO: 5, 6 і 7 відповідно.

Вирівнювання послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 V_H LY75_A1 з послідовністю V_H 3-15 зародкового типу і J_H J_H4 зародкового типу показані на фігурі 1.

Порівняння послідовності легкого ланцюга імуноглобуліну LY75_A1 з відомими послідовностями зародкового типу легкого ланцюга імуноглобуліну людини продемонструвало, що в легкому ланцюзі LY75_A1 використовується V_K-сегмент з V_K O12 людини зародкового типу і J_K-сегмент з J_K JK4 людини зародкового типу. Подальший аналіз послідовності V_K LY75_A1 за допомогою системи Kabat для визначення області CDR привів до виявлення областей CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга, наведених під SEQ ID NO:8, 9 і 10 відповідно. Вирівнювання послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 V_K LY75_A1 з послідовностями V_K O12 зародкового типу і J_H JK4 зародкового типу показані на фігурі 2.

Приклад 3. Імуногістохімічне дослідження за допомогою моноклонального антитіла до LY75

За допомогою людського моноклонального антитіла, специфічного відносно LY75, здійснювали імуногістохімічне дослідження з використанням клітинних осадів FFPE HT-29 і A549, матриць з FFPE зразками неходжкінської лімфоми і раку підшлункової залози і свіжозаморожених пухлинних зразків лімфоми/лейкозу, зрізів раку яєчника, раку підшлункової залози і раку молочної залози і матриці з нормальними тканинами.

Матеріали і способи

Матеріали

Ксилоли (X5P-1gal) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

100 % етанол Histoprep (HC-800-1GAL) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

10x цитратний буфер для термічного демаскування епітопів (AP9003125) від Thermo Scientific, Массачусетс, США.

Інгібітор пероксидази Thermo Scientific* Pierce* (35000) від Thermo Scientific, Массачусетс, США.

Безсироватковий білковий блокувальний розчин (X0909) від Dako, Каліфорнія, США.

Вторинне антитіло: Fab кози до IgG людини, кон'югований з FITC, (109-097-003), від Jackson Immunoresearch, Пенсильванія, США.

IgG людини ChromPure, ціла молекула (09-000-003), від Jackson Immunoresearch, Пенсильванія, США.

Третинне антитіло: антитіло миші до FITC (ab10257) від Abeam, Массачусетс, США.

Очищений IgG людини для ізотопічного контролю (1-001 A) від R&D Systems, Міннесота, США.

Tween-20 (BP337-100) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Ацетон (BP2403-4) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Dual Link EnVision+ HRP-conjugated polymer, Mouse and Rabbit (K4063) від Dako, Каліфорнія, США. Набор DAB з 2 розчинами (882014) від Invitrogen, Нью-Йорк, США.

Гематоксилін Гарріса (23-245-677) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Заливальне середовище Faramount (S302580) від Dako, Каліфорнія, США.

Тканинні зрізи і матриці придбавали від US Biomax Inc., Меріленд, США або Origene, Меріленд, США.

Одержання мікропрепаратів FFPE. Видалення парафіну і регідратація

Здійснювали видалення парафіну з мікропрепаратів FFPE у ксилолі (2x3 хвилини), а потім здійснювали регідратацію з використанням 1:1 ксилол: 100 % етанол (1x3 хвилини), 100 % етанол (2x3 хвилини), 95 % етанол (1x3 хвилини), 70 % етанол (1x3 хвилини), 50 % етанол (1x3 хвилини) і водопровідна вода (1x3 хвилини).

Одержання мікропрепаратів FFPE. демаскування антигену (мікрохвильове випромінювання)

Антиген LY75 демаскували з використанням нагрівання мікрохвильовим випромінюванням з високою потужністю до кипіння, потім з низькою потужністю протягом 10 хвилин в 50 мл 1x цитратного буфера у посудині Копліна. Мікропрепарати потім залишали охолоджуватись до кімнатної температури протягом додаткових 15 хв., потім промивали водопровідною водою 3 хвилини. Кожний тканинний зріз/TMA обводили колом за допомогою олівця для створення гідрофобного бар'єру, і потім мікропрепарати 3 рази промивали в PBS, протягом 3 хвилин для кожного промивання.

Одержання мікропрепаратів FF

Мікропрепарати виймали зі сховища при -80 °C і забезпечували сушіння за кімнатної температури у витяжній шафі протягом 20-30 хвилин. Мікропрепарати фіксували протягом 10 хв. у льодяному ацетоні при -20 °C, потім забезпечували сушіння протягом 20 хв. у витяжній шафі за кімнатної температури. Мікропрепарати промивали і здійснювали регідратацію в PBS, причому з 3 промиваннями, кожна протягом 3 хв. Зрізи обводили по контуру за допомогою олівця для створення гідрофобного бар'єру.

Одержання комплексів антитіл

Первинне антитіло до LY75 розводили в безсироватковому білковому блокувальному розчині (SFPB) з одержанням розчину з концентрацією, що в 20 разів перевищує необхідну кінцеву концентрацію (20 мкг/мл для кінцевої концентрації 1 мкг/мл). Вторинне антитіло, антигензв'язувальний фрагмент (Fab) кози до імуноглобуліну G людини (IgG), одержували аналогічним чином в SFPB для створення розчину з однаковою концентрацією.

Однакові об'єми первинного і вторинного антитіла об'єднували у пробірці з етикеткою, обережно перемішували і інкубували протягом 3 хвилин за кімнатної температури, у результаті чого одержували концентрацію первинного антитіла, що в 10 раз перевищує необхідну кінцеву концентрацію (10 мкг/мл для кінцевої концентрації 1 мкг/мл). Дану суміш розводили 1:5 за допомогою SFPB, обережно перемішували і інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури, у результаті чого одержували концентрацію первинного антитіла, що в два рази перевищує необхідну кінцеву концентрацію (2 мкг/мл для кінцевої концентрації 1 мкг/мл).

Для одержання кінцевих забарвлювальних комплексів 1 % (10 мкг/мкл) розчин IgG людини одержували в SFPB, і при цьому однаковий об'єм додавали до суміші первинного/вторинного антитіла. Дану комбінацію обережно перемішували та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин з розведенням суміші первинного/вторинного антитіла до половини концентрації первинного антитіла, і у результаті одержували необхідну кінцеву концентрацію первинного антитіла (1 мкг/мл).

Імунозабарвлювання

При цьому ендогенну тканинну пероксидазну активність бокували шляхом інкубування тканин з інгібітором пероксидази протягом 5-10 хвилин за кімнатної температури у зволожувальній камері. Потім мікропрепарати промивали в PBS 3 рази протягом 3 хвилин для кожного промивання. Тканини інкубували в SFPB протягом 30 хвилин за кімнатної температури у зволожувальній камері. Кінцеві забарвлювальні комплекси наносили на кожний тканинний зріз і/або мікроматрицю, і при цьому мікропрепарати інкубували протягом 30 хв. за кімнатної температури у зволожувальній камері. Потім мікропрепарати промивали один раз в PBS і один раз в PBST (PBS+0,125% Tween-20) протягом 3 хвилин для кожного промивання. Третинне антитіло миші до FITC застосовували при концентрації 2 мкг/мл протягом 30 хв. за кімнатної температури у зволожувальній камері. Потім зрізи промивали один раз у PBS і один раз у PBST протягом 3 хв. для кожного промивання. Потім на тканини наносили полімер на основі кон'югованого з HRP антитіла кроля до Ig миші Dual Link EnVision+, і при цьому мікропрепарати інкубували протягом 30 хв. за кімнатної температури у зволожувальній камері. Потім мікропрепарати промивали один раз у PBS, один раз у PBST протягом 3 хв. для кожного промивання. Тканини інкубували у розчині DAB, одержаному відповідно до інструкцій виробника, за кімнатної температури протягом 10 хв. Потім мікропрепарати один раз промивали проточною водопровідною водою протягом 2 хвилин і один раз у PBS протягом 3 хвилин. Здійснювали контрастне забарвлювання мікропрепаратів за допомогою гематоксиліну протягом 30 секунд за кімнатної температури і промивали проточною водопровідною водою. Мікропрепарати сушили за кімнатної температури протягом 30 хвилин і потім мікропрепарати заключали під накривне скло з використанням заливального середовища Faramount.

Результати

LY75_A1 характеризувалося позитивним результатом при використанні зразків FFPE тричі негативного раку молочної залози, причому 77 % зрізів характеризувалися позитивним забарвленням і 55 % демонстрували інтенсивне (+++) забарвлення.

Забарвлювання відносно LY75 нормальних тканин FF, як правило, було у діапазоні від відсутнього до низького рівня. Епітелій проток молочної залози, слинна залоза і підшлункова залоза демонстрували від вираженого низького рівня до помірного рівня забарвлення, і при цьому спостерігався низький рівень позитивного забарвлення селезінки. Таким чином, антитіла, спрямовані на LY75, можна використовувати як терапевтичні засоби і діагностичні засоби при деяких з досліджуваних форм раку і, можливо, інших типах раку, що характеризуються експресією LY75.

Приклад 4. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1, відносно клітин HT-29

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували в культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора і інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

Результати наведені на фігурі 3a, на якій показана субпопуляція антитіл, які, як відомо, зв'язуються з LY75, що може індукувати цитоліз клітин HT-29. Це дозволяє припустити, що при тому, що ці антитіла можуть зв'язуватись з LY75, лише деякі з них виявляють ефективність будучи кон'югованими з DM1. Потім з субпопуляції вибирали антитіла для подальшого аналізу цитотоксичної активності.

Приклад 5. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно клітин раку ободової та прямої кишки

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3b показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин HT-29. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл, порівняно з іншими антитілами до LY75, кон'югованими з

токсином (вибраними з прикладу 1).

Приклад 6. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин лімфоми

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3c показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин RAJI. На фігурі 3d показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин Namalwa. На фігурі 3e показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин Karpas 299. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл, порівняно з іншими антитілами до LY75, кон'югованими з DM1 і DM4 (вибраними з прикладу 1).

Приклад 7. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку підшлункової залози

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин.

Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3f показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин BxPC3. На фігурі 3g показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин HupT4. На фігурі 3h показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин HPAFFII. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл, порівняно з іншими антитілами до LY75, кон'югованими з DM1 і DM4 (вибраними з прикладу 1).

Приклад 8. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин хронічного лімфоцитарного лейкозу

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3i показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин EHEB. На фігурі 3j показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин Мес-1. дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл, порівняно з іншими антитілами до LY75, кон'югованими з DM1 і DM4 (вибраними з прикладу 1).

Приклад 9. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин гострого моноцитарного лейкозу

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна

використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3k показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин AML-193. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл, порівняно з іншими антитілами до LY75, кон'югованими з DM1 і DM4 (вибраними з прикладу 1).

Приклад 10. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку молочної залози

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3l показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин HCC 70 (ER-негативних, PR-негативних і Her2-негативних). На фігурі 3m показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин HCC 1806 (ER-негативних, PR-негативних і Her2-негативних). На фігурі 3n показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин MDA-MB-468. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 11. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку сечового міхура

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3o показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин RT4. На фігурі 3p показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин 5637. На фігурі 3q показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин SW780. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 12. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку голови і шиї

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора і інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл

Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3r показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин SCC-9. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 13. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку стравоходу

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора і інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3s показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин OE 19. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 14. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин раку яєчника

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і

стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3t показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин OVCAR-3. На фігурі 3u показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин SK-OV-3. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 15. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно ліній клітин множинної мієломи

Матеріали

Cell Stripper (неферментативний засіб для дисоціації клітин) (MT-25-056CI) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Середовище RPMI 1640 (MT-10-041-CM) від Fisher Scientific, Пенсильванія, США.

Cell Titer Glo (G7572) від Promega, Вісконсин, США.

Спосіб

Здійснювали дисоціацію клітин за допомогою Cell Stripper і підрахунок їх кількості. 5e3 клітин/лунка центрифугували з одержанням осаду (у випадку клітин у суспензії можна використовувати більшу кількість залежно від часу подвоєння кількості клітин, наприклад, 10e3 клітин/лунка). Осад ресуспендували у культуральному середовищі з одержанням концентрації 1e5 клітин/мл.

50 мкл/лунка суспензії клітин додавали в лунки 96-лункового планшета з білими стінками і прозорим дном. Антитіла розводили і титрували в 8 точках (титрування з 3-кратними розведеннями), що відповідають концентраціям 0-20 нМ (які вдвічі перевищують досліджувані концентрації). Розведені антитіла або середовище (для необроблених зразків) (50 мкл/лунка) додавали у відповідні лунки. Надлишок середовища (200 мкл/лунка) додавали у зовнішні ряди і стовпці планшета для запобігання випаровуванню. Планшет інкубували протягом 72 год. при 37 °C.

Планшет виймали з інкубатора та інкубували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Тим часом піддавали розморожуванню розчин Cell Titer Glo. Планшет струшували і промивали 1 раз з використанням 100 мкл/лунка PBS (у випадку клітин у суспензії планшет спочатку центрифугували для осадження клітин). У кожну лунку додавали 100 мкл/лунка PBS і 100 мкл Cell Titer Glo і ретельно перемішували з одержанням суміші. Планшет інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 15 хвилин і відслідковували шляхом мікроскопування, для того щоб впевнитись у тому, що відбувся ефективний лізис клітин. Потім планшет зчитували на люмінометрі Glomax.

Результати

На фігурі 3v показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин MOLP-8. На фігурі 3w показана цитотоксична активність антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і DM4, відносно клітин RPMI8226. Дані результати демонструють підвищення цитотоксичної активності, пропорційне концентрації антитіл.

Приклад 16. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях Raji

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням мишам з SCID клітин Raji лімфоми Беркітта.

Імунодефіцитних мишей з SCID підшкірно інокулювали пухлинними клітинами Raji (лімфоми Беркітта людини). Пухлинам давали можливість розвитись і мишей розподіляли на п'ять груп обробки по 3-6 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника 129-132 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах: група 1 (наповнювач; фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)); група 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), група 3 (ізотипічний контроль-DM1; 10 мг/кг), група 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), група 5 (ізотипічний контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Другу дозу

вводили через один тиждень. Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали два рази на тиждень. Мишей піддавали евтаназії, коли їх пухлини досягали кінцевого показника об'єму пухлини 2000 мм^3 або через 60 днів, залежно від того, що відбувалося першим. Ефективність визначали виходячи з затримки росту пухлини (TGD), збільшення медіанного значення часу до кінцевого показника (TTE) і виходячи з аналізу за допомогою логарифмічного рангового критерію відмінностей за кривими виживаності Каплана-Мейера для мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. У перших п'яти контрольних мишей, оброблених наповнювачем, у яких був досягнутий кінцевий показник, відбирали зразки пухлин, які оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4a показано, що кожний з LY75_DM1 і LY75_DM4 продемонстрував значну протипухлинну активність і значно пролонговану виживаність у ксенотрансплантатній моделі з клітинами Raji лімфоми Беркітта на мишах з SCID порівняно з контролями; проте, дози 5 мг/кг LY75_DM4 були значно ефективнішими, ніж дози 10 мг/кг LY75_DM1, у результаті чого у 5 з 6 мишей спостерігалася повна, але тимчасова регресія пухлини. Всі обробки легко переносились і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні ракових пацієнтів з неходжкінською лімфомою людини.

Приклад 17. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях Namalwa

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням мишам з SCID клітин Namalwa лімфоми Беркітта.

Імунодефіцитних мишей з SCID підшкірно інокулювали пухлинними клітинами Namalwa (лімфоми Беркітта людини). Пухлинам давали можливість розвитись і мишей розподіляли на п'ять груп обробки по 6 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника 114 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах: група 1 (наповнювач; фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)); група 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), група 3 (ізотипічний контроль-DM1; 10 мг/кг), група 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), група 5 (ізотипічний контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали два рази на тиждень. Мишей піддавали евтаназії, коли їх пухлини досягали кінцевого показника об'єму пухлини 2000 мм^3 або через 60 днів, залежно від того, що відбувалося першим. Ефективність визначали виходячи з затримки росту пухлини (TGD), збільшення медіанного значення часу до кінцевого показника (TTE) і виходячи з аналізу за допомогою логарифмічного рангового критерію відмінностей за кривими виживаності Каплана-Мейера для мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. У перших п'яти контрольних мишей, оброблених наповнювачем, у яких був досягнутий кінцевий показник, відбирали зразки пухлин, які оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4b показано, що кожний з LY75_DM1 і LY75_DM4 продемонстрував значну протипухлинну активність і пролонговану виживаність у ксенотрансплантатній моделі з клітинами Namalwa лімфоми Беркітта на мишах з SCID порівняно з контролями; проте, доза 5 мг/кг LY75_DM4 була значно ефективнішою, ніж доза 10 мг/кг LY75_DM1, причому вона приводила до того, що спостерігалося короткочасне зменшення об'єму пухлини. Все обробки легко переносились і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні ракових пацієнтів з неходжкінською лімфомою людини.

Приклад 18. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях раку підшлункової залози

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням безтимусним голим мишам клітин HPAFII аденокарциноми підшлункової залози.

Імунодефіцитних безтимусних голих мишей підшкірно інокулювали пухлинними клітинами HPAFII (аденокарциноми підшлункової залози людини). Пухлинам давали можливість розвитись, і мишей розподіляли на п'ять груп обробки по 6 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника ~114 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах:

група 1 (наповнювач; фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)); група 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), група 3 (ізотипічний контроль-DM1; 10 мг/кг), група 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), група 5 (ізотипічний контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали три рази на тиждень. Мишей піддавали евтаназії, коли їх пухлини досягали кінцевого показника об'єму пухлини 2000 мм^3 або через 90 днів, залежно від того, що відбувалося першим. Ефективність визначали виходячи з ефекту обробки на об'єм пухлини і виходячи з аналізу за допомогою логарифмічного рангового критерію відмінностей за кривими виживаності Каплана-Мейера для мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. Відбирали зразки пухлин у контрольних мишей, оброблених наповнювачем, і оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4c показано, що LY75_DM1 і LY75_DM4 виявляли значну і аналогічну за силою протипухлинну активність, і при цьому спостерігалася пролонгована виживаність у ксенотрансплантатній моделі HPAFII на голих мишах порівняно з контролями. Всі обробки легко переносилися і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні пацієнтів-людей з раком підшлункової залози.

Приклад 19. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях раку сечового міхура

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням мишам з SCID клітин SW780 карциноми сечового міхура людини.

Імунодефіцитних безтимусних голих мишей підшкірно інокулювали пухлинними клітинами HPAFII (аденокарциноми підшлункової залози людини). Пухлинам давали можливість розвитись, і мишей розподіляли на п'ять груп обробки по 6 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника ~114 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах: група 1 (наповнювач; фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)); група 2 (LY75_DM1; 1 мг/кг), група 3 (LY75_DM1; 2,5 мг/кг), група 4 (LY75_DM1; 5 мг/кг), група 5 (LY75_DM4; 1 мг/кг)), група 6 (LY75_DM4; 2,5 мг/кг)), група 7 (LY75_DM4; 5 мг/кг)), група 8 (ізотипічний контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали три рази на тиждень. Мишей піддавали евтаназії, коли їх пухлини досягали кінцевого показника об'єму пухлини 2000 мм^3 або через 90 днів, залежно від того, що відбувалося першим. Ефективність визначали виходячи з ефекту обробки на об'єм пухлини і виходячи з аналізу за допомогою логарифмічного рангового критерію відмінностей за кривими виживаності Каплана-Мейера для мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. Відбирали зразки пухлин у контрольних мишей, оброблених наповнювачем, і оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4d показано, що LY75_DM1 і LY75_DM4 виявляли значну і аналогічну за силою протипухлинну активність, і при цьому спостерігалася пролонгована виживаність у ксенотрансплантатній моделі SW780 на голих мишах порівняно з контролями. Всі обробки легко переносилися і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні пацієнтів-людей з раком сечового міхура.

Приклад 20. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях раку молочної залози

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням безтимусним голим мишам клітин MDA-MB-468.

Імунодефіцитних безтимусних голих мишей підшкірно інокулювали пухлинними клітинами MDA-MB-468 (тричі негативної аденокарциноми молочної залози людини). Пухлинам давали можливість розвитись, і мишей розподіляли на сім груп обробки по 10 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника 167 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах: група 1 (наповнювач; 20 мМ сукцинат натрію, pH 5,0, 6 % трегалоза, 0,04 % полісорбат); група 2 (LY75_DM1; 5 мг/кг), група 3 (LY75_DM1; 10 мг/кг), група 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), група 5 (LY75_DM4; 2,5 мг/кг), група 6 (LY75_DM4; 1 мг/кг), група 7 (ізотипічний контроль-DM4; 5 мг/кг). Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали два рази на тиждень.

Мишей піддавали евтаназії через 82 дня після інокуляції пухлини. Ефективність визначали виходячи з протипухлинної активності (середнє значення розміру пухлини у групі обробки/середнє значення розміру пухлини у контрольній групі х 100) і збільшення середнього значення часу до кінцевого показника (TTE) у мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. Відбирали зразки п'яти найбільших пухлин у контрольних мишей, оброблених наповнювачем, у день 71 після інокуляції і оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4e показано, що кожний з LY75_DM1 і LY75_DM4 продемонстрував значну протипухлинну активність у ксенотрансплантатній моделі MDA-MB-468 на голих мишах порівняно з контролями. При використанні LY75_DM4 спостерігали залежну від дози активність, причому 2,5 і 5 мг/кг характеризувалися набагато сильнішим ефектом, ніж 1 мг/кг. При 5 мг/кг LY75_DM1 і LY75_DM4 характеризувалися аналогічною ефективністю. Тривалі регресії середнього значення об'єму пухлини спостерігали у випадку LY75_DM1 при 10 і 5 мг/кг і LY75_DM4 при 5 і 2,5 мг/кг. Всі обробки легко переносилися і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні пацієнтів-людей з тричі негативним раком молочної залози.

Приклад 21. Ефективність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, у ксенотрансплантатних моделях раку ободової і прямої кишки

Ефективність LY75_DM1 і LY75_DM4 досліджували у ксенотрансплантатній моделі з підшкірним введенням безтимусним голим мишам клітин COLO205 аденокарциноми ободової і прямої кишки.

Імунодефіцитних безтимусних голих мишей підшкірно інокулювали пухлинними клітинами COLO205 (аденокарциноми ободової і прямої кишки людини). Пухлинам давали можливість розвитись і мишей розподіляли на п'ять груп обробки по 6 мишей на групу. Коли середнє значення об'єму пухлини досягало середнього показника 117 мм^3 на групу, кожну групу оброблювали однією з наступних сполук, що вводили внутрішньовенно при вказаних дозах: група 1 (наповнювач; фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)); група 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), група 3 (ізотипічний контроль-DM1; 10 мг/кг), група 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), група 5 (ізотипічний контроль-DM4; 5 мг/кг). Другу дозу вводили через дванадцять днів після першої. Відслідковували показники маси тіла (BW), мишей часто оглядали для визначення стану здоров'я і небажаних побічних реакцій, і при цьому пухлини вимірювали два рази на тиждень. Мишей піддавали евтаназії, коли їх пухлини досягали кінцевого показника об'єму пухлини 1000 мм^3 або через 60 днів, залежно від того, що відбувалося першим. Ефективність визначали виходячи з затримки росту пухлини (TGD), збільшення медіанного значення часу до кінцевого показника (TTE) і виходячи з аналізу за допомогою логарифмічного рангового критерію відмінностей за кривими виживаності Каплана-Мейера для мишей, оброблених ADC, порівняно з мишами, обробленими PBS. У перших п'яти контрольних мишей, оброблених наповнювачем, у яких був досягнутий кінцевий показник, відбирали зразки пухлин, які оброблювали шляхом фіксації в формаліні і заливки парафіном.

Результати

На фігурі 4f показано, що LY75_DM1 і LY75_DM4 демонстрували аналогічно незначну протипухлинну активність і пролонговану виживаність у ксенотрансплантатній моделі COLO205 на голих мишах з аденокарциномою ободової і прямої кишки порівняно з контролями. Всі обробки легко переносилися і не спостерігалися клінічні ознаки токсичності. Ці дані дозволяють припустити, що ADC, спрямовані на LY75, наприклад, LY75_DM1 і LY75_DM4, можуть забезпечувати клінічну користь при лікуванні пацієнтів-людей з раком ободової і прямої кишки.

Приклад 22. Токсичність моноклональних антитіл до LY75, кон'югованих з DM1 і кон'югованих з DM4, відносно макак-крабоїдів

Шість самців мавпи рандомізували у дослідженні з 2 мавпами/група. Наповнювач (PBS), або LY75_DM4 (що розщеплюється), або LY75_DM1 (що не розщеплюється) вводили два рази (в день 1 і день 29) шляхом внутрішньовенної інфузії тривалістю 15 хвилин при 0 мг/кг/доза (PBS, наповнювач), 5 мг/кг/доза (LY75_DM4, що розщеплюється) або 10 мг/кг/доза (LY75_DM1, що не розщеплюється). Відбирали зразки крові для токсикокінетичних досліджень перед початком введення доз (день 1) і через 1, 2, 3, 7, 14, 21 і 28 днів після кожної дози. Відбирали зразки крови для аналізів відносно клінічної патології перед початком введення доз (день 1) і через 1, 3, 7, 14, 21 і 28 днів після кожної дози (момент часу 28 днів після 1-ої дози також використовували як момент часу перед введенням дози для 2-ої дози). Всіх експериментальних тварин піддавали евтаназії і проводили некропсію після останнього забору крові в день 57.

Виділяли плазму, відділену з кожного зразка крові, заморожували і транспортували в Oxford BioTherapeutics, Inc. для аналізу відносно концентрації ADC за допомогою ELISA.

Дані клінічної патології, пов'язаної з обробкою, включали слабковиражену регенеративну анемію і тимчасові зменшення кількості клітин лейкоцитарного профілю крові, найбільш значні для кількості нейтрофілів. Анемію спостерігали як у тварин, оброблених 5 мг/кг LY75_DM4, так і у однієї з двох тварин, оброблених 10 мг/кг LY75_DM1. Важку нейтропенію з максимальним зниженням кількості нейтрофілів через один тиждень після введення дози і швидке відновлення їх кількості спостерігали у всіх тварин; при цьому максимальне зниження абсолютної кількості нейтрофілів було меншим у тварин, оброблених LY75_DM4. Не спостерігали впливу на параметри коагуляції APTT і PT, пов'язаного з досліджуваним препаратом. Зміни хімічного складу сироватки включали тимчасове підвищення рівня AST, CK, LDH (у 1 з 2 тварин у кожній групі обробки) і глобуліну після введення 5 мг/кг LY75_DM4 і 10 мг/кг LY75_DM1. Крім того, спостерігали тимчасове підвищення рівня ферменту ALT, специфічного для печінки, тільки у тварин, оброблених LY75_DM4. Невелика тривалість і/або величина підвищень параметрів хімічного складу сироватки дозволяли припустити, що вони не стосувалися небажаних явищ. Були відсутніми дані, пов'язані з досліджуваним препаратом, одержані за допомогою аналізу сечі. У ході обстеження при некропсії після 4-тижневого періоду відновлення були відсутніми дані клінічної патології, пов'язані з обробкою, або зміни абсолютних і відносних значень маси органів. Дані гістопатології лише для щитоподібної залози (зміна морфології колоїдного вмісту у фолікулах) і нирки (розширені канальці у зовнішньому шарі коркової речовини) класифікували як мінімальної важкості; не пов'язані зі змінами інших досліджуваних параметрів, і як такі, що не стосуються небажаних явищ, і як такі, що мають мінімальну токсикологічну значущість. Висновок: обробка багатократними дозами при двох дозах - 5 мг/кг LY75_DM4 або 10 мг/кг LY75_DM1 добре переносилася макаками-крабоїдами. Всі дані для токсичності, пов'язаної з обробкою, одержані після 4-тижневого періоду відновлення, вказували на її оборотний характер.

Приклад 23. Установлення характеристик епітопа для LY75 A1 за допомогою аналізу конкурентного зв'язування з використанням сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS')

Спосіб

Клітини COLO205 (ATCC, № у каталозі CCL-222) відділяли від матрасів для тканинних культур за допомогою Cell Stripper (Cellgro, № у каталозі MT-25-056CI). Клітини промивали і ресуспендували в буфері (PBS + 2% FBS), нейтралізовували поживним середовищем і рахували. Клітини висівали при 50000 клітин на лунку в 96-лунковий планшет з лунками з V-подібним дном. Клітини промивали один раз буфером FACS (PBS (Fisher, № у каталозі SH30028-03) + 2% FBS). Додавали mAb до LY75 (вибране з прикладу 1) або LY75_A1 у лунки при вихідній концентрації 250 нМ, і здійснювали 3-кратні серійні розведення, і вносили у відповідні лунки протягом 45 хвилин на льоду. Досліджуваний вміст лунок, для якого було потрібно один або декілька етапів забарвлення, за необхідності витримували в буфері FACS для забезпечення одночасного завершення останнього забарвлення для всіх досліджуваних умов. Вміст двох лунок з буфером FACS залишали незабарвленим як контролі.

Після інкубації з блокувальним антитілом клітини два рази промивали буфером FACS. Клітини ресуспендували в буфері FACS, який містить mAb до LY75, кон'юговане з MCC-DM1 (1 нМ), та інкубували на льоду протягом 45 хвилин. Клітини промивали, як описано вище, і ресуспендували в буфері FACS з додаванням 1 мкг/мл антитіла миші до майтансину, і інкубували на льоду протягом 45 хвилин. Клітини промивали, як описано вище, і ресуспендували в буфері FACS, який містить 2 мкг/мл антитіла кози до каппа-ланцюга Ig миші, кон'югованого з RPE. Клітини інкубували на льоду протягом 45 хвилин, потім промивали, як описано вище. Клітини ресуспендували в буфері FACS при 200 мкл на лунку. Середнє значення інтенсивності флуоресценції для кожного зразка визначали за допомогою проточного цитометра Guava EasyCyte Plus HT (формати 96-лункового планшета), і при цьому первинні дані аналізували за допомогою Guava Cytosoft.

Результати

На фігурі 5a показано, що блокування з використанням mAb до LY75, кон'югованого з MCC-DM1, приводило до зниження зв'язування mAb до LY75. Аналіз зв'язування LY75_A1 з клітинами COLO205 продемонстрував, що LY75_A1 є нездатним блокувати зв'язування mAb до LY75, кон'югованого з MCC-DM1 (див. фігуру 5b). Таким чином, можна визначити, що mAb до LY75 і LY75_A1 не є конкуруючими антитілами, і при цьому LY75_A1 розпізнає відмінний і унікальний епітоп LY75 порівняно з іншими антитілами до LY75.

Приклад 24. Установлення характеристик епітопа для LY75 A1 за допомогою

мікроматричного аналізу з використанням пептидів

Спосіб

Мікроматричний аналіз з використанням пептидів здійснювали в LC Sciences, Хьюстон, Техас, при цьому, стисло, спосіб включав наступні етапи: синтезували безперервні 8-мерні пептиди білка LY75, що перекриваються за однією амінокислотою, які охоплюють залишки 216-1666 білка LY75 повної довжини, і іммобілізували на мікроматричному чипі. Чип містив три панелі, так що експеримент проводили в трьох повторностях. Мікроматрицю досліджували з використанням LY75_A1 для ідентифікації пептидів, з якими зв'язувалось антитіло. Аналіз зв'язування здійснювали за наступних умов: мікроматрицю, що містить безперервні пептиди в трьох повторностях, промивали за допомогою 1 мл буфера для зв'язування при 4 °C протягом 20 хв. Потім її інкубували з 1 мкг/мл LY75_A1 в буфері для зв'язування (pH 7,0) при 4 °C протягом 2 год. Матрицю ще раз промивали за допомогою 0,5 мл промивального буфера при 4 °C протягом 30 хв., потім інкубували з 25 нг/мл кон'югату антитіла до IgG людини з Alexa 647 в буфері для зв'язування (pH 7,0) при 4 °C протягом 1 год. Матрицю ще раз промивали за допомогою 0,5 мл промивального буфера при 4 °C протягом 30 хв.

Потім матрицю сканували при 635 нм і з PMT 500 і реєстрували інтенсивність сигналу. Пептид класифікували як виявлюваний, якщо він був присутній щонайменше в 2/3 припустимих дублюючих проб. Середню інтенсивність сигналу для повторностей представляли як кінцеву інтенсивність сигналу.

Результати

Як показано на фігурі 6, антитіло LY75_A1 характеризувалося специфічним зв'язуванням з рядом пептидів, розміщених на матриці. Максимальний рівень сигналу, що спостерігається для зв'язування з LY75_A1, становив 25000 (шкала 1 - 65535), при цьому середній рівень сигналу для всіх плям на матриці становив приблизно 885. Інтенсивність сигналу, що дорівнює 3000, встановлювали як точку відсікання фону, зумовленого неспецифічним зв'язуванням. Виходячи зі спостережуваного рівня інтенсивності сигналу зв'язування з антитілом ідентифікували послідовності, що утворюють епітоп для LY75_A1. Дані області показані на фігурах 6a - 6j і під SEQ ID NO: 22-31.

Приклад 25. Аналіз LY75 A1 з використанням пептидів за допомогою методики співосадження

Спосіб

1.1 Аналіз за допомогою методики співосадження

Рекомбінантний білок LY75 розщеплювали шляхом триптичного протеолізу білка, зв'язаного з гранулами (Promega, США). Одержані у результаті розщеплення пептиди одержували за допомогою колонки C18 для виділення (Thermo Fisher Scientific). Потім очищені пептиди інкубували з 200 мкл гранул білка A, зшитих з антитілом LY75A1, протягом ночі при 4 °C. Наступного дня відбирали незв'язані пептиди, і при цьому гранули два рази промивали 1 мл PBS. Пептиди, зв'язані з антитілом, елюювали з гранул шляхом їх нагрівання при 90 °C в 100 мкл PBS протягом 5 хвилин. Цей етап елюювання повторювали.

1.2 Мас-спектрометрія

Зразки аналізували за допомогою рідинної хроматографії-мас-спектрометрії з використанням системи Waters nanoACQUITY UPLC, обладнаної колонкою nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18, 75 мкм x 250 мм (186003545) і LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Пептиди елюювали з використанням градієнта зі збільшенням кількості ацетонітрилу від 3% до 35 % зі швидкістю 300 нл/хв. протягом 120 хв. Одержували мас-спектри в режимі повного сканування при роздільній здатності 60000 у діапазоні маси 400-2000 маса/заряд з використанням Orbitrap. У кожному циклі відбирали двадцять пептидів, що характеризуються найбільшою інтенсивністю, для CID сканувань MS/MS у лінійній іонній пастці з джерелом іонів наноспрею, яким обладнано пристрій.

1.3 Аналіз амінокислотної послідовності пептиду

Первинні дані, одержані з використанням LTQ Orbitrap Velos, оброблювали за допомогою програмного забезпечення Mascot (Matrix Science), в якому використовується алгоритм Mowse (Curr Biol. 1993 Jun 1; 3(6):327-3) для виділення послідовностей амінокислот виходячи з набору піків шляхом пошуку по базі даних послідовностей, що складається з Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) і SwissProt (http://www.uniprot.org) разом з послідовностями білків-контамінантів. Критерії ідентифікації пептидів включали розщеплення трипсином, до 2 відсутніх сайтів розщеплення і різні біологічні і хімічні модифікації (окиснений метіонін, модифікація цистеїну MMTS або йодацетамідом і фосфорилування серину, треоніну і тирозину). Пептиди, яким присвоювали ранг 1 при очікуваному значенні 0,05 % або менше, ступені збігу спектрів 28 або більше, завантажували в

базу даних OGAP.

1.4 Розпізнавання пептидів, асоційованих з LY75

У способі ідентифікації LY75 використовували пептидні послідовності, одержані експериментальним шляхом за допомогою мас-спектрометрії, як описано вище, білків людини, що зустрічаються в природі, для ідентифікації і упорядковування кодуючих екзонів в опублікованій геномній послідовності людини. Ці експериментально визначені послідовності порівнювали з базою даних OGAP®, яка була зкомпільована шляхом обробки та інтеграції множини пептидів, сигнатурних послідовностей пептидів, EST і загальнодоступних даних геномних послідовностей, як описано у міжнародній патентній заявці WO 2009/087462.

Результати

Результати аналізу пептидів за допомогою методики співосадження з використанням антитіла LY75_A1 показані у таблиці 1 нижче і на фігурі 7. Пептиди, які були ідентифіковані при обох елююваннях пептидів 1a і 1b в аналізі за допомогою методики співосадження і в мікроматричному аналізі, вважалися найбільш імовірними кандидатами для утворення епітопа.

Таблиця 1

Порівняння експериментів з мікроматричним аналізом пептидів і співосадженням пептидів

Пептид, ідентифікований за допомогою мікроматричного аналізу	Пептид, ідентифікований за допомогою аналізу з використанням методики співосадження
Область 1 (амінокислоти 609-618)	-
Область 2 (амінокислоти 651-662)	-
Область 3 (амінокислоти 761-780)	GWHFYDDR (765-772)
Область 4 (амінокислоти 883-901)	ISEWPIDDHFTYSR (877-890) FPVTFGEECLYMSAK (896-910)
Область 5 (амінокислоти 1029-1040)	ELTYSNFHPLLVSGR (1030-1044)
Область 6 (амінокислоти 1077-1093)	HFVSLCQK (1084-1091)
Область 7 (амінокислоти 1107-1118)	QTLQNASETVK (1099-1109)
Область 8 (амінокислоти 1368-1378)	-
Область 9 (амінокислоти 1518-1528)	-
Область 10 (амінокислоти 1535-1554)	-

У таблиці 1 показано, що ряд областей, що перекриваються, пептидів LY75 були ідентифіковані як у мікроматричному аналізі пептидів, так і при обох елююваннях 1a і 1b в аналізі пептидів за допомогою методики співосадження. Вважалося, що дані області, найімовірніше, містять епітоп, розпізнаваний антитілом LY75_A1, оскільки вони зв'язуються з LY75_A1 при дослідженні за допомогою обох використовуваних методик.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Опис	Послідовність
1	A1_VH, амінокислотна	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGTLVTVSS
2	A1_VL, амінокислотна	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDYLSWYQQRPGKAP NLLIYAASNLKTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQ QSYRSPWTFGQGTKVEIKR
3	A1_VH, нуклеотидна	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagccgggggggtcccttagactct cctgtgcagcctctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgccaggctcca gggaaggggctggagtgggttggccgtattaaaagcaaaactgatggtgggacaacaga ctacgctgcacccgtgcaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctg tatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtacgatttttgga gtggttagctttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca
4	A1_VL, нуклеотидна	gacgtccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgttggagacagagtcaccatc acttgccgggcaagtcagagcattagcgactatttaagttggtatcagcagagaccaggga aagcccctaacctcctgatctatgctgcatccaatttaaagactggggtcccatcaaggttca gtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcactctgcaacctgaagattttg caacgtactactgtcaacagagttacaggtccccgtggacgttcggccaagggaccaagg tggaaatcaaacga
5	A1_VH_CDR1, амінокислотна	NAWMS
6	A1_VH_CDR2, амінокислотна	RIKSKTDGGTTDYAAPVQG
7	A1_VH_CDR3, амінокислотна	FGVVSFDY
8	A1_VL_CDR1, амінокислотна	RASQSISDYLS
9	A1_VL_CDR2, амінокислотна	AASNLKT
10	A1_VL_CDR3, амінокислотна	QQSYRSPWT
11	VH3|3- 15/D4|411	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTTTTVT
12	JH4	YFDYWGQGTLVTVSS

13	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYS
14	JK1	WTFGQGTKVEIKR
15	LY75 (DEC- 205)	MRTGWATPRRPAGLLMLLFWFFDLAEPSGRAANDPFTIVHGNT GKCIKPVYGWIVADDCDETEDKLWKWVSQHRLFHLHSQKCLGL DITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEHHSLYGAARYRLALKDGH GTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNSYGRPCEFPF LIDGTWHHDCILDEDHSGPWCATTLNYEYDRKWGICLKPENGCE DNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSA AELTYLKEKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWSDHKPLNFLNWDP DRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCEAQLPYVCRKPLNNT VELTDVWTYSDTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCK AFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEEVWIGLKNINIPTLFQWS DGTEVTLTYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGELGQWKVQSCEEK LKYVCKRKGEKLNDASSDKMCPPDEGWKRHGETCYKIYEDEVP FGTNCNLTITSRFEQEYLNDLMKKYDKSLRKYFWTGLRDVDSCG EYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLEPASPGGCVAMSTGKSVGKW EVKDCRSFKALSICKKMSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPA SLSCYKVFHAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEF LHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRTPVSTIIMP NEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPFACD TKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRAGIHGPPLIIEGSEYWFVAD LHLNYEEAVLYCASNHSFLATITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWW IRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEECLYMSAKTWLIDLGKP TDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYSPDSAAKVQCSEQWIPFQNKCFL KIKPVSLTFSQASDTCHSYGGTLPSVLSQIEQDFITSLLPDMEATL WIGLRWTAYEKINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGRLRIPENFFEEE SRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKSRQ TLQNASETVKYLNNLYKIIPKTLTWHSAKRECLKSNMQLVSITDPY QQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWA ETNGQLEDCVVLDTDGFWKTVDCNDNQPGAICYYSGNETEKEV KPVDSVKCPSPVLNTPWIPFQNCCYNFIITKNRHMATTQDEVHTK CQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFNYMASWVMLGITYRNK SLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFKVI EEAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQKK VTWYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWVG LSSHDGSESSFEWSDGSTFDYIPWKGQTSPGNCVLLDPKGTWK

		HEKCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWIQY KGHCYKSDQALHSFSEAKKLCSKHDHSATIVSIKDEDENKFVSRL MRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVTFVKWENKSK SGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGRVVCKVPLGPDYTAIAIIV ATLSILVLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPS FHD
16	A1_VH_FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS
17	A1_VH_FR2	WVRQAPGKGLEWVG
18	A1_VH_FR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTI
19	A1_VH_FR4	WGQGTLVTVSS
20	A1_VL_FR1	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	A1_VL_FR2	WYQQRPGKAPNLLIY
22	A1_VL_FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC
23	A1_VL_FR4	FGQGTKVEIKR
24	LY75 609-618	WEVKDCRSFK
25	LY75 651-662	PASLSCYKVFHA
26	LY75 761-780	PWRRGWHFYDDREFIYLRPF
27	LY75 883-901	DDHFTYSRYPWHRFPVTFG
28	LY75 1029-1040	RELTYSNFHPLL
29	LY75 1077-1093	FTSCSERHFVSLCQKYS
30	LY75 1107-1118	TVKYLNNLYKII
31	LY75 1368-1378	EAVYFHQHSIL
32	LY75 1518-1528	KKLSRLTYSSC
33	LY75 1535-1554	NGSRWIQYKGHCYKSDQALH
34	LY75 877-901	ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG
35	LY75 1099-1118	QTLQNASETVKYLNNLYKII
36	LY75 883-892	DDHFTYSRYP
37	LY75 1077-1091	FTSCSERHFVSLCQK

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло або його антигензв'язувальна частина, які зв'язуються з LY75, причому вказане антитіло або частина містить:
а) варіабельну область важкого ланцюга, що містить:
i) першу vhCDR, що містить SEQ ID NO: 5;
ii) другу vhCDR, що містить SEQ ID NO: 6; і
iii) третю vhCDR, що містить SEQ ID NO: 7; і
b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить:
i) першу vlCDR, що містить SEQ ID NO: 8;
ii) другу vlCDR, що містить SEQ ID NO: 9; і
iii) третю vlCDR, що містить SEQ ID NO: 10;
де виділене антитіло або його антигензв'язувальна частина містить ковалентно приєднаний цитотоксичний лікарський засіб.

2. Виділене антитіло або його антигензв'язувальна частина за п. 1, що містить варіабельну область важкого ланцюга, яка характеризується щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 % ідентичністю амінокислотної послідовності з SEQ ID NO: 1, і варіабельну область легкого ланцюга, яка характеризується щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % або 100 % ідентичністю амінокислотної послідовності з SEQ ID NO: 2.

3. Виділене антитіло або його антигензв'язувальна частина за п. 1 або п. 2, де вказаний цитотоксичний лікарський засіб вибраний з групи, що включає майтанзиноїд, доластатин, геміастерлін, ауристатин, трихотецен, каліхеаміцин, CC1065 та їхні похідні.

4. Виділене антитіло або його антигензв'язувальна частина за п. 3, де вказаний цитотоксичний лікарський засіб являє собою майтанзиноїд, вибраний з групи, що включає DM4 і DM1.

5. Фармацевтична композиція, що містить антитіло або його антигензв'язувальну частину за будь-яким з попередніх пунктів разом з одним або більше фармацевтично прийнятними розріджувачами, наповнювачами або носіями.

6. Спосіб лікування раку, опосередкованого експресією LY75, що включає введення пацієнту, який потребує цього, антитіла або його антигензв'язувальної частини за будь-яким з пп. 1-4.

7. Спосіб за п. 6, де антитіло або його антигензв'язувальна частина інтерналізується клітиною, яка експресує LY75.

8. Спосіб за п. 6 або п. 7, де вказаний рак, вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак яєчника, рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак стравоходу, рак шкіри, рак щитоподібної залози, рак легені, рак нирки, рак печінки, рак голови і шиї, рак сечового міхура, рак шлунка, лейкоз, переважно гострий мієлоїдний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз, мієлому, переважно множинну мієлому, і лімфому, переважно дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому (DLBCL), В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому та ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому.

9. Спосіб за п. 8, де рак вибраний з групи, що включає рак сечового міхура, рак підшлункової залози, тричі негативний рак молочної залози і DLBCL.

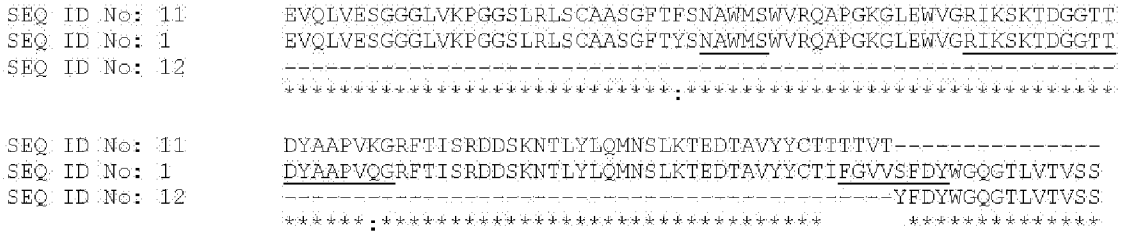
10. Застосування антитіла або його антигензв'язувальної частини за будь-яким з пп. 1-4 у виробництві лікарського препарату для лікування раку, опосередкованого експресією LY75.

11. Застосування за п. 10, де антитіло або його антигензв'язувальна частина інтерналізується клітиною, яка експресує LY75.

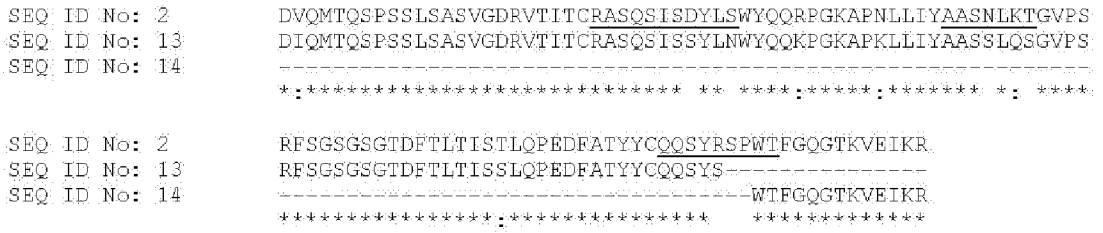
12. Застосування за п. 10 або п. 11, де вказаний рак вибраний з групи, що включає рак підшлункової залози, рак яєчника, рак молочної залози, рак ободової і прямої кишки, рак стравоходу, рак шкіри, рак щитоподібної залози, рак легені, рак нирки, рак печінки, рак голови і шиї, рак сечового міхура, рак шлунка, лейкоз, переважно гострий мієлоїдний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз, мієлому, переважно множинну мієлому, і лімфому, переважно дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому (DLBCL), В-клітинну лімфому, фолікулярну лімфому, мантійноклітинну лімфому, лімфому з лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT), В-клітинну лімфому, збагачену Т-клітинами/гістіоцитами, лімфому Беркітта, лімфоплазмоцитарну лімфому, дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому, лімфому з клітин маргінальної зони, Т-клітинну лімфому, периферійну Т-клітинну лімфому, анапластичну великоклітинну лімфому та ангіоімунобластну Т-клітинну лімфому.

13. Застосування за п. 12, де рак вибраний з групи, що включає рак сечового міхура, рак підшлункової залози, тричі негативний рак молочної залози і DLBCL.

5

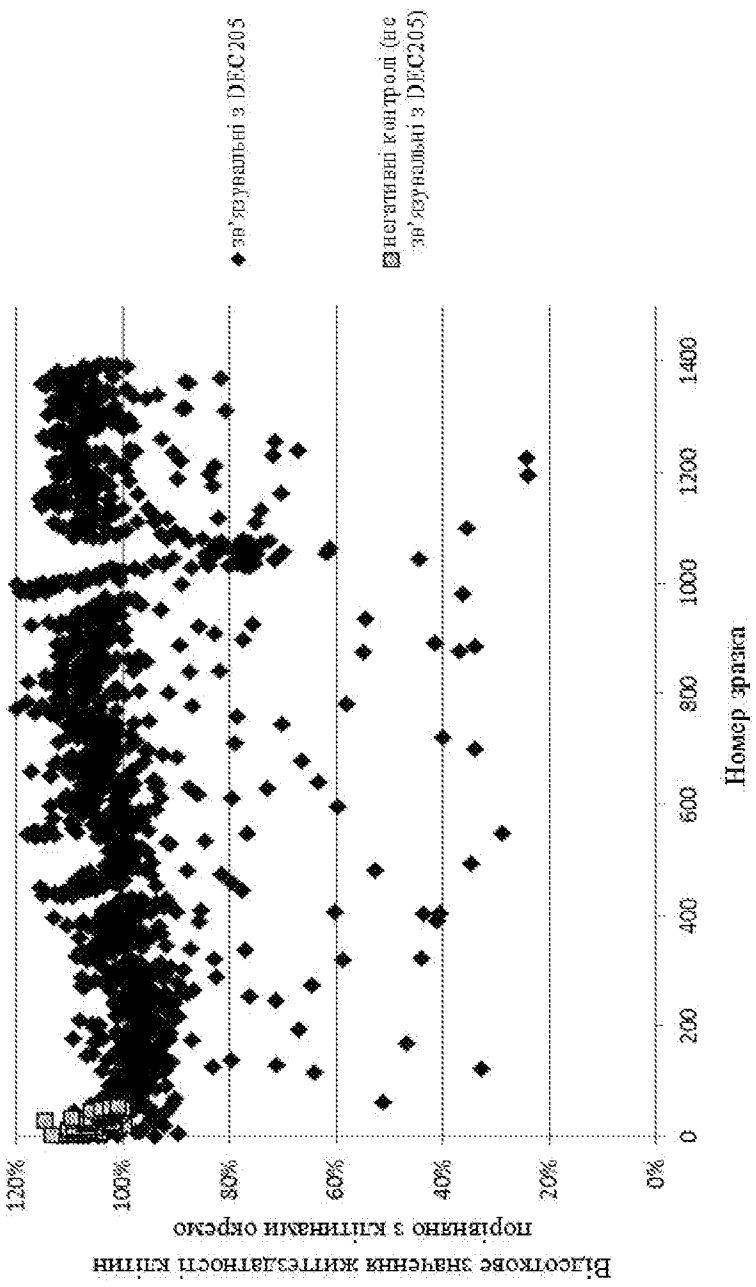


Фігура 1

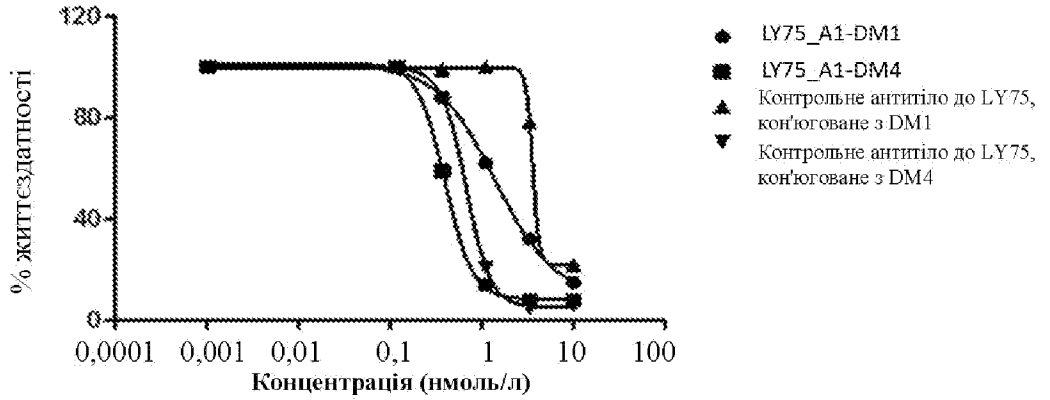


Фігура 2

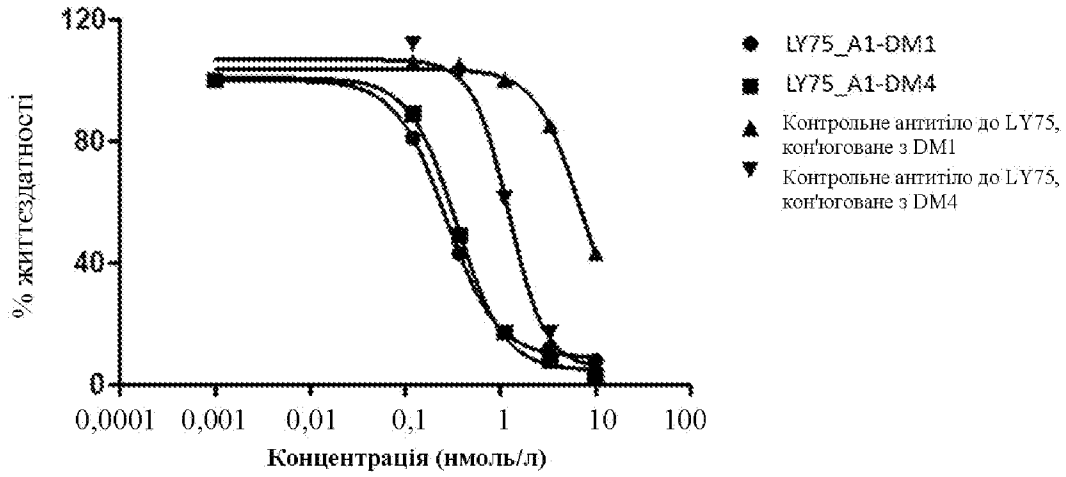
5


зв'язувальні з DEC205
негативні контролі (не зв'язувальні з DEC205)
Відсоткове значення життєздатності клітин порівняно з клітинами окремо
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Номер зразка

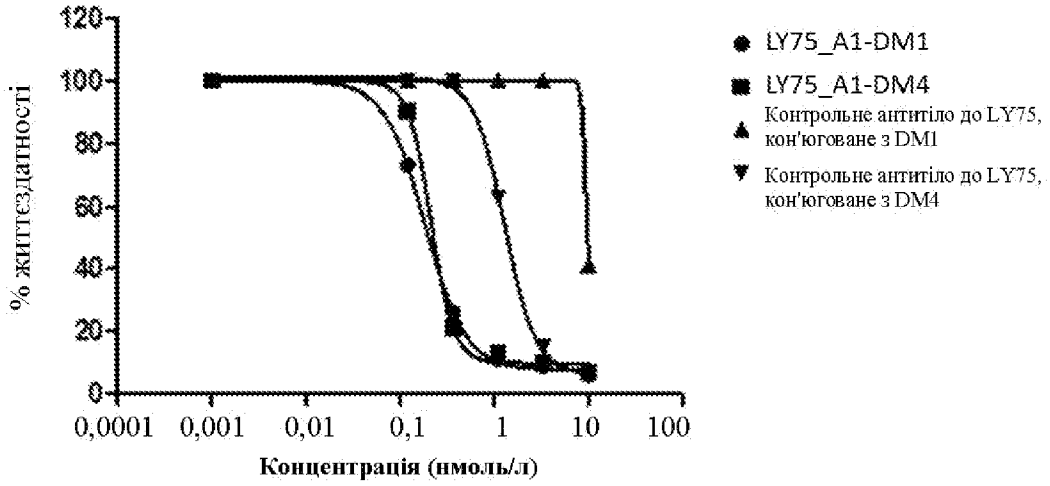
Фігура 3а



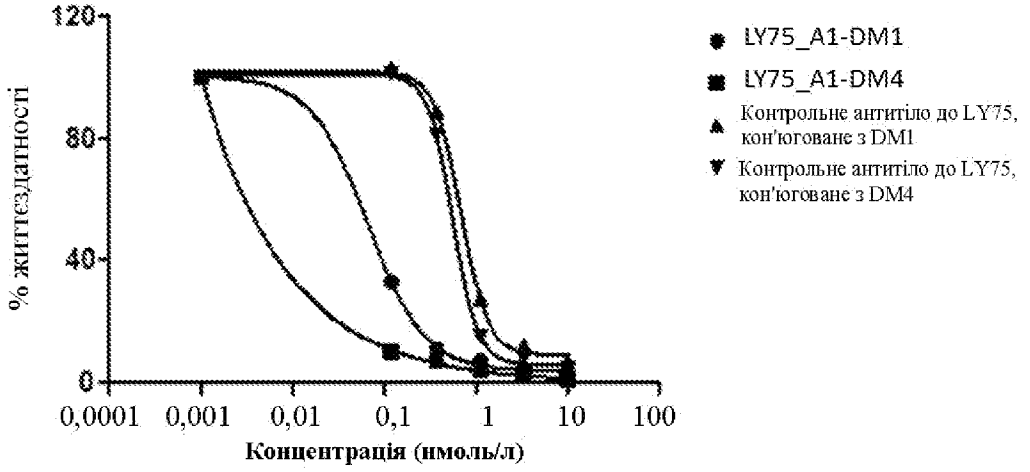
Фігура 3b



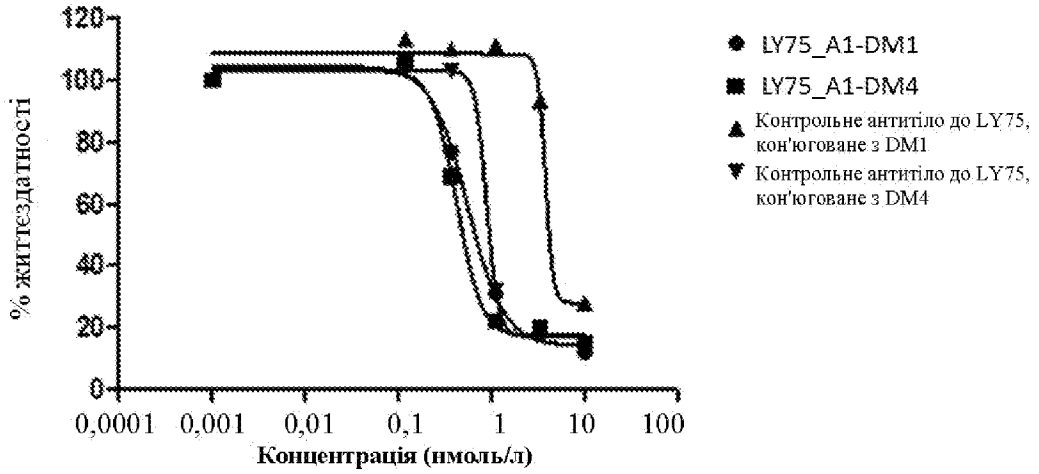
Фігура 3c



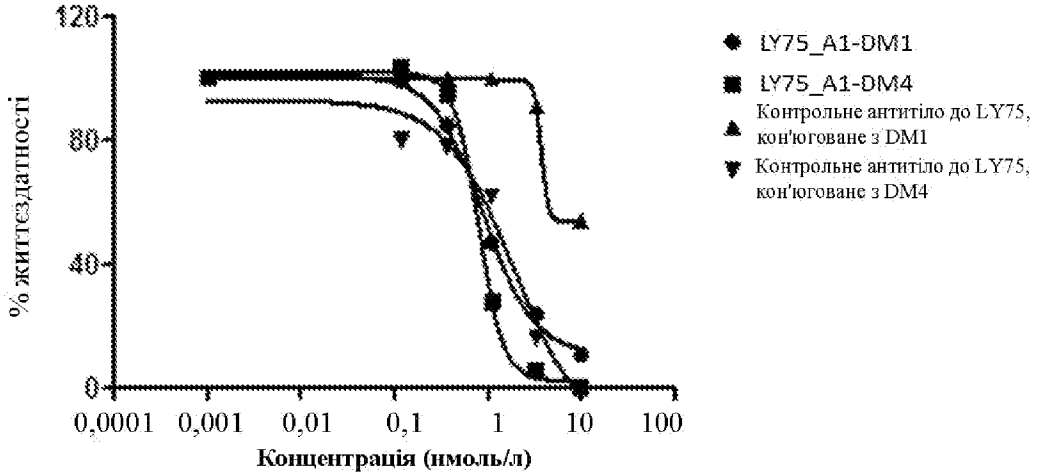
Фігура 3d



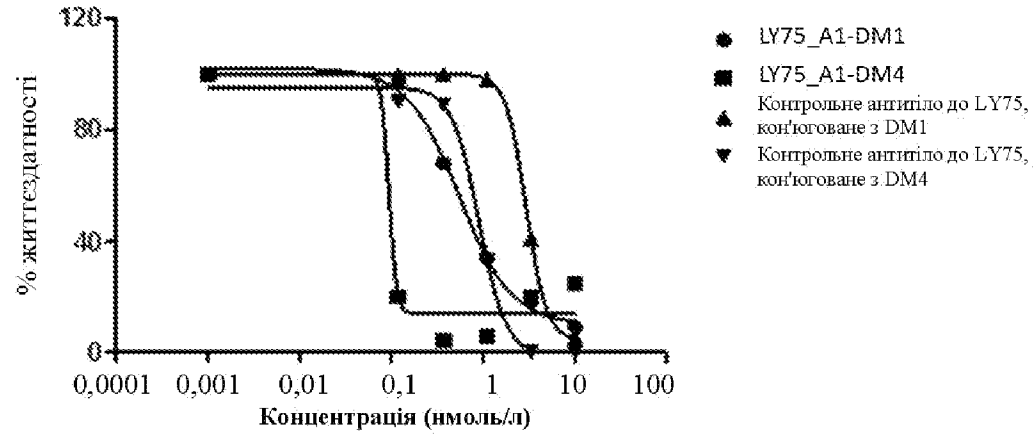
Фігура 3e



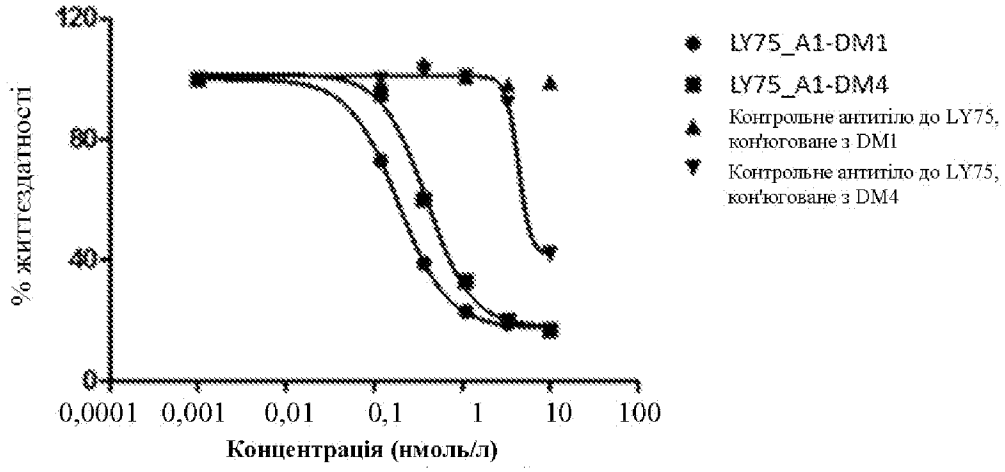
Фігура 3f



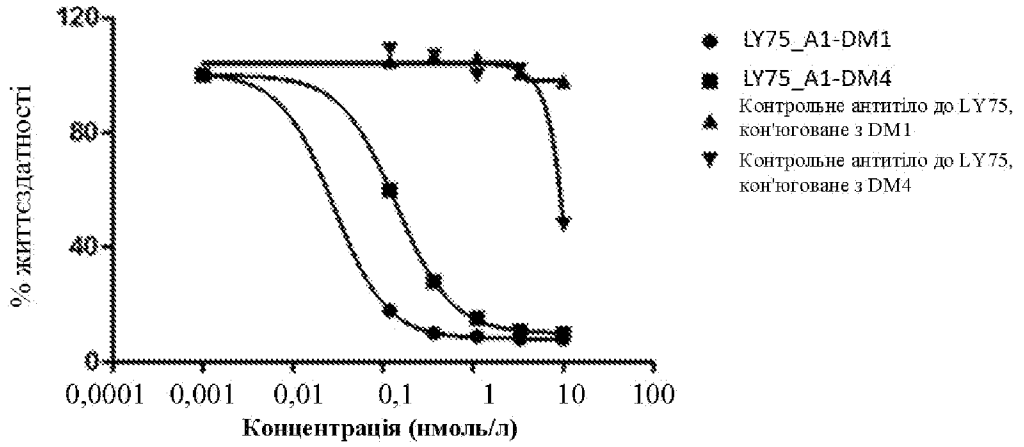
Фігура 3g



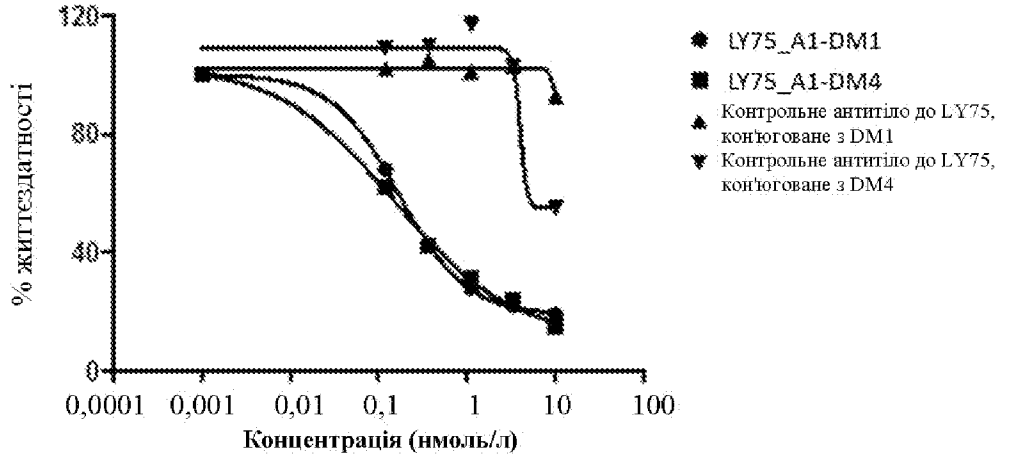
Фігура 3h



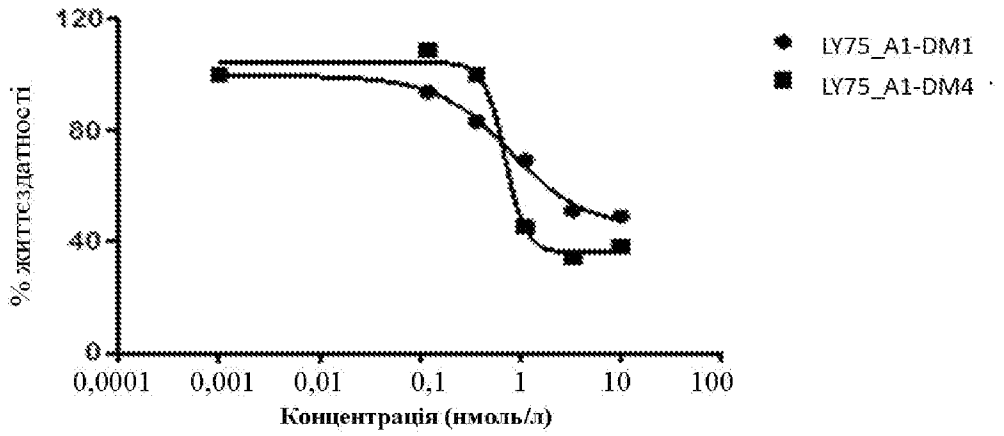
Фігура 3i



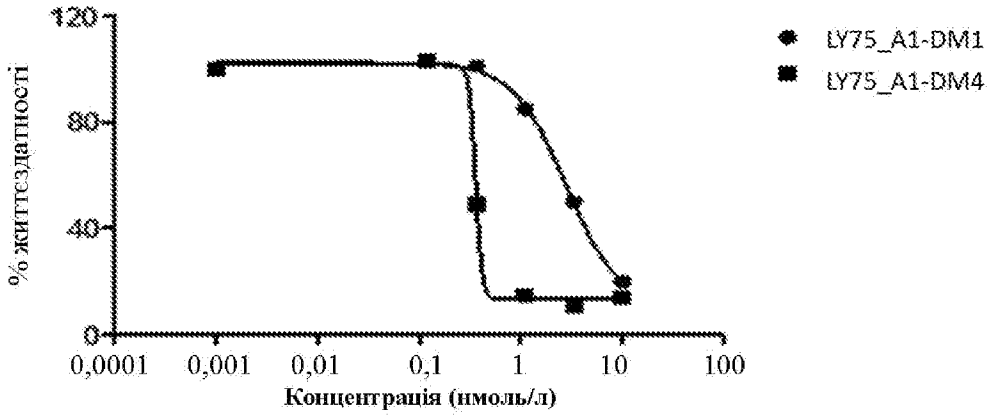
Фігура 3j



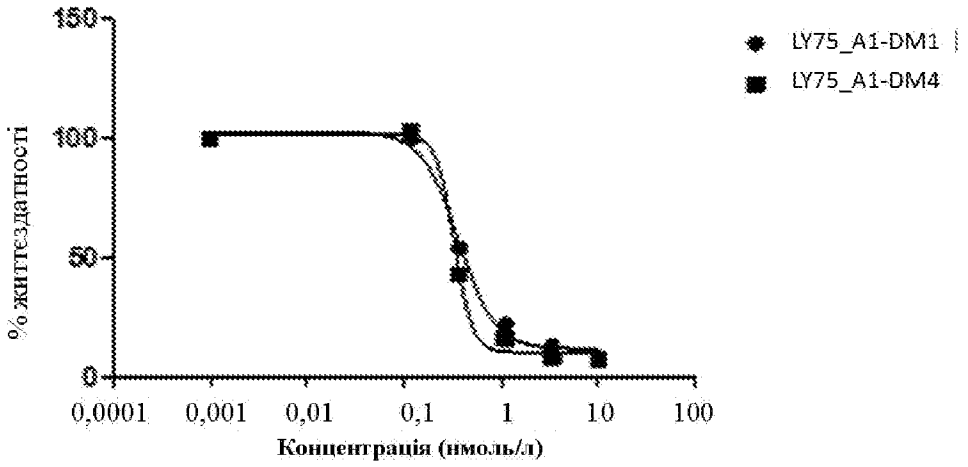
Фігура 3k



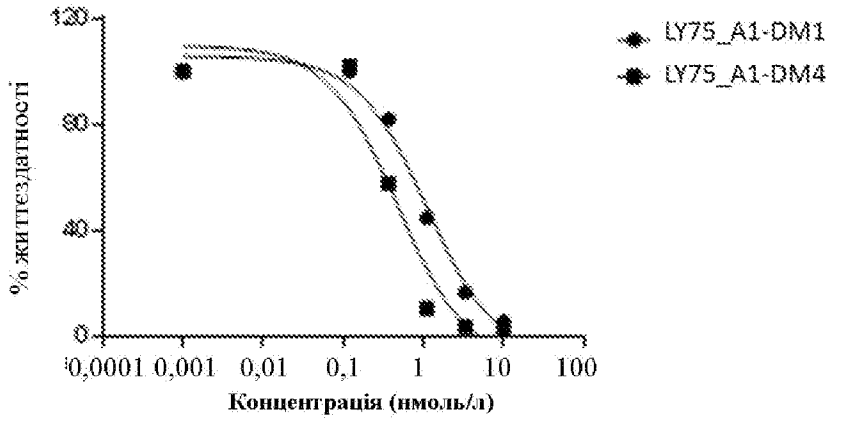
Фігура 3l



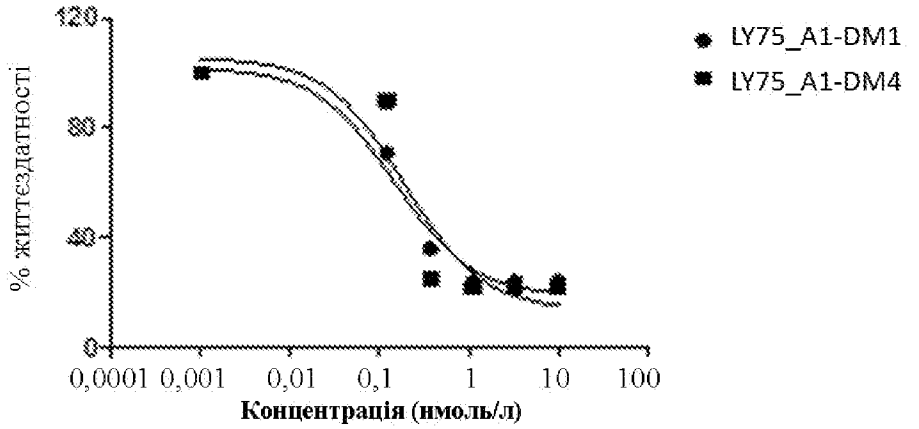
Фігура 3m



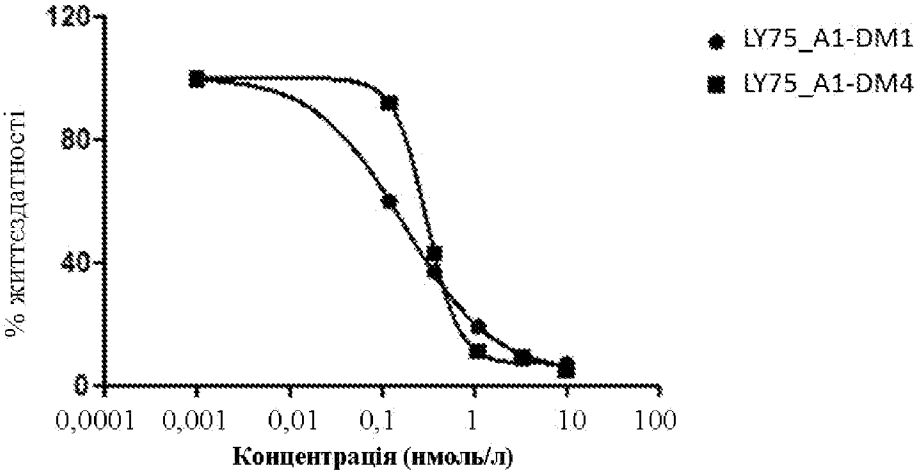
Фігура 3п



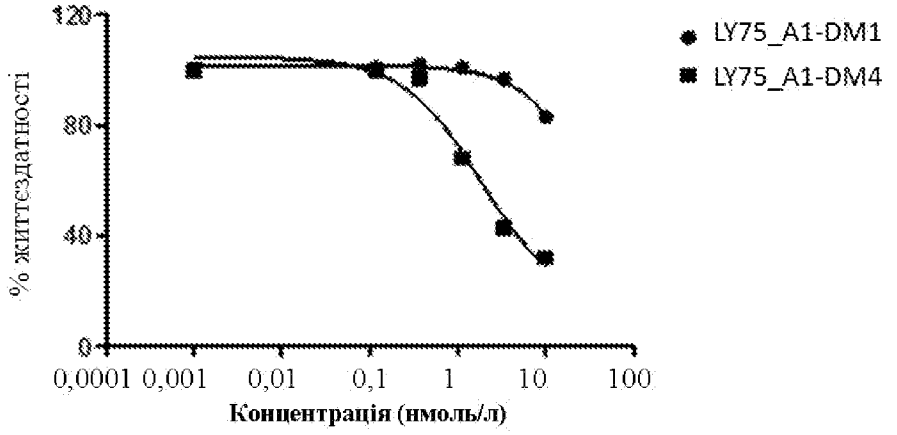
Фігура 3о



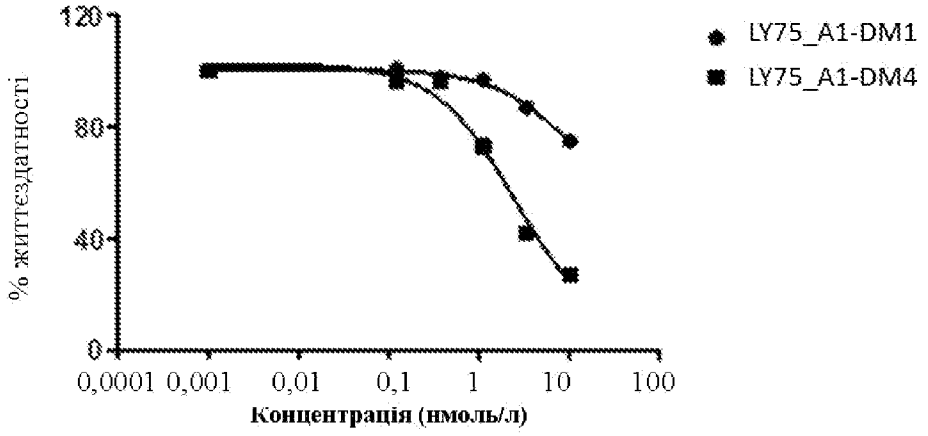
Фігура 3p



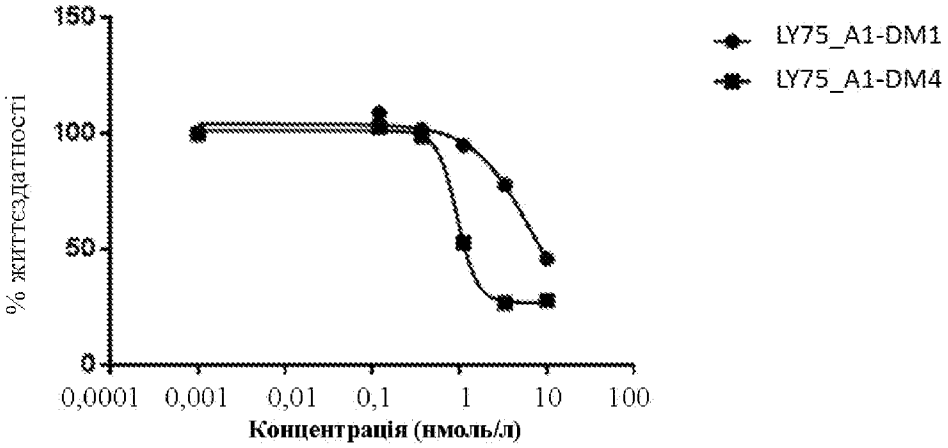
Фігура 3q



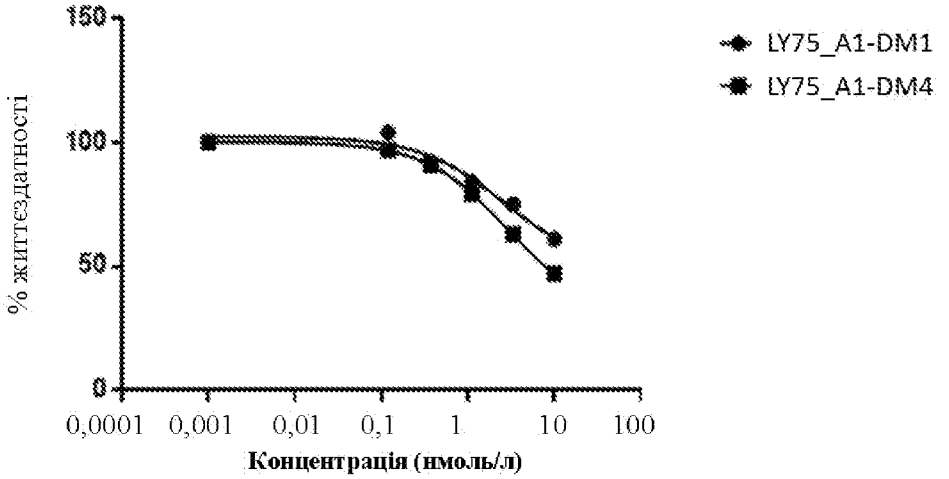
Фігура 3r



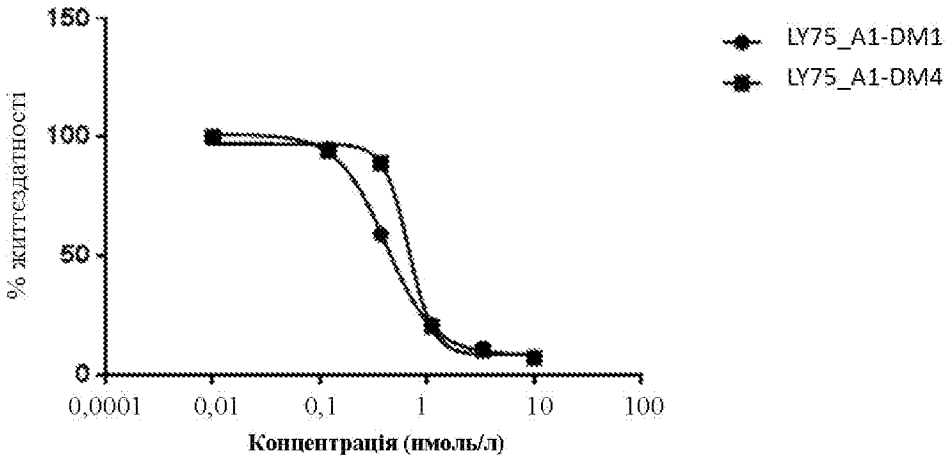
Фігура 3s



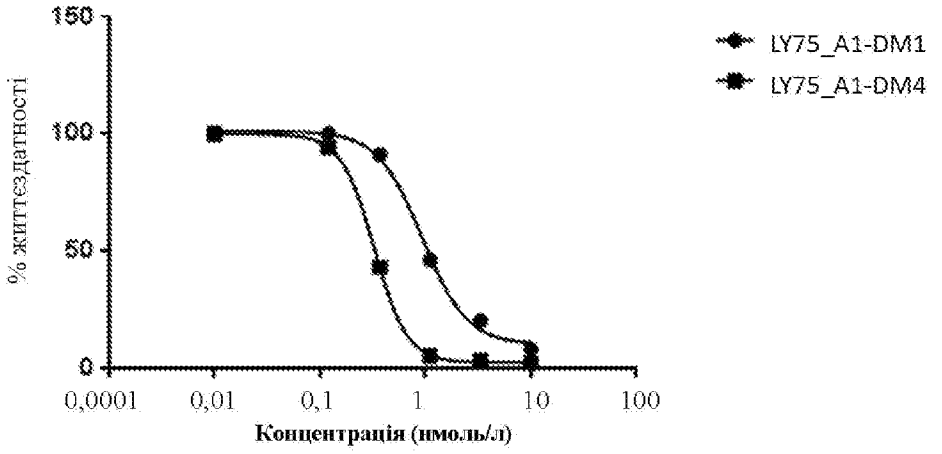
Фігура 3t



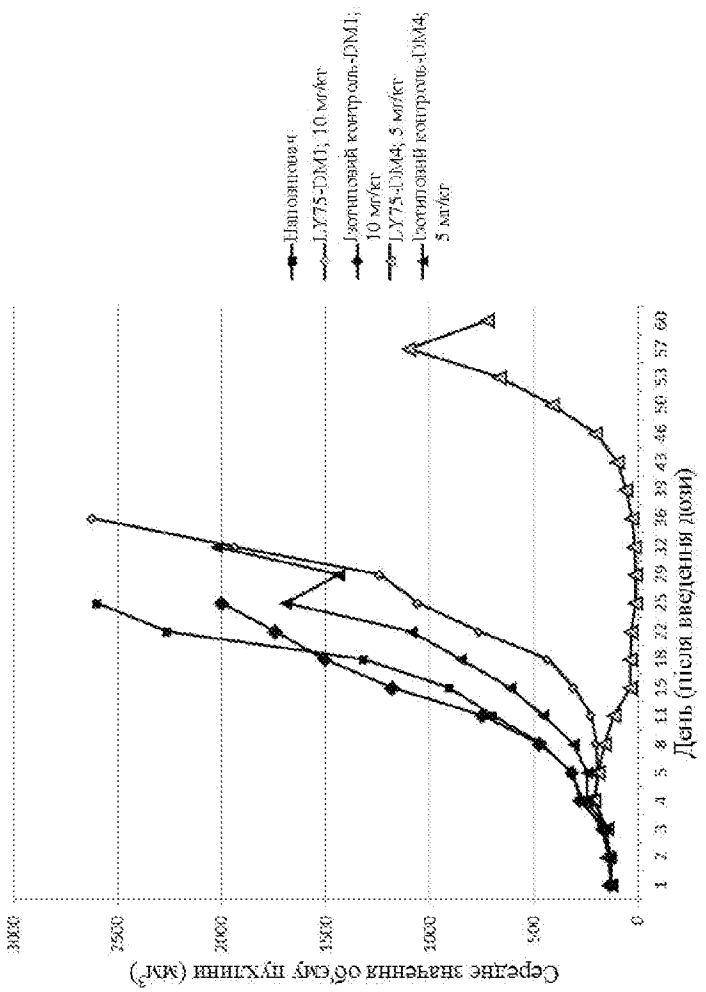
Фігура 3u



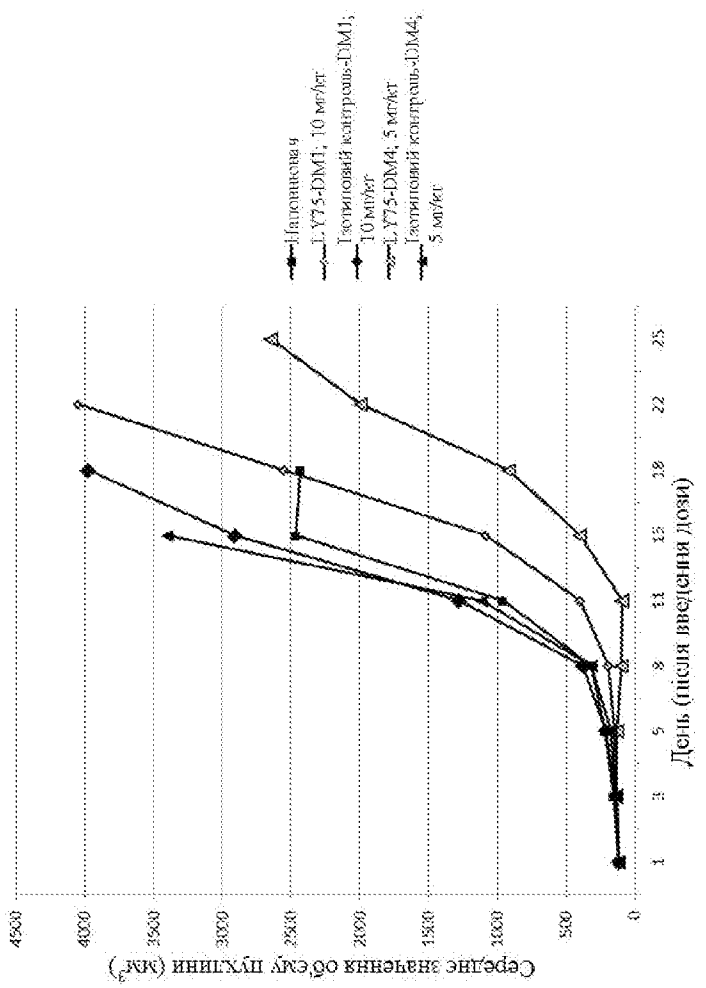
Фігура 3v



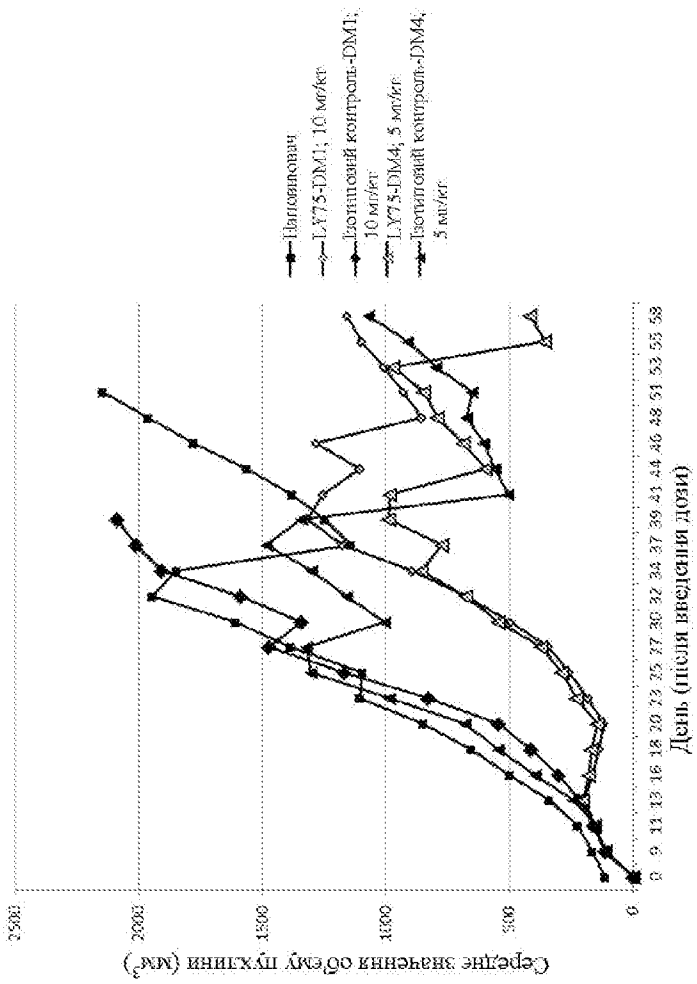
Фігура 3w


Середнє значення об'єму пухлини (мм³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1 7 3 4 5 8 11 15 18 22 25 29 32 36 39 43 46 50 53 57 60
День (після введення дози)
Національний
LY75-DM1; 10 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM1; 10 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM4; 5 мг/кг

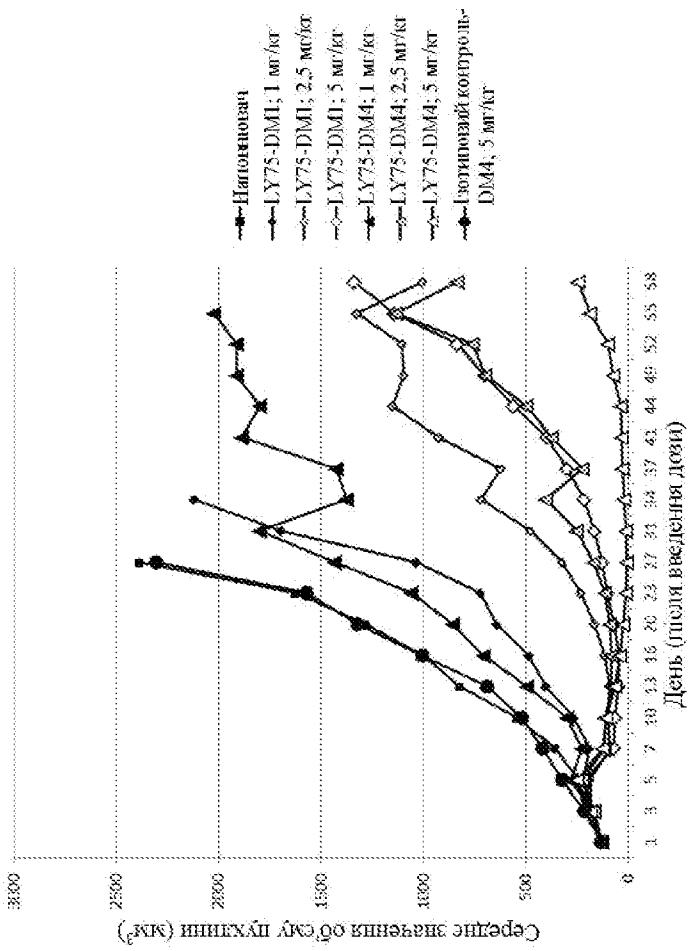
Фігура 4а


Середнє значення об'єму пухлини (мм³)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
3
5
8
11
15
18
22
25
День (після введення дози)
Наповнювач
LY75-DM1; 10 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM1; 10 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM4; 5 мг/кг

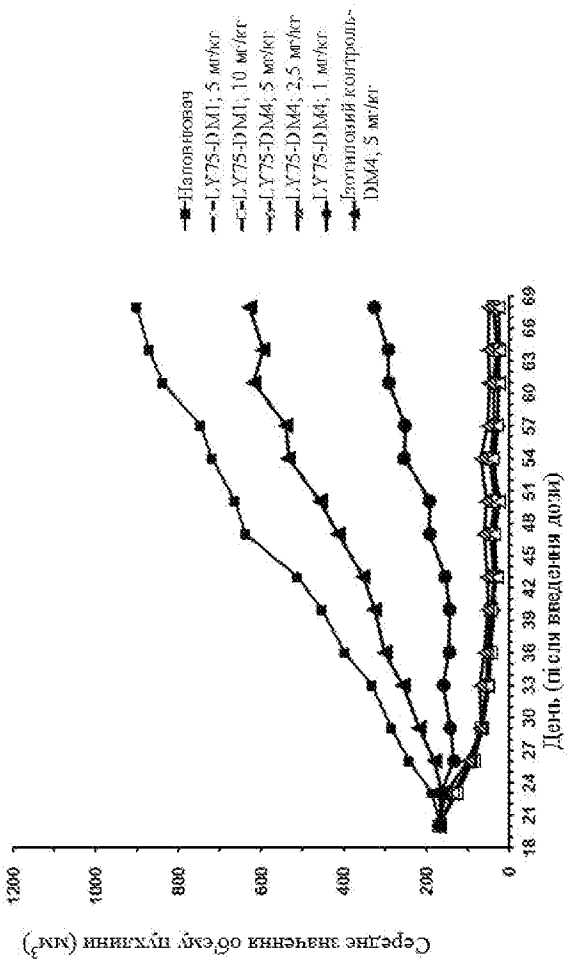
Фігура 4b


Середнє значення об'єму пухлини (мм³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 9 11 13 16 18 20 23 25 27 30 32 34 37 39 41 44 46 48 51 53 55 58
День (після введення дози)
Плацебо
LY75-DM1; 10 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM1; 10 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM4; 5 мг/кг

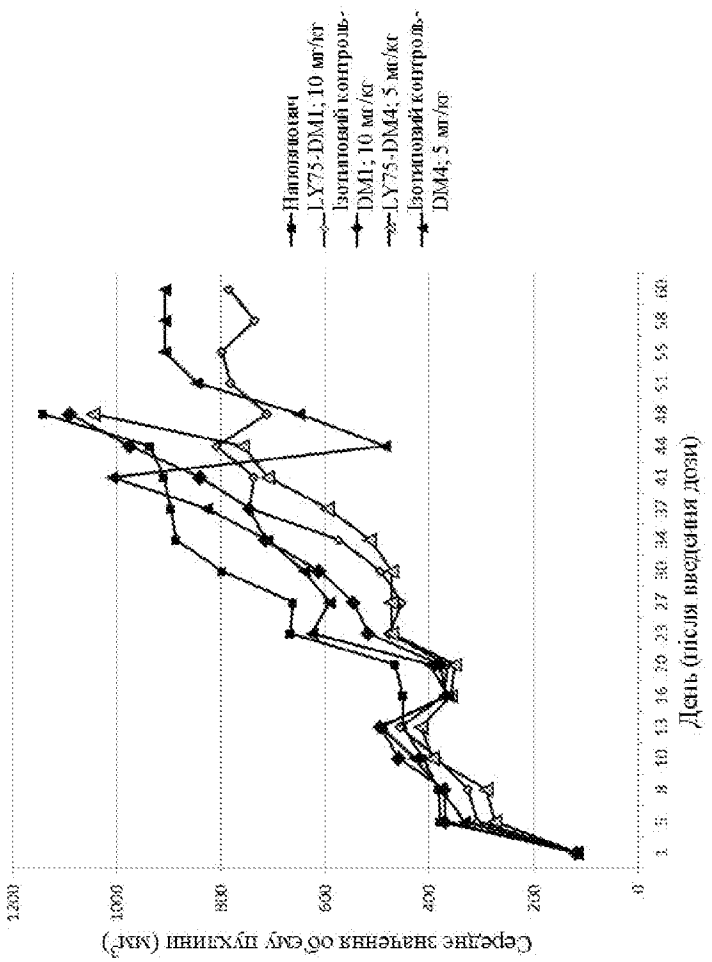
Фігура 4с


Среднее значение объему опухоли (мм³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1 3 5 7 10 13 16 20 23 27 31 34 37 42 44 48 52 55 58
День (после введения дозы)
Наполеонан
LY75-DM1; 1 мг/кг
LY75-DM1; 2,5 мг/кг
LY75-DM1; 5 мг/кг
LY75-DM4; 1 мг/кг
LY75-DM4; 2,5 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
Изотипический контроль-DM4; 5 мг/кг

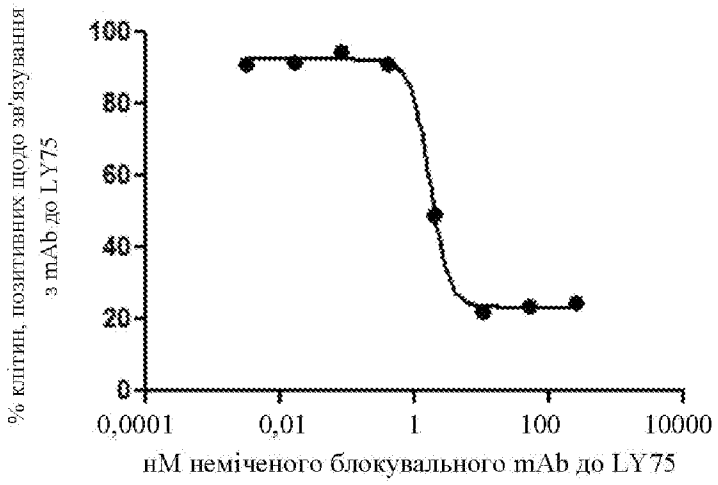
Фігура 4d


Середнє значення об'єму пухлини (мм³)
1200
1000
800
600
400
200
0
18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 63 66 69
День (після введення дози)
Плацебо
LY75-DM1; 5 мг/кг
LY75-DM1; 10 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
LY75-DM4; 2,5 мг/кг
LY75-DM4; 1 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM4; 5 мг/кг

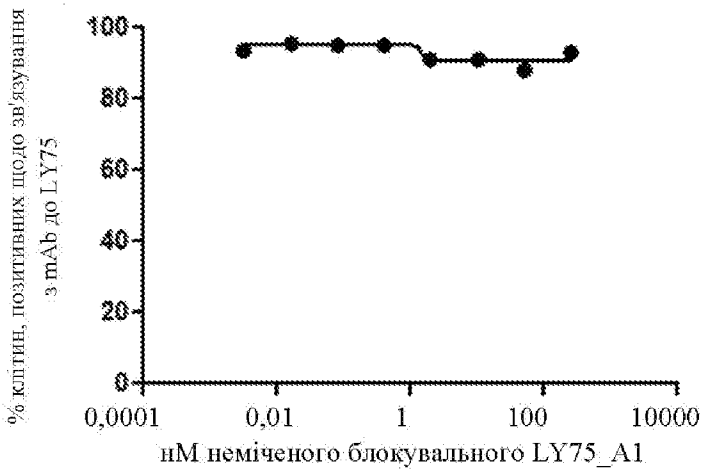
Фігура 4е


Натовізовач
LY75-DM1; 10 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM1; 10 мг/кг
LY75-DM4; 5 мг/кг
Ізотиповий контроль-DM4; 5 мг/кг
Середнє значення об'єму пухлини (мм³)
1200
1000
800
600
400
200
0
1
5
8
10
13
16
20
23
27
30
34
37
41
44
48
51
55
58
60
День (після введення дози)

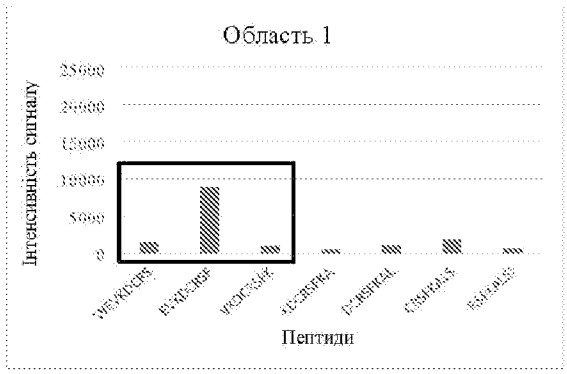
Фігура 4f



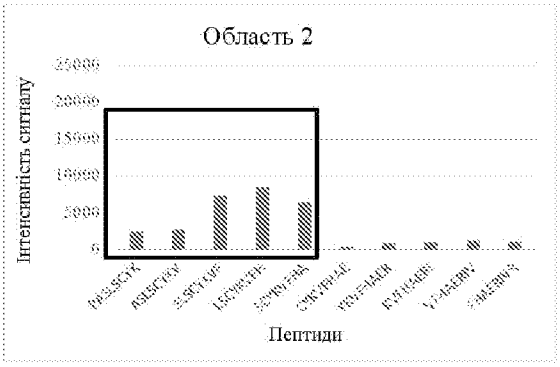
Фігура 5a



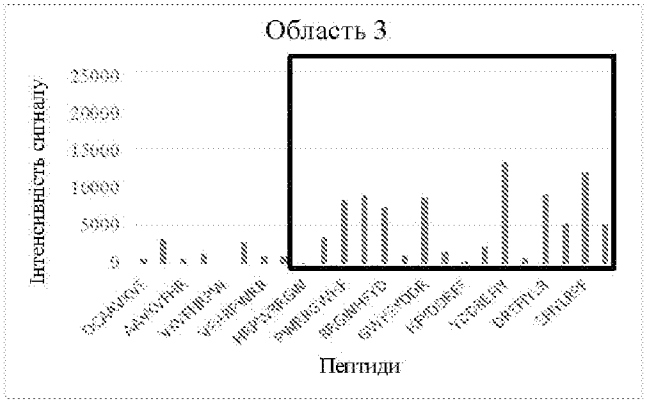
Фігура 5b



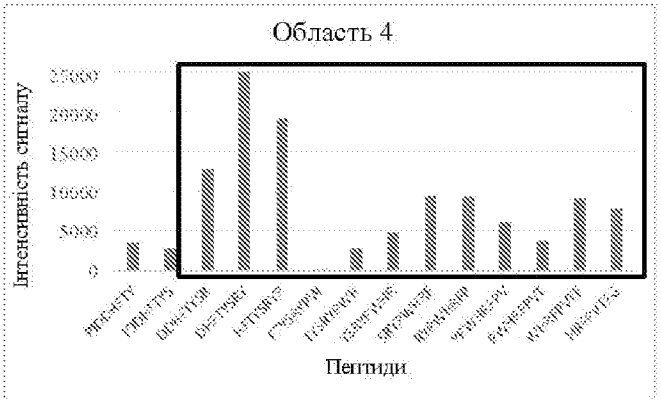
Фігура 6a



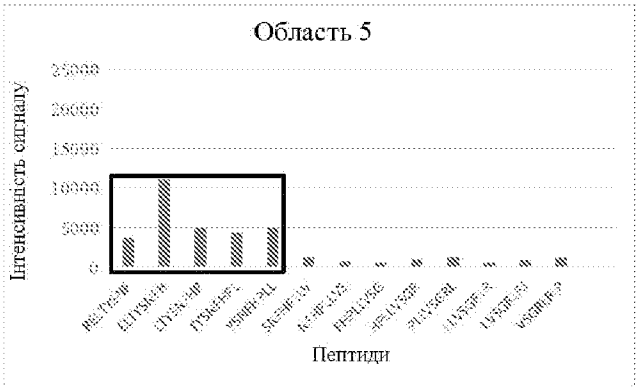
Фігура 6b



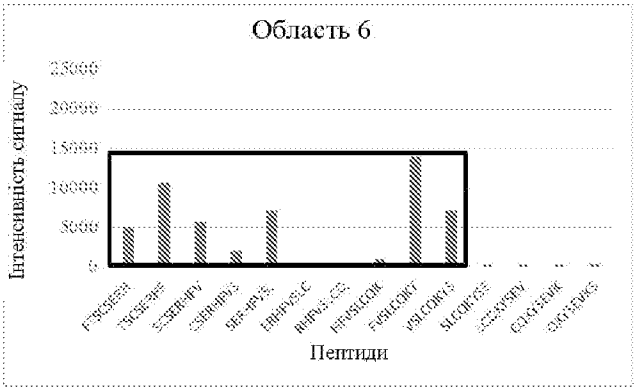
Фігура 6c



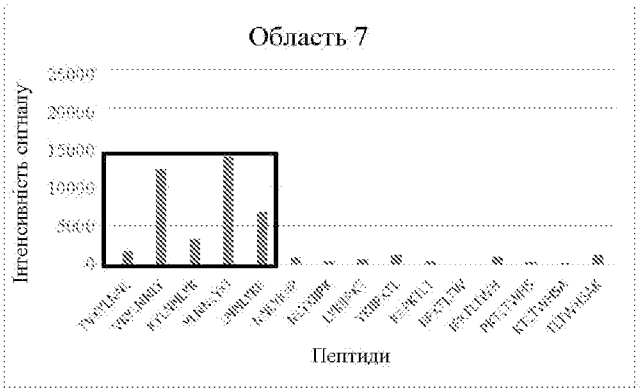
Фігура 6d



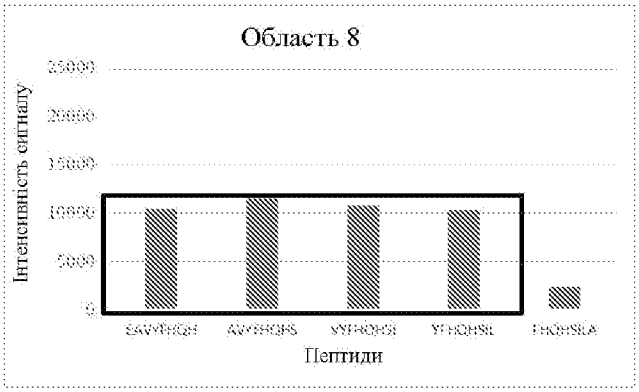
Фігура 6e



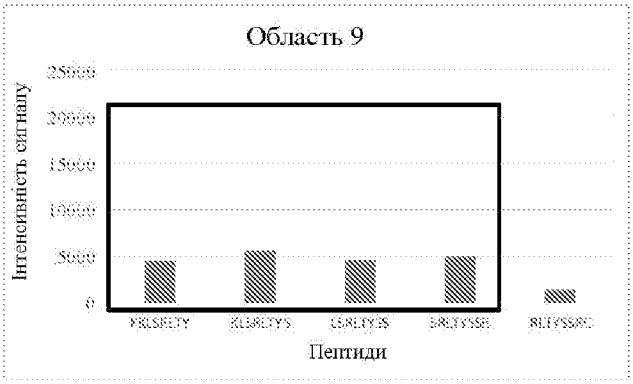
Фігура 6f



Фігура 6g



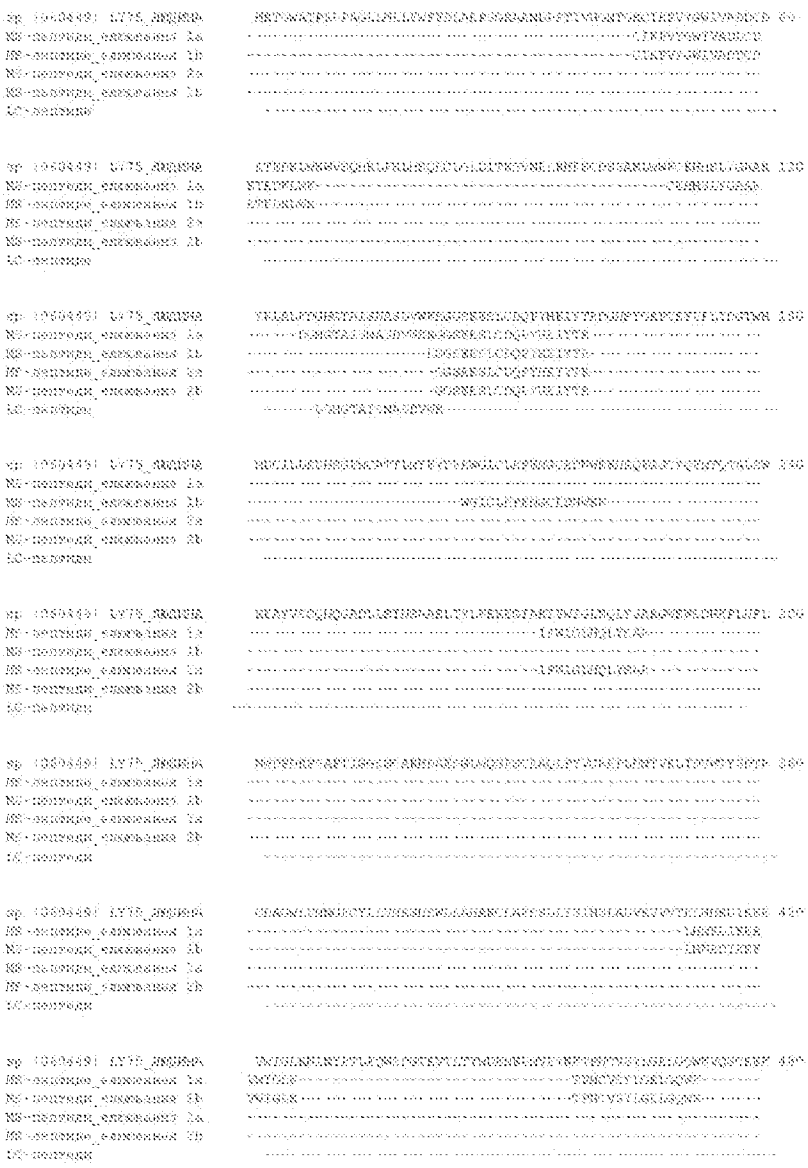
Фігура 6h

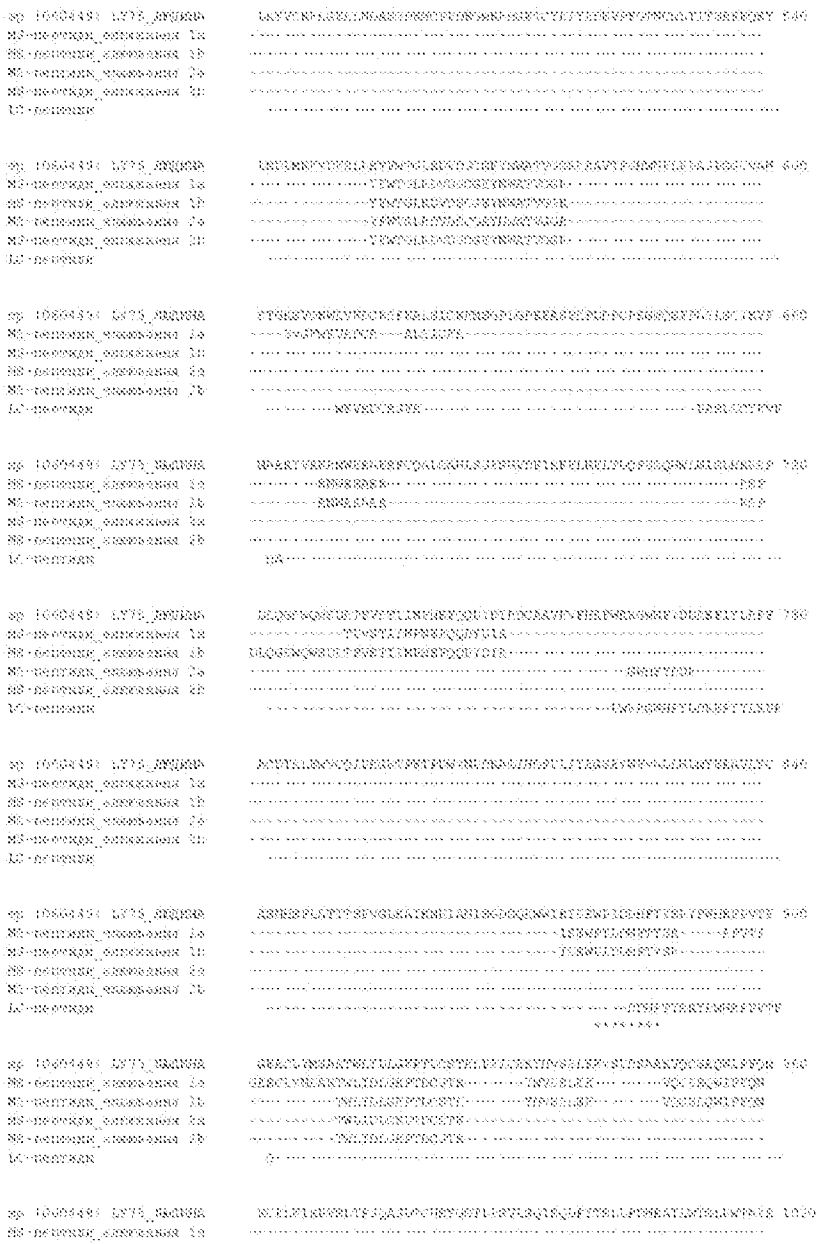


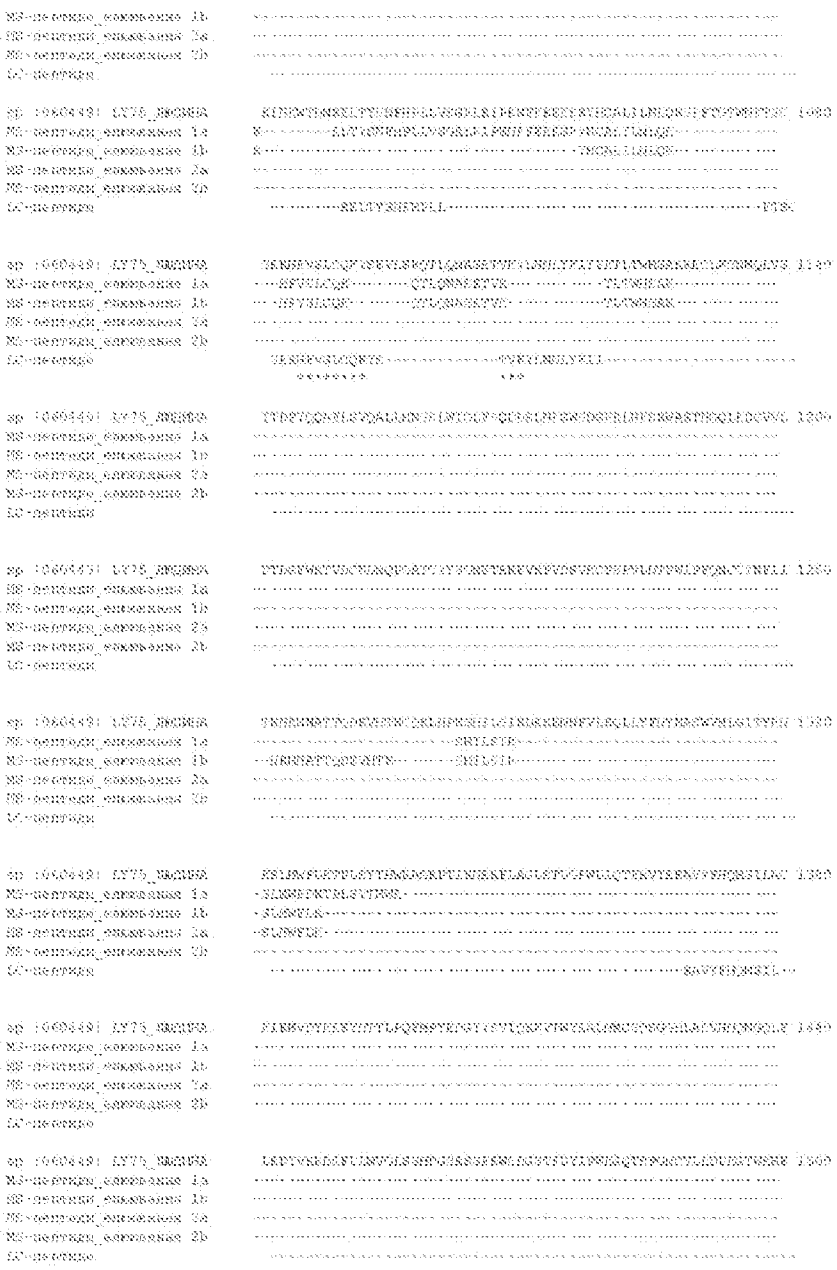
Фігура 6і

Фігура 6j

Фігура 7







```
sp|O60449|LY75_ЛЮДИНА      KCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWIQYKGHCYKSDQALHSFSEAK 1560
MS-пептиди_елюювання 1a   ------------------------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 1b   ------------------------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2a   ------------------------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2b   ------------------------------------------------------------
LC-пептиди                  ----------------KKLSRLTYSS-C-----NGSRWIQYKGHCYKSDQALH------

sp|O60449|LY75_ЛЮДИНА      KLCSKHDHSATIVSIKDEDENKFVSRLMRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVT 1620
MS-пептиди_елюювання 1a   -----HDHSATIVSIKDEDENKFVSR------------------------------
MS-пептиди_елюювання 1b   -----HDHSATIVSIKDEDENKFVSR------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2a   -----HDHSATIVSIKDEDENKFVSR------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2b   ------------------------------------------------------------
LC-пептиди                  ------------------------------------------------------------

sp|O60449|LY75_ЛЮДИНА      FVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGRVVCKVPLGPDYTAIAIIVATLSIL 1680
MS-пептиди_елюювання 1a     ------------------------VECEHGFGR----------------------
MS-пептиди_елюювання 1b     ------------------------VECEHGFGR----------------------
MS-пептиди_елюювання 2a     ------------------------VECEHGFGR----------------------
MS-пептиди_елюювання 2b     ------------------------VECEHGFGR----------------------
LC-пептиди                ------------------------------------------------------------

sp|O60449|LY75_ЛЮДИНА      VLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPSFHD 1722
MS-пептиди_елюювання 1a   ------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 1b   ------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2a   ------------------------------------------
MS-пептиди_елюювання 2b   ------------------------------------------
LC-пептиди                  ------------------------------------------
```

5

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601