



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011144141/10, 31.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.03.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

01.04.2009 US 61/211,695;
02.04.2009 US 61/166,217;
04.12.2009 US 61/266,972

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2013 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 20.06.2016 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 01.11.2011(86) Заявка РСТ:
US 2010/029516 (31.03.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/120561 (21.10.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭЛКИНС Кристи (US),
ПОЛСОН Эндрю (US),
ЭБЕНС Аллен (US),
АДАМС Камелия (US),
ЧЖЭН Бин (US),
ДЖУНУТУЛА Джагатх Р. (US),
ХОНГО Джо-энн (US),
У Янь (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) АНТИТЕЛА К FcRH5, ИХ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к области иммунологии. Предложено выделенное моноклональное антитело к FcRH5 человека, охарактеризованное последовательностями гипервариабельных участков (HVR), и его антигенсвязывающий фрагмент. Кроме того, рассмотрен полинуклеотид, кодирующий антитело по изобретению, экспрессирующий вектор и клетка-хозяин для получения антитела по изобретению. Описаны иммуноконъюгаты, содержащие антитело по изобретению и предназначенные для ингибирования роста

клеток, для определения присутствия FcRH5 человека в образце, для лечения пролиферативного расстройства, а также для ингибирования пролиферации клетки. Также предложена фармацевтическая композиция для ингибирования роста клеток, которые экспрессируют FcRH5 человека, содержащая эффективное количество иммуноконъюгата; применение иммуноконъюгата для получения лекарственных средств для ингибирования жизнеспособности клетки, которая экспрессирует FcRH5 человека, и для лечения пролиферативного

расстройства, опосредованного FcRH5 человека; способ *in vitro* определения присутствия белка FcRH5 человека в биологическом образце и способ получения соединения конъюгата антитело-препарат. Данное изобретение может

найти дальнейшее применение в терапии и диагностики заболеваний, связанных с FcRH5 человека. 13 н. и 46 з.п. ф-лы, 48 ил., 13 табл., 13 пр.

(56) (продолжение):

WO 2006/039238 A2, 13.04.2006. US 2008/247944 A1, 09.10.2008. WO 2008/109533 A2, 12.09.2008. RU 2007/115040 A, 27.10.2008. ISE T. et al., "Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma." *Leukemia*, 2007; 21: 169-174.

RU 2 5 8 7 6 2 1 C 2

RU 2 5 8 7 6 2 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 587 621** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011144141/10, 31.03.2010

(24) Effective date for property rights:
31.03.2010

Priority:

(30) Convention priority:
 01.04.2009 US 61/211,695;
 02.04.2009 US 61/166,217;
 04.12.2009 US 61/266,972

(43) Application published: 10.05.2013 Bull. № 13

(45) Date of publication: 20.06.2016 Bull. № 17

(85) Commencement of national phase: 01.11.2011

(86) PCT application:
US 2010/029516 (31.03.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/120561 (21.10.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ELKINS Kristi (US),
 POLSON Endryu (US),
 EBENS Allen (US),
 ADAMS Kameliya (US),
 CHZHEN Bin (US),
 DZHUNUTULA Dzhagatk R. (US),
 KHONGO Dzhon-enn (US),
 U YAn (US)

(73) Proprietor(s):

DZHENENITEK, INK. (US)

(54) ANTI-FcRH5 ANTIBODIES, IMMUNOCONJUGATES THEREOF AND METHODS FOR USE THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: medicine; immunology.

SUBSTANCE: disclosed is a recovered monoclonal antibody to human FcRH5, characterised by sequences of hypervariable sections (HVR), and its antigen-binding fragment. Besides, what is described a polynucleotide coding the antibody under the invention, an expression vector and host cell for producing the antibody according to the invention. There are described immune-conjugates, containing the antibody under the invention and intended for inhibiting cell growth, to determine presence of human FcRH5 in the sample, for treating a proliferative disorder, as well as for inhibiting cell proliferation. Also disclosed is a pharmaceutical

composition for inhibiting growth of cells expressing human FcRH5 containing an effective amount of the immune-conjugate; using the immune-conjugate for preparing drugs for inhibiting cell viability, which expresses human FcRH5 and for treating a proliferative disorder mediated by human FcRH5; method of *in vitro* determination of presence of human FcRH5 protein in a biological sample and method of producing a compound of conjugate antibody-drug.

EFFECT: present invention can find further application in therapy and diagnostics of diseases associated with human FcRH5.

59 cl, 48 dwg, 13 tbl, 13 ex

Ссылка на список последовательностей

Данная заявка на изобретение содержит перечень последовательностей, который был получен посредством EFS-Web и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII была создана 9.09.2011, файл был назван GNE0350P.txt и имеет размер 92,65 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение описывает композиции, используемые для лечения гематобластозов у млекопитающих, а также способы использования таких композиций для указанных целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Злокачественные опухоли (рак) являются второй ведущей причиной смертности в Соединенных штатах Америки после сердечных заболеваний (Boring et al., *CA Cancer J. Clin.* 43:7 (1993)). Рак характеризуется увеличением количества патологических клеток (или клеток новообразования), произошедших из здоровой ткани, с образованием опухолевой массы, инвазией таких клеток новообразования в прилегающие ткани и образованием злокачественных клеток, которые, в конце концов, распространяются посредством кровеносной или лимфатической системы в региональные лимфатические узлы и отдаленные участки организма в результате процесса, называемого метастазами. При наличии рака клетки пролиферируют в условиях, при которых здоровые клетки не стали бы расти. Рак проявляет себя в виде целого ряда форм, которые характеризуются по различной степени инвазивности и агрессивности.

Виды рака, включающие клетки, образующиеся в ходе гематопоеза, т.е. процесса образования клеточных элементов крови, таких как лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и клетки-естественные киллеры, относятся к гематобластозам. Лимфоциты, находящиеся в крови и лимфатической ткани, играют важную роль в иммунном ответе и подразделяются на два основных класса лимфоцитов: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-лимфоциты (Т-клетки), которые опосредуют гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет, соответственно.

В-клетки созревают в костном мозге, и при выходе из костного мозга такие клетки имеют возможность экспрессировать на своей поверхности антигенсвязывающее антитело. При первой встрече нативного антитела с антигеном, к которому специфично мембраносвязанное антитело, клетка начинает быстро делиться, и ее потомство дифференцирует в В-клетки памяти и эффекторные клетки, называемые «плазматитами». В-клетки памяти имеют большую продолжительность жизни и продолжают экспрессировать мембраносвязанное антитело с такой же самой специфичностью, что и исходная родительская клетка. Плазматиты не вырабатывают мембраносвязанного антитела, но вместо этого вырабатывают антитело в форме, предполагающей секрецию. Секретированные антитела являются основной молекулой-эффектором в гуморальном иммунитете.

Т-клетки созревают в тимусе, обеспечивающем среду для пролиферации и дифференциации незрелых Т-клеток. Во время созревания Т-клеток, последние подвергаются реаранжировке генов, отвечающих за рецептор Т-клеток и положительный и отрицательный отбор, что позволяет определить фенотип клеточной поверхности зрелой Т-клетки. Характерными маркерами клеточной поверхности зрелых Т-клеток являются комплекс CD3:Т-клеточный рецептор и один из со-рецепторов (CD4 или CD8).

В попытках открыть эффективные клеточные мишени для лечения рака, исследователи решили идентифицировать трансмембранные или связанные иным образом с мембраной полипептиды, которые специфическим образом экспрессируются

на поверхности раковых клеток одного или нескольких отдельных видов в сравнении с одним или несколькими типами здоровых нераковых клеток. Часто такие мембраносвязанные полипептиды экспрессируются на поверхности раковых клеток в большем количестве, чем на поверхности нераковых клеток. Идентификация таких опухолеассоциированных антигенов-полипептидов клеточной поверхности позволила специфически использовать раковые клетки в качестве мишени для их разрушения в ходе терапий, основанных на использовании антител. В данном случае сообщается, что основанная на использовании антитела терапия оказалась очень эффективной в лечении определенных видов рака. Например, ГЕРЦЕПТИН® и РИТУКСАН® (оба производства Genentech Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния) являются антителами, которые с успехом использовались для лечения рака молочной железы и неходжкинской лимфомы, соответственно. В частности, ГЕРЦЕПТИН® является рекомбинантным гуманизированным ДНК-производным моноклональным антителом, которое избирательно связывается с внеклеточным доменом протоонкогена человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2). Гиперэкспрессия белка HER2 отмечается в 25-30% случаев первичного рака молочной железы. РИТУКСАН® получен путем генной инженерии и представлен химерным мышинным/человеческим моноклональным антителом, чье действие направлено против антигена CD20, находящегося на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов. Оба таких антитела вырабатываются рекомбинантным образом в клетках яичников китайского хомячка (СНО-клетках).

В ходе других попыток открыть эффективные клеточные мишени для лечения рака исследователи идентифицировали (1) не связанные с мембраной полипептиды, которые специфически вырабатываются одним или несколькими типами раковых клеток в сравнении с одним или несколькими отдельными типами нераковых здоровых клеток, (2) полипептиды, вырабатываемые раковыми клетками на таком уровне экспрессии, который существенно превышает таковой уровень одной или нескольких здоровых нераковых клеток, или (3) полипептиды, экспрессия которых особенно ограничена только одним (или очень ограниченным количеством различных типов) типом ткани как при наличии, так и при отсутствии рака (например, здоровая ткань предстательной железы и ткань опухоли предстательной железы). Такие полипептиды могут оставаться локализованными внутри клетки или могут секретироваться раковыми клетками. Более того, такие полипептиды могут экспрессироваться не только раковыми клетками, но также и клетками, которые вырабатывают и/или секретируют полипептиды, обладающие усиливающим или повышающим рост воздействием на раковые клетки. Подобные секретируемые полипептиды часто представлены белками, придающими раковым клеткам преимущество в росте в сравнении со здоровыми клетками, и включают, например, ангиогенные факторы, факторы клеточной адгезии, факторы роста и т.п. Идентификация антагонистов подобных не связанных с мембраной полипептидов, как ожидается, может помочь выявить эффективные терапевтические агенты для лечения подобных типов рака. Более того, идентификация схемы экспрессии таких полипептидов окажется полезной для диагностики отдельных типов рака у млекопитающих.

Несмотря на представленные выше достижения в лечении рака у млекопитающих, существует большая потребность в дополнительных терапевтических агентах, позволяющих определить наличие опухоли у млекопитающего и эффективно ингибировать рост клеток новообразования, соответственно. Согласно этому, целью данного изобретения является идентификация полипептидов, связанных с клеточной

мембраной, секретируемых или внутриклеточных полипептидов, экспрессия которых особенно ограничена только одним типом ткани (или очень ограниченным количеством типов тканей), кроветворными тканями, как в присутствии, так и в отсутствии рака, а также использование таких полипептидов и кодирующих их кислот для получения композиций, которые могут использоваться в лечении и/или определении гематобластозов у млекопитающих.

При В-клеточных злокачественных новообразованиях, включая В-клеточную лимфому и миелому, часто встречаются аномалии хромосомы 1q21, однако гены, задействованные в ходе таких аберраций, в большинстве своем неизвестны.

Хромосомные аномалии дисков 1q21-q23 встречаются наиболее часто среди нарушений генома при В-клеточной неходжкинской лимфоме и множественной миеломе. Среди подтипов неходжкинской лимфомы, точки разрыва транслокаций 1q21-q23, включая транслокации и дупликации, часто отмечались в виде одиночной хромосомной аномалии при фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ), В-клеточной лимфоме маргинальной зоны и лимфоме Беркитта. Путем клонирования точек разрыва хромосомальной транслокации t(1:14)(q21;q32) в клеточной линии миеломы было выявлено два гена, названных геном рецептора суперсемейства иммуноглобулинов, ассоциированным с транслокацией (IRTA), 1 и IRTA2. IRTA2 идентичен последовательностям, обозначаемым BXMAS1 (Nakayama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 285:830-7, 2001) и FcRH5 (Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9772-7, 2001). IRTA1 и IRTA2 являются членами семейства родственных генов IRTA.

FcRH5 (или IRTA2) является поверхностным клеточным рецептором, гомологичным семейству рецепторов Fc. Он обычно экспрессируется в зрелых В-клетках и имеет разное распределение в периферических лимфоидных органах в сравнении с FcRH4 (IRTA1).

IRTA1 экспрессируется в В-клетках маргинальной зоны, в то время как IRTA2 также экспрессируется в центроцитах и иммуноблестах зародышевого центра. Экспрессия IRTA2 прекращается в клеточных линиях множественной миеломы и лимфомы Беркитта с аномалиями 1q21 (см. Miller et al., Blood 99:2662-2669, 2002). Высокая частота вовлечения структурных перестроек 1q21 в В-клетках злокачественных новообразований указывает, что IRTA1 и IRTA2 играют критическую роль в патогенезе таких заболеваний (см. опубликованную РСТ заявку No. WO 01/38490; опубликованную заявку на патент США No. 20080292632, содержимое которой включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки) (см. также Polson, *et al.* Int Immunol. 2006 Sep;18(9):1363-73).

Принимая во внимание экспрессию FcRH5, предпочтительным будет выработка терапевтических антител к антигену FcRH5, чем создание минимальной или отсутствующей антигенности при введении пациентам, особенно при хроническом лечении. Данное изобретение удовлетворяет таковой и другим потребностям. Данное изобретение представляет антитела к FcRH5, которые помогут преодолеть ограничения используемых в настоящее время терапевтических композиций, а также дополнительные преимущества, которые окажутся очевидными на основе представленного ниже подробного описания.

Использование конъюгатов антитело-препарат (КАП), т.е. иммуноконъюгатов, для локальной поставки цитотоксических или цитостатических агентов, т.е. препаратов для гибели или ингибирования опухолевых клеток при лечении рака (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; US 4975278),

позволяет производить целенаправленную поставку молекулы препарата к опухолям, а также их внутриклеточное накопление, при этом системное введение таких неконъюгированных лекарственных препаратов может привести к недопустимым уровням токсичности для здоровых клеток, а также опухолевых клеток, которые должны элиминироваться (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506). Попытки для улучшения терапевтического индекса, т.е. максимальной эффективности и минимальной токсичности КАП, были направлены на избирательность поликлональных (Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87) и моноклональных антител (МАТ), а также свойства связывания и высвобождения препарата (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549). Молекулы препаратов, используемых в конъюгатах препарата с антителом, включают белки бактериальных токсинов, такие как дифтерийный токсин, белки токсинов растений, такие как рицин, небольшие молекулы, такие как ауристатин, гелданамицин (Mandler et al (2000) J. of the 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), майтансиноиды (EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), калихимицин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндесин (Rowland et al (1986) *см. выше*). Молекулы препаратов могут влиять на цитотоксические и цитостатические механизмы, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические препараты могут быть неактивными или менее активными при конъюгации с большими антителами или лигандами белковых рецепторов.

Белки ауристатин, ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина (WO 02/088172), были конъюгированы в виде молекул препарата с: (i) химерными моноклональными антителами сBR96 (специфичными к антигену Y Льюиса карциномы); (ii) сAC10, специфичному к CD30 гемобластозов (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21 (7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) антителами к CD20, такими как ритуксан (WO 04/032828) для лечения видов рака с экспрессией CD20 и иммунных расстройств; (iv) антителами к EphB2R 2H9 для лечения колоректального рака (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) антителом к Е-селектину (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); (vi) трастузумабом (ГЕРЦЕПТИН®, US 2005/0238649), и (vi) антителами к CD30 (WO 03/043583). Варианты ауристатина Е описаны в патентах США No. 5767237 и 6124431. Монометилловый ауристатин Е, конъюгированный с моноклональными антителами, описан в Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Том 45, номер аннотации 623 (от 28 марта 2004 г.). Аналоги ауристатина MMAE и MMAF были конъюгированы с целым рядом антител (US 2005/0238649).

Стандартные способы присоединения, т.к. связывание посредством ковалентных связей, молекулы препарата с антителом обычно приводят к гетерогенной смеси молекул, в которой молекулы препаратов присоединены к целому ряду участков антитела. Например, цитотоксические препараты обычно конъюгированы с антителами посредством многочисленных остатков лизина антитела, что приводит к образованию гетерогенной смеси конъюгата антитело-препарат. В зависимости от условий реакции, гетерогенная смесь обычно состоит из антител с 0 до примерно 8 или более

присоединенными молекулами. Кроме того, в каждой подгруппе конъюгатов с тем или иным целочисленным соотношением молекул препаратов к антителу существует потенциально гетерогенная смесь, в которой молекула препарата присоединена к различным участкам антитела. Аналитические и препаративные способы могут
 5 оказаться недостаточными для сепарации и характеристики молекул конъюгатов антитело-препарат в гетерогенной смеси, образованной в результате реакции конъюгации. Антитела представлены большими, комплексными и структурно различными биомолекулами, часто содержащими много реакционных функциональных групп. Их реакционная способность с линкерными реагентами и промежуточными
 10 соединениями препарат-линкер зависят от факторов, таких как pH, концентрация, концентрация соли и ко-растворители. Более того, многоэтапный процесс конъюгации может быть невоспроизводимым по причине затруднений в контроле условий реакции и характеристики реагентов и промежуточных веществ.

Тиолы (цистеин) реакционноспособны при нейтральном значении pH, в отличие от
 15 большинства аминов, которые протонированы и менее нуклеофильны при pH около 7. Поскольку несвязанные группы тиолов (меркаптаны, сульфгидрил) относительно реакционноспособны, белки с цистеиновыми остатками часто существуют в окисленной форме в виде дисульфидно-связанных олигомеров или имеют внутренние дисульфидные группы. Внеклеточные белки обычно не имеют свободных тиолов (Garman, 1997, Non-
 20 Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, стр. 55). Цистеиновые тиоловые группы антитела обычно более реакционноспособные, т.е. более нуклеофильные, относительно электрофильных реагентов конъюгации, чем аминные или гидроксильные группы антитела. Цистеиновые остатки были включены в белки путем процедур генной инженерии (рекомбинации) для образования ковалентных связей
 25 с лигандами или образования новых внутримолекулярных дисульфидных мостиков (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; US 6248564). Тем не менее, процедура
 30 рекомбинации в тиоловых группах цистеина путем мутации различных аминокислотных остатков белка в цистеиновые аминокислоты потенциально проблематична, особенно в случае неспаренных (несвязанного Цис) остатков или остатков, которые относительно доступны для реакции или окисления. В концентрированных растворах белка, например, периплазме *E. coli*, супернатанта культуры или частично или полностью очищенного
 35 белка, неспаренные остатки Цис на поверхности белка могут связываться и окисляться с образованием межмолекулярных дисульфидных связей, и, следовательно, димеров или мультимеров. Образование дисульфидного димера приводит к неактивности нового Цис для конъюгации с препаратом, лигандом или другой меткой. Кроме того, если белок при окислении образует внутримолекулярный дисульфидный мостик между
 40 новыми включенными и существующими остатками Цис, обе тиоловые группы Цис недоступны для активного участка и взаимодействий. Кроме того, белок может оставаться неактивным или неспецифическим при неправильном скручивании или потере третичной структуры (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

Антитела с введенным путем рекомбинации цистеином были разработаны в виде
 45 фрагментов антитела FAB (тиоFab) и экспрессируются в виде моноклональных антител IgG полной длины (ТиоMAT) (Junutula, J.R. et al. (2008) *J Immunol Methods* 332:41-52; US 2007/0092940, содержание включено в виде ссылки). ТиоFab и ТиоMAT были конъюгированы посредством линкеров в положении новых введенных тиолов цистеина

с использованием тио-реакционных линкерных реагентов и препарат-линкерных реагентов для получения конъюгатов антитело-препарат (Тио КАП).

Все процитированные здесь ссылки, включая заявки на патенты и публикации, включены в виде ссылки во всей своей полноте.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение описывает антитела к FcRH5 или их функциональные фрагменты, а также способ их использования в лечении гематобластозов.

В одном аспекте изобретение описывает антитело, которое связывается, преимущественно специфически, с любым из описанных выше или ниже полипептидов.

В некоторых случаях антитело представлено моноклональным антителом, фрагментом антитела, включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диателом, антителом с одним доменом, химерным антителом, гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом или антителом, которое конкурентным образом ингибирует связывание полипептидного антитела к FcRH5 с соответствующей антигенной детерминантой.

Антитела данного изобретения могут быть в некоторых случаях представлены в виде конъюгатов с препаратами-ингибиторами роста или цитотоксическим агентом, например, токсином, включая, например, ауристатин, майтансиноид, производное долостатина или калихихимицина, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или т.п. Антитела данного изобретения могут в некоторых случаях вырабатываться в клетках СНО или бактериальных клетках, и преимущественно индуцировать гибель клетки, с которой они связываются. В целях определения, антитела данного изобретения могут быть помечены, присоединены к твердому субстрату или т.п.

В одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что моновалентная аффинность (т.е. аффинность антитела как фрагмента Fab к FcRH5) или аффинность в двухвалентной форме антитела к FcRH5 (т.е. аффинность антитела как фрагмента IgG к FcRH5) практически такая же, ниже или выше, чем моновалентная аффинность или аффинность в двухвалентной форме, соответственно, мышиного антитела (например, аффинность мышиного антитела как фрагмента Fab или фрагмента IgG к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела как фрагмента Fab или фрагмента IgG к FcRH5), состоящего или включающего последовательность варьируемого домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 19) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 21).

В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, которое отличается тем, что аффинность антитела в его двухвалентной форме к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет 0,4 нМ, 0,2 нМ или 0,5 нМ.

В одном аспекте изобретения описано антитело, связывающееся с FcRH5 и отличающееся тем, что такое антитело состоит, по меньшей мере, из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести гипервариабельных участков (HVR), выбираемых из следующих групп:

(i) HVR-L1, включающий последовательность KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, включающий последовательность SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, включающий последовательность QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, включающий последовательность GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR-H2, включающий последовательность ATISSGGSLTFYLDVSR (SEQ ID NO: 36); и

(vi) HVR-H3, включающий последовательность PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37). В другом варианте воплощения изобретения HVR-H2 имеет последовательность SEQ ID NO: 36. В другом варианте воплощения изобретения антитело включает 1 консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы k человека. В еще одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из консенсусной последовательности каркасного участка подгруппы III тяжелой цепи человека. В другом варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен легкой цепи, имеющий, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19. В одном варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21. В другом варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен легкой цепи, имеющий, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21. В одном варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен тяжелой цепи, состоящий из одного, двух, трех или четырех аминокислотных последовательностей каркасных участков, выбираемых из SEQ ID NO: 31, 32, 33 и 34. В других вариантах воплощения изобретения антитело включает переменный домен легкой цепи, состоящий из одного, двух, трех или четырех аминокислотных последовательностей каркасных участков, выбираемых из SEQ ID NO: 22, 23, 24 и 25. В другом варианте воплощения изобретения антитело включает переменный домен тяжелой цепи, состоящий из одного, двух, трех или четырех аминокислотных последовательностей каркасных участков, имеющих, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотными последовательностями, выбираемыми из SEQ ID NO: 31, 32, 33 и 34. В других вариантах воплощения изобретения антитело включает переменный домен легкой цепи, состоящий из одного, двух, трех или четырех аминокислотных последовательностей каркасных участков, имеющих, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотными последовательностями, выбираемыми из SEQ ID NO: 22, 23, 24 и 25.

В одном аспекте изобретения описано антитело, связывающееся с FcRH5 и отличающееся тем, что указанное антитело состоит, по меньшей мере, из одного варианта HVR, при этом последовательность такого варианта HVR включает модификацию, по меньшей мере, одного остатка последовательности, указанной как SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 или 37. В одном варианте воплощения изобретения модификация представлена замещением, вставкой или делецией.

В другом варианте воплощения изобретения, по меньшей мере, участок последовательности каркасного участка представлен консенсусной последовательностью каркасного участка.

В другом варианте воплощения изобретения описывает гуманизованное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что моновалентная аффинность антитела к человеческому FcRH5 практически такая же, что и моновалентная аффинность мышинового антитела, включающего последовательность переменного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 19) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 21).

В одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что моновалентная аффинность антитела к человеческому FcRH5, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз больше, чем моновалентная аффинность мышинового антитела, включающего последовательность вариабельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 19) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 21).

В одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что моновалентная аффинность антитела к человеческому FcRH5, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 раз меньше, чем моновалентная аффинность мышинового антитела, включающего последовательность вариабельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 практически такая же, что и аффинность мышинового антитела в его двухвалентной форме, включающего последовательность вариабельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к человеческому FcRH5 в его двухвалентной форме, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз больше, чем аффинность мышинового или химерного антитела в его двухвалентной форме, включающего последовательность вариабельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к человеческому FcRH5 в его двухвалентной форме, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 раз меньше, чем аффинность мышинового или химерного антитела в его двухвалентной форме, включающего последовательность вариабельного домена легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В еще одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность такого антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет 0,4 нМ. В одном варианте воплощения изобретения аффинность антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет $0,4 \pm 0,04$ нМ.

В еще одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность такого антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет 0,2 нМ. В одном варианте воплощения изобретения аффинность антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет $0,2 \pm 0,02$ нМ.

В еще одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность такого антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет 0,5 нМ. В одном варианте воплощения изобретения аффинность антитела в его двухвалентной форме к человеческому FcRH5 составляет $0,5 \pm 0,01$ нМ.

Во всех аспектах изобретения аффинность связывания выражена в виде значения K_d . В одном аспекте изобретения аффинность связывания измеряется с помощью анализа

Віасоре или радиоиммунноанализа.

В еще одном аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что гуманизированное антитело при его конъюгации с цитотоксическим агентом ингибирует рост клеток опухоли.

5 В другом аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что гуманизированное антитело при его конъюгации с цитотоксическим агентом ингибирует рост клеток опухоли.

В одном варианте воплощения изобретения гуманизированное антитело и химерное антитело являются моновалентными или бивалентными. В другом варианте воплощения
10 изобретения гуманизированное антитело и химерное антитело включают один участок Fab, присоединенный к участку Fc.

В другом аспекте изобретение описывает антитело, состоящее из переменного домена тяжелой цепи, включающего последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, указанную на Фигуре 11 (SEQ ID NO: 35-37). В одном варианте воплощения
15 изобретения переменный домен включает последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, указанную на Фигуре 11 (SEQ ID NO: 31-34). В другом варианте воплощения изобретения антитело включает последовательность CH1 и/или Fc, указанную на Фигуре 11 (SEQ ID NO: 38 и/или 39).

В еще одном аспекте изобретение описывает антитело, состоящее из переменного
20 домена легкой цепи, включающего последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, указанную на Фигуре 11 (SEQ ID NO: 26-28). В одном варианте воплощения изобретения переменный домен включает последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, указанную на Фигуре 11 (SEQ ID NO: 22-25). В другом варианте воплощения изобретения антитело включает последовательность CL1, указанную на
25 Фигуре 11 (SEQ ID NO: 29).

В одном аспекте изобретение описывает полипептид, состоящий из последовательности, указанной на Фигуре 10 (SEQ ID NO: 21). В другом аспекте изобретение описывает полипептид, состоящий из последовательности, указанной на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 19).

30 В другом аспекте изобретение описывает антитело, полученное в процессе (а) культивации клетки, экспрессирующей антитело, состоящее из описанного здесь переменного домена тяжелой цепи и описанного здесь переменного домена легкой цепи; и (б) изоляции антитела из указанной культивируемой клетки.

В другом аспекте изобретение описывает антитело, состоящее из описанного здесь
35 переменного домена тяжелой цепи и описанного здесь переменного домена легкой цепи. В одном варианте воплощения изобретения антитело моновалентно и включает участок Fc.

В одном аспекте изобретение описывает полинуклеотид, кодирующий описанное
40 здесь антитело. В одном варианте воплощения изобретение описывает вектор, состоящий из полинуклеотида. В другом варианте воплощения изобретение описывает клетку-хозяина, включающую вектор.

В одном аспекте изобретение включает антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином и состоящим из одного или нескольких несвязанных аминокислот цистеин и последовательности, выбираемой из SEQ ID NO: 251-298.
45 Антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином может связываться с полипептидом FcRH5. Антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином может быть получено путем процесса, включающего замену одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела к FcRH5 цистеином.

В одном аспекте изобретение включает антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, включающее одну или несколько несвязанных аминокислот цистеин, при этом антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином связывается с полипептидом FcRH5, и такое антитело получают с помощью процесса, состоящего из замены одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела к FcRH5 цистеином, при этом исходное антитело включает, по меньшей мере, одну последовательность HVR, выбираемую из:

(i) HVR-L1, включающий последовательность KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, включающий последовательность SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, включающий последовательность QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, включающий последовательность GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR-H2, включающий последовательность ATISSGGSLTFYLD SVR (SEQ ID NO: 36); и

(vi) HVR-H3, включающий последовательность PIPDY YALDY (SEQ ID NO: 37).

Антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином может быть представлено моноклональным антителом, фрагментом антитела, химерным антителом, гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом или антителом, которое конкурентным образом ингибирует связывание полипептидного антитела к FcRH5 с соответствующей антигенной детерминантой. Антитела данного изобретения могут быть в некоторых случаях представлены конъюгатами с агентом, ингибирующим рост, или цитотоксическим агентом, таким как токсин, включая, например, ауристатин или майтансиноид. Антитела данного изобретения могут в некоторых случаях вырабатываться в клетках CHO или бактериальных клетках, и преимущественно ингибируют рост или пролиферацию или индуцируют гибель клетки, с которой они связываются. В целях диагностики, антитела данного изобретения могут быть помечены, присоединены к твердому субстрату или т.п.

В одном аспекте изобретение описывает способы для получения антител по изобретению. Например, изобретение описывает способ получения антитела к FcRH5 (который, как это определено в данной заявке, включает антитело полной длины или его фрагмент), и такой способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора по изобретению, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент), и восстановление указанного антитела.

В другом аспекте изобретение описывает биспецифическое антитело, способное связываться с одной клеткой, которая экспрессирует FcRH5, и другой клеткой, экспрессирующей антиген-мишень на клеточной поверхности. В одном варианте воплощения изобретения вторая клетка представлена Т-клеткой. В одном варианте воплощения изобретения антиген-мишень на клеточной поверхности представлен CD3. В определенных вариантах воплощения изобретения биспецифическое антитело представлено антителом с выпуклостью. В одном варианте воплощения изобретения биспецифическое антитело агликозилировано. В одном варианте воплощения изобретения биспецифическое антитело вырабатывается в клетке-хозяине *Escherichia coli*. В одном варианте воплощения изобретения биспецифическое антитело не содержит одну или несколько эффекторных функций Fc. В одном варианте воплощения изобретения биспецифическое антитело не обладает АЗКЦ.

В одном аспекте изобретение представлено фармацевтической композицией, включающей антитело по изобретению или конъюгат антитело-препарат, а также фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

В одном аспекте изобретение описывает готовое изделие, состоящее из контейнера,

включающего композицию, при этом композиция состоит из одного или нескольких антител к FcRH5.

В одном аспекте изобретение описывает набор, состоящий из одного контейнера с композицией, включающей одно или несколько антител к FcRH5, и другого контейнера, включающего буфер.

В одном аспекте изобретение описывает использование антитела к FcRH5 в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток.

В одном аспекте изобретение описывает использование готового продукта в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток.

В одном аспекте изобретение описывает использование набора в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей FcRH5, и указанный способ включает в себя контакт упомянутой клетки с антителом по изобретению, что приводит к ингибированию роста указанной клетки. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ терапевтического лечения млекопитающего, имеющего раковую опухоль, состоящую из клеток, экспрессирующих FcRH5, и указанный способ состоит из введения упомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, что позволяет эффективно вылечить указанное млекопитающее. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ лечения или предотвращения нарушения пролиферации клеток, вызванного гиперэкспрессией FcRH5; указанный способ состоит из введения нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела по изобретению, что позволяет эффективно вылечить или предотвратить упомянутое нарушение клеточной пролиферации. В одном варианте воплощения изобретения упомянутое нарушение пролиферации представлено раком. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования роста клетки, при этом рост такой клетки, по меньшей мере, зависит от потенцирующего рост эффекта FcRH5; указанный способ состоит из контакта упомянутой клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, что приводит к ингибированию роста упомянутой клетки. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ терапевтического лечения опухоли у млекопитающего, при этом рост такой опухоли, по меньшей мере, зависит от потенцирующего рост эффекта FcRH5; указанный способ состоит из контакта

упомянутой клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, что приводит к эффективному лечению упомянутой опухоли. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

5 В одном аспекте изобретение описывает способ лечения рака, состоящий из введения пациенту фармацевтической композиции, включающей описанный здесь конъюгат, приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования пролиферации В-клеток, состоящий из воздействия на клетку иммуноконъюгатом, включающим антитело
10 по изобретению, в условиях, обеспечивающих связывание иммуноконъюгата с FcRH5.

Способ данного изобретения может дополнительно включать другие этапы лечения. Например, в одном варианте воплощения изобретения способ дополнительно включает этап, в ходе которого клетка-мишень и/или ткань-мишень (например, раковая клетка) подвергается воздействию лечению облучением или препаратом химиотерапии.

15 В одном аспекте изобретение описывает способы, состоящие из введения эффективного количества антитела к FcRH5 в комбинации с эффективным количеством другого терапевтического агента (например, антиангиогенного препарата, другого антитела, химиотерапевтического препарата, цитотоксического агента, иммуносупрессанта, пролекарства, цитокина, цитотоксической радиотерапии, кортикостероида, противорвотного препарата, антиканцероматозной вакцины,
20 анальгетика или препарата-ингибитора роста). Например, антитела к FcRH5 или иммуноконъюгаты используются в комбинациях с противораковым препаратом или антиангиогенным препаратом для лечения различных состояний новообразований и состояний при отсутствии новообразований. В отдельных примерах антитела к FcRH5
25 используются в комбинации с препаратами Велкаде® (бортезомиб), Ревлимид® (леналидомид), тамоксифен, летрозол, экземестан, анастрозол, иринотекан, цетуксимаб, фулвестрант, винорелбин, бевацизумаб, винкристин, цисплатин, гемцитабин, метотрексат, винбластин, карбоплатин, паклитаксел, доцетаксел, пеметрексед, 5-фторурацил, доксорубицин, бортезомиб, леналидомид, дексаметазон, мелфалан, преднизон,
30 винкристин, талидомид.

В зависимости от специфических показаний относительно подвергаемого лечению виду рака, комбинированная терапия по изобретению может быть скомбинирована с дополнительными терапевтическими агентами, такими как препараты химиотерапии, или дополнительными видами терапий, такими как лучевая терапия или хирургия. В
35 комбинированной терапии по изобретению может использоваться много известных химиотерапевтических препаратов. Предпочтительно будут использоваться те химиотерапевтические препараты, которые являются стандартными для лечения по специфическим показаниям. Доза или частота приема каждого терапевтического агента, используемого в комбинированной терапии, предпочтительно такие же или менее, чем
40 доза или частота приема соответствующего агента, используемого при монотерапии.

В другом аспекте изобретение описывает любые представленные здесь антитела к FcRH5, отличающиеся тем, что антитело к FcRH5 включает определяемую метку.

В одном аспекте изобретение описывает способ определения присутствия FcRH5 в образце, подозреваемом на содержание FcRH5; указанный способ включает в себя
45 воздействие упомянутого образца антителом по изобретению с последующим определением связывания упомянутого антитела с FcRH5 в образце, при этом такое связывание антитела с FcRH5 в образце является доказательством присутствия белка в упомянутом образце.

В одном аспекте изобретение описывает способ диагностики нарушения пролиферации клеток, вызванного повышением количества клеток, таких как В-клеток, экспрессирующих FcRH5; способ заключается в контакте исследуемых клеток в биологическом образце с любым из указанных выше антител, определении уровня антитела, связанного с исследуемыми клетками в образце, путем определения связывания антитела с FcRH5, и сравнении уровня связанного с клетками антитела в контрольном образце, при этом уровень связанного антитела нормализуется относительно количества FcRH5-экспрессирующих клеток в исследуемых и контрольных образцах, и, кроме того, более высокий уровень связанного в исследуемом образце антитела в сравнении с контрольным образцом указывает на присутствие нарушения клеточной пролиферации, вызванной клетками, экспрессирующими FcRH5.

В одном аспекте изобретение описывает способ выявления растворимого FcRH5 в крови или сыворотке, и такой способ включает в контакте исследуемого образца крови или сыворотки млекопитающего, подозреваемого на наличие нарушения В-клеточной пролиферации, с антителом к FcRH5 с последующим определением повышения растворимого FcRH5 в исследуемом образце в сравнении с контрольным образцом крови или сыворотки здорового млекопитающего.

В одном аспекте изобретение описывает способ связывания антитела по изобретению с клеткой, экспрессирующей FcRH5, и такой способ заключается в контакте упомянутой клетки с антителом по изобретению. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 отображает легкую цепь химерного антитела 7D11 к FcRH5 человека (ДНК).

Фигура 2 отображает легкую цепь химерного антитела 7D11 к FcRH5 человека (аминокислоты).

Фигура 3 отображает тяжелую цепь химерного антитела 7D11 к FcRH5 человека (ДНК).

Фигура 4 отображает тяжелую цепь химерного антитела 7D11 к FcRH5 человека (аминокислоты).

Фигура 5 отображает легкую цепь химерного антитела к FcRH5 (mAb10A8) человека (ДНК).

Фигура 6 отображает легкую цепь химерного антитела к FcRH5 (mAb10A8) человека (аминокислоты).

Фигура 7 отображает тяжелую цепь химерного антитела к FcRH5 (mAb10A8) человека (ДНК).

Фигура 8 отображает тяжелую цепь химерного антитела к FcRH5 (mAb10A8) человека (аминокислоты).

Фигура 9 отображает выравнивание переменных легких цепей мышиного антитела 10A8 и гуманизированного антитела 10A8v1 относительно консенсусной последовательности домена VL каппа 1 (huKI) (SEQ ID NO: 64).

Фигура 10 отображает выравнивание переменных легких цепей мышиного антитела 10A8 и гуманизированного антитела 10A8v1 относительно подгруппы консенсусной последовательности человеческого домена VH (huIII) (SEQ ID NO: 65).

Фигура 11 представляет аминокислотные последовательности антитела по изобретению (Hu10A8 v1).

Фигура 12 представляет аминокислотные последовательности полипептидных цепей Тио-МАТ по изобретению с включенным в ходе процедуры рекомбинации цистеином.

Фигура 13 представляет аминокислотные последовательности полипептидных цепей Тио-МАТ по изобретению с включенным в ходе процедуры рекомбинации цистеином.

Фигура 14 представляет перекрестную реакционную способность антител к FcRH5.

Фигура 15 представляет перекрестную реакционную способность антител к FcRH5.

5 Фигура 16 представляет перекрестную реакционную способность антител к FcRH5.

Фигура 17 представляет FACS-анализ антител к FcRH5.

Фигура 18 представляет титрацию антитела к FcRH5.

Фигура 19 представляет титрацию антитела к FcRH5.

Фигура 20 представляет FACS-анализ Тио-МАТ по изобретению.

10 Фигура 21 представляет FACS-анализ Тио-МАТ по изобретению.

Фигура 22 представляет FACS-анализ Тио-МАТ по изобретению.

Фигура 23 представляет FACS-анализ Тио-МАТ по изобретению.

Фигура 24 представляет FACS-анализ конъюгированного антитела по изобретению.

Фигура 25 представляет FACS-анализ конъюгированного антитела по изобретению.

15 Фигура 26 представляет влияние антител по изобретению на средний объем опухоли.

Фигура 27 представляет влияние антител по изобретению на среднюю массу тела.

Фигура 28 представляет влияние антител по изобретению на средний объем опухоли.

Фигура 29 представляет влияние антител по изобретению на среднюю массу тела.

20 Фигура 30a представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на средний объем опухоли.

Фигура 30b представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на среднюю массу тела.

Фигура 31 представляет анализ ответа на единичную дозу соединения.

Фигура 32 представляет анализ ответа на единичную дозу соединения.

25 Фигура 33 представляет нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 58) PRO820 кДНК, при этом SEQ ID NO: 58 является клоном, обозначенным в тексте данной заявки как «DNA56041-1416» (также указываемом здесь как «FcRH5»). Нуклеотидная последовательность, кодирующая FcRH5 вместе со старт- и стоп-кодонами, указана жирным и подчеркнутым шрифтом. (См. Goddard et al. патент США No. 7491529).

30 Фигура 34 представляет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 59), полученную из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 59, указанной на Фигуре 33. (См. Goddard et al. патент США No. 7491529).

Фигура 35A-B представляет нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 602) PRO52387 кДНК, при этом SEQ ID NO: 60 является клоном, обозначенным в тексте 35 данной заявки как «DNA257845» (также указываемом здесь как «FcRH5»). Нуклеотидная последовательность, кодирующая FcRH5 вместе со старт- и стоп-кодонами, указана жирным и подчеркнутым шрифтом (см. Chang et al. Опубликованная заявка на патент США No. 20060251662).

40 Фигура 36 представляет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 61), полученную из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 61, указанной на Фигуре 36A-B (см. Chang et al. Опубликованная заявка на патент США No. 20060251662).

Фигура 37 представляет нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 62) PRO314992 кДНК, при этом SEQ ID NO: 62 является клоном, обозначенным в тексте данной заявки как «DNA676969» (также указываемом здесь как «FcRH5»).

45 Фигура 38 представляет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 63), полученную из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 63, указанной на Фигуре 37.

Фигура 39 представляет влияние комбинированного введения иммуноконъюгата

антитела и, по меньшей мере, одного химиотерапевтического препарата на средний объем опухоли у мышей.

Фигура 40 представляет процентное изменение массы тела для животных в каждой группе приема доз.

5 Фигура 41 представляет влияние комбинированного введения иммуноконъюгата антитела и, по меньшей мере, одного химиотерапевтического препарата на средний объем опухоли у мышей.

Фигура 42 представляет процентное изменение массы тела для животных в каждой группе приема доз.

10 Фигура 43 представляет влияние комбинированного введения иммуноконъюгата антитела и, по меньшей мере, одного химиотерапевтического препарата на средний объем опухоли у мышей.

Фигура 44 представляет процентное изменение массы тела для животных в каждой группе приема доз.

15 Фигура 45 представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на средний объем опухоли.

Фигура 46 представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на среднюю массу тела.

20 Фигура 47 представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на средний объем опухоли.

Фигура 48 представляет влияние конъюгатов антител по изобретению на среднюю массу тела.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Изобретение описывает способы, композиции, наборы и готовые изделия для идентификации композиций для лечения гематобластозов у млекопитающих, а также способы использования таких композиций для данных целей.

В данной заявке на изобретение предоставляется описание способов, композиций, наборов и готовых изделий.

30 I. Общие способы

Практическое применение данного изобретения будет включать, если иное не указано, стандартные способы молекулярной биологии (включая процедуры рекомбинации), микробиологии, цитологии, биохимии и иммунологии, известные специалисту в данной области. Подобные способы во всей своей полноте описаны в литературе, например, 35 в “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard 40 V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001).

II. Определения

Для интерпретации данного изобретения будут применяться представленные ниже определения и, где это возможно, термины, используемые в единственном числе, будут приводиться во множественном числе и наоборот. В случае если любое определение 45 идет вразрез любому включенному в данную заявку документу в виде ссылки, решающим будет иметь значение представленное здесь определение.

В контексте данного изобретения термин «поверхностный маркер В-клетки» или «поверхностный антиген В-клетки» обозначает антиген, экспрессируемый на

поверхности В-клетки, который может служить мишенью для антагониста, который с ним связывается, и может быть представлен (не ограничиваясь) антителами к поверхностному антигену В-клеток или растворимой форме поверхностного антигена В-клетки, что приводит к антагонизму связывания лиганда с встречаемым в природе антигеном В-клетки. Поверхностные маркеры В-клеток включают лейкоцитарные поверхностные маркеры CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 и CD86 (описания см. в The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Другие поверхностные маркеры В-клеток включают RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btlg, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA и 239287. Отдельный интересующий поверхностный маркер В-клеток преимущественно экспрессируется на В-клетках в сравнении с другими тканями млекопитающих, не содержащими В-клеток, и такой маркер может экспрессироваться на предшественниках В-клеток и зрелых В-клетках.

В контексте данного изобретения термин «FcRH5» относится к любому нативному FcRH5, полученному у любого позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек, яванский макак) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В контексте данного изобретения человеческий FcRH5 также указывается как «TAHO18» или «PRO85143» (SEQ ID NO: 2) и кодируется нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 1), также указываемой как «DNA340394». В контексте данного изобретения FcRH5 яванского макака также указывается как «супо FcRH5». Термин «FcRH5» охватывает не подвергнутый процессингу FcRH5 «полной длины», а также любую форму FcRH5, получаемую в результате процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты FcRH5, например, сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. Описанные здесь полипептиды FcRH5 могут быть изолированы из целого ряда источников, таких как различные типы тканей человека или другие источники, или получены путем рекомбинации или синтеза. Термин «полипептид FcRH5 с нативной последовательностью» включает полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид FcRH5, встречающийся в природе. Такие полипептиды FcRH5 с нативной последовательностью могут быть изолированы из естественных источников или получены путем рекомбинации или синтеза. Термин «полипептид FcRH5 с нативной последовательностью» включает, в частности, встречающиеся в природе укороченные или секретируемые формы специфического полипептида FcRH5 (*например*, последовательность внеклеточного домена), встречающиеся в природе вариантные формы (*например*, сплайс-формы) и встречающиеся в природе аллельные варианты полипептида. В определенных вариантах воплощения изобретения описанные здесь полипептиды FcRH5 с нативной последовательностью представлены зрелыми полипептидами или полипептидами с нативной последовательностью полной длины, которые включают аминокислотные последовательности полной длины, представленные на сопроводительных фигурах. Старт- и стоп-кодона (если указаны) приводятся на фигурах жирным подчеркнутым шрифтом. Остатки нуклеиновых кислот, указанные на сопроводительных фигурах как «N», представляют собой остаток любой нуклеиновой кислоты. Однако на сопроводительных фигурах описанные здесь полипептиды FcRH5 начинаются с остатков метионина, указанных на фигурах в положении 1, при этом предположительно и возможно, что другие остатки метионина, расположенные в верхнем и нижнем положениях от положения 1 на фигурах, могут использоваться в

качестве стартового аминокислотного остатка для полипептидов FcRH5.

В контексте данного изобретения «mu10A8» или «MA10A8» или «антитело к FcRH5 (10A8) мыши» или «мышинное антитело к FcRH5 (10A8)» специфическим образом относится к мышинному моноклональному антителу к FcRH5, при этом такое мышинное моноклональное антитело к FcRH5 состоит из переменного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 18 (Фигура 9) и переменного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 20 (Фигура 10). Мышное моноклональное антитело к FcRH5 может быть приобретено у коммерческих источников.

В контексте данного изобретения «ch10A8» или «chMAFcRH5 (10A8)» или «chFcRH5 (10A8)» или «химерное антитело MAFcRH5 (10A8)» специфическим образом относится к химерному антителу к человеческому FcRH5, при этом такое химерное антитело к человеческому FcRH5 состоит из легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 15 (Фигура 6). Легкая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 15 в дальнейшем включает переменный домен, представленный на Фигуре 9, а также константный домен легкой цепи IgG1 человека. Химерное антитело к человеческому FcRH5 (10A8) дополнительно содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 17 (Фигура 8). Тяжелая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 17 в дальнейшем включает переменный домен, представленный на Фигуре 10, а также константный домен тяжелой цепи IgG1 человека.

В контексте данного изобретения «ch7D11» или «chMAFcRH5 (7D11)» или «chFcRH5 (7D11)» или «химерное антитело MAFcRH5 (7D11)» специфическим образом относится к химерному антителу к человеческому FcRH5, при этом такое химерное антитело к человеческому FcRH5 состоит из легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 11 (Фигура 2), включающей константный домен легкой цепи человеческого IgG1. Химерное антитело к человеческому FcRH5 (7D11) дополнительно содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 13 (Фигура 4), включающей константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1.

В контексте данного изобретения «антитело к cynoFcRH5» или «антитело к cyno FcRH5» относится к антителам, связывающимся с FcRH5 яванского макака.

В контексте данного изобретения «10A8-привитый» или «10A8-привитое «гуманизированное» антитело» или «привитый hu10A8» специфическим образом относится к привитому фрагменту, получаемому путем прививания гипервариабельных участков из мышинного антитела 10A8 к FcRH5 (mu10A8) к акцептору - консенсусной последовательности VL каппа I (huKI) человека и консенсусной последовательности VH (huIII) подгруппы III человека (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)) (см. Пример 1 и Фигуры 9 (SEQ ID NO: 19) и 10 (SEQ ID NO: 21)). В контексте данного изобретения «hu10A8» или «hu10A8 v1» специфическим образом относится к гуманизированному антителу 10A8.

В контексте данного изобретения термин «модификация» аминокислотного остатка/положения относится к изменению первичной последовательности аминокислот в сравнении с исходной последовательностью аминокислот, при этом такое изменение возникает в результате изменения последовательности, вовлекающего указанные аминокислотные остатки/положения. Например, типичные модификации включают замену остатка (или в указанном положении) другой аминокислотой (например, замена консервативной или неконсервативной аминокислоты), вставку одной или нескольких (обычно менее 5 или 3) аминокислот, прилегающих к указанному остатку/положению, и делецию указанного остатка/положения. Термин «замена аминокислоты» или его варианты относятся к замене существующего остатка аминокислоты в предварительно

определенной (исходной) аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком. Обычно и более предпочтительно, чтобы такая модификация приводила к изменению по меньшей мере в показателе физикобиохимической активности вариантного полипептида в сравнении с полипептидом, включающим исходную аминокислотную последовательность (т.е. последовательность «дикого типа»). Например, в случае антитела, физикобиохимическая активность, которая подвергается изменению, может быть представлена аффинностью связывания, способностью связывания и/или эффектом связывания на молекулу-мишень.

Термин «антитело» используется в самом широком своем смысле и специфическим образом охватывает, например, одиночные моноклональные антитела к FcRH5 (включая агонистические, антагонистические, нейтрализующие антитела, интактные моноклональные антитела или антитела полной длины), композиции с антителом к FcRH5, обладающие полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела до тех пор, пока они обладают необходимой биологической активностью), образованные, по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные антитела к FcRH5, а также фрагменты антител к FcRH5 (см. ниже), включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, антитела с одним доменом (sdAT) до тех пор, пока они обладают необходимой биологической или иммунологической активностью. В данном тексте термин «иммуноглобулин» (Ig) используется взаимозаменяемым образом с антителом. Антитело может быть представлено человеческим, гуманизированным антителом и/или антителом с созревшей аффинностью.

Термин «антитело к FcRH5» или «антитело, связывающееся с FcRH5» относится к антителу, способному связываться с FcRH5 с достаточной аффинностью, таким образом, указанное антитело может использоваться в качестве диагностического и/или терапевтического агента при связывании с FcRH5. Предпочтительно, чтобы степень связывания антитела к FcRH5 с неродственным и не относящимся к FcRH5 белком составляла менее 10% от показателя связывания антитела с FcRH5, как это измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В определенных вариантах воплощения изобретения антитело, связывающееся с FcRH5, имеет константу диссоциации (K_d), равную ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело к FcRH5 связывается с антигенной детерминантой FcRH5, присутствующей в FcRH5, полученном от различным видов.

«Изолированное антитело» представлено антителом, которое было идентифицировано и выделено и/или восстановлено из компонента в естественной среде. Загрязняющие (примесные) компоненты в естественной среде представляют собой материалы, которые могут помешать терапевтическому использованию антитела, и такие материалы могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах воплощения изобретения антитело будет очищаться (1) до значения более 95% по весу антитела, как это определено по способу Фолина-Чикальтеу, и наиболее преимущественно более чем 99% по весу; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до достижения однородности, определяемой способом электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или серебрянки. Изолированное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, при

этом, по меньшей мере, один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Как правило, изолированное антитело будут получать, по меньшей мере, с одним этапом очистки.

Основная единица 4-цепочечного антитела представлена гетеротетрамерным гликопротеином, состоящим из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело к IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, следовательно, включает 10 участков связывания антигена, в то время как секретируемые антитела к IgA могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, включающих 2-5 основных 4-цепочечных единиц вместе с J-цепью). В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно имеет массу 150000 дальтон. Каждая L-цепь присоединяется к H-цепи одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H-цепи присоединяются друг к другу одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет дисульфидные мостики между цепями, расположенные на одинаковом расстоянии. Каждая H-цепь на своем N-конце имеет переменный домен (V_H), за которым следует три константных домена (C_H) для каждой α и γ цепей, и четыре домена C_H для изоформ μ и ϵ . Каждая L-цепь на своем N-конце имеет переменный домен (V_L), за которым следует константный домен (C_L) на другом конце. V_L расположен относительно V_H и C_L расположен относительно первого константного домена тяжелой цепи (C_{H1}). Отдельные аминокислотные остатки, как считается, образуют границу соприкосновения между переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Комплементарное спаривание V_H и V_L образует один антигенсвязывающий участок. Структура и свойства различных классов антител представлены, например, в *Basic and Clinical Immunology*, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, стр. 71 и Главе 6.

L-цепь, полученная у любого из видов позвоночных, может относиться к одному из двух четко различающихся видов, называемых каппа и лямбда, основываясь на аминокислотных последовательностях их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей (C_H), иммуноглобулины могут относиться к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначаемые как α , β , γ , ϵ и μ , соответственно. Классы γ и α в дальнейшем подразделяются на подклассы на основе относительно небольших различий в последовательности C_H и функциях, например, у человека вырабатываются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин «переменный участок» или «переменный домен» антитела относится к доменам на аминном конце тяжелой или легкой цепи антитела. Переменный домен тяжелой цепи может обозначаться как « V_H ». Переменный домен легкой цепи может обозначаться как « V_L ». Эти домены являются обычно наиболее переменными участками антитела и содержат антигенсвязывающие участки.

Термин «переменный» относится к тому факту, что определенные сегменты переменных доменов существенно различаются в своей последовательности в антителах. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность отдельного антитела к своему отдельному антигену. Однако, переменность вдоль аминокислотной последовательности переменных доменов из 110 остатков

распределена неравномерно. Напротив, участки V включают относительно инвариантные фрагменты, называемые каркасными участками (КУ), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками с сильной вариабельностью, которые называются «гипервариабельными участками» и имеют длину 9-12

5 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей состоят из четырех КУ, приобретающих в большинстве своем β -конфигурацию, и присоединены к трем гипервариабельным участкам, которые образуют петлю, соединяющую и в некоторых случаях образующую часть β -структуры. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости КУ и вместе с
10 гипервариабельными участками другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не участвуют непосредственным образом в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями, такими
15 как участие антитела в возникновении антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

«Интактное» антитело представляет собой антитело, состоящее из антигенсвязывающего участка и C_L , а также, по меньшей мере, константных доменов тяжелой цепи C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Константные домены могут быть представлены
20 константными доменами с нативной последовательностью (*например*, константные домены с нативной последовательностью человека) или вариантом нативной аминокислотной последовательности. Преимущественно, интактное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

В контексте данного изобретения термин «несвязанное антитело» обозначает
25 антитело, которое не конъюгировано с цитотоксической молекулой или радиометкой.

«Фрагменты антитела» включают участок интактного антитела, преимущественно антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры
фрагментов антитела включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv, диатела, линейные
30 антитела (см. патент США No. 5641870, Пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]), молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном варианте воплощения изобретения фрагмент антитела состоит из антигенсвязывающего участка интактного антитела с сохранившейся способностью связывать антиген.

35 Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых «Fab» фрагментами, и остаточного «Fc» фрагмента, обозначение которого отображает легкую способность к кристаллизации. Фрагмент Fab состоит из полной L-цепи вместе с доменом вариабельного участка H-цепи (V_H) и первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab фрагмент
40 моновалентен относительно связывания антигена, т.е. имеет один антигенсвязывающий участок. Расщепление антитела пепсином приводит к образованию одного большого фрагмента $F(ab')_2$, который ориентировочно соответствует дисульфидно присоединенным фрагментам Fab; такой большой фрагмент имеет двухвалентную антигенсвязывающую активность и все еще способен участвовать в перекрестном связывании антигена.
45 Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab по нескольким дополнительным остаткам на карбоксильном конце домена C_{H1} , включая один или несколько остатков цистеина из шарнирного участка антитела. В контексте данного изобретения Fab'-SH обозначает Fab', в котором цистеиновый остаток (-тки) константных доменов несет

несвязанную тиоловую группу. Фрагменты антитела $F(ab')_2$ изначально были получены как пары фрагментов Fab' , имеющие между собой шарнирные остатки цистеина. Также известны и другие химические взаимодействия между фрагментами антитела.

Фрагмент F_c состоит из карбоксильных концов обеих Н-цепей, которые удерживаются вместе дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются по последовательности в участке F_c , и такой участок также является точкой распознавания для рецепторов F_c (F_cR), находящихся на определенных типах клеток.

« F_v » является наименьшим фрагментом антитела, содержащим полный участок распознавания и связывания антигена. Такой фрагмент состоит из димера переменного домена одной легкой и одной тяжелой цепей, находящихся в близкой, нековалентной связи. В одноцепочечных видах F_v (scF_v) один переменный домен тяжелой и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно присоединены с использованием гибкого пептидного линкера, таким образом, тяжелые и легкие цепи могут участвовать в «димерной» структуре, аналогичной таковой структуре двухцепочечных видов F_v . При скручивании таких двух доменов образуется шесть гиперпеременных петель (3 петли для каждой цепи Н и L), что способствует связыванию антигена аминокислотными остатками и придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже одиночный переменный домен (или половина F_v , включая только три CDR, специфичных для антигена) обладает способностью распознавать и связываться с антигеном, но при более низкой аффинности, чем весь участок связывания.

«Одноцепочечные F_v » (или в сокращенном виде « sF_v » или « scF_v ») представляют собой фрагменты антитела, включающие домены антитела V_H и V_L , соединенные в одну полипептидную цепь. Преимущественно, полипептид sF_v будет дополнительно включать полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , что позволит sF_v образовывать необходимую структуру для связывания антигена. Более подробное описание sF_v см. в Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995 (ниже).

Термин «диатела» относится к фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими участками, и такие фрагменты включают переменный домен тяжелой цепи (V_H), присоединенный к переменному домену легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L). Небольшие фрагменты антитела получают путем конструирования фрагментов sF_v (см. предшествующую главу) с короткими линкерами (примерно 5-10 остатков) между доменами V_H и V_L , таким образом, достигается межцепочечное (но не внутрицепочечное) спаривание V доменов, что приводит к образованию двухвалентного фрагмента, т.е. фрагмента с двумя антигенсвязывающими участками. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифичными. Биспецифичные антитела представлены гетеродимерами из двух «криссоверных» фрагментов, в которых домены V_H и V_L двух антител присутствуют в двух разных полипептидных цепях.

Диатела описаны более подробно в EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993). Триатела и тетраатела также описаны в Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Термин «моноклональное антитело» в контексте данного изобретения относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т.е. отдельных антител, составляющих популяцию и являющихся идентичными за исключением возможных и возникающих естественным образом мутаций, которые могут

присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены относительно одного участка антигена. Кроме того, в отличие от композиций с поликлональными антителами, которые включают различные антитела, направленные относительно разных детерминант (эпитопов),
 5 каждое моноклональное антитело направлено относительно одной детерминанты антигена. Кроме своей специфичности, моноклональные антитела обладают преимуществом, т.к. они могут быть синтезированы при отсутствии примесей других антител. Модификатор «моноклональный» не должен толковаться как требующий производства антитела каким-либо отдельным способом. Например, моноклональные
 10 антитела, которые могут использоваться в данном изобретении могут быть получены способом гибридомы, который был впервые описан Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или путем рекомбинации ДНК в клетках бактерий, эукариотов или растений (см., например, патент США No. 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть изолированы из фаговых библиотек с использованием способов, описанных, например,
 15 в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

Описанные здесь моноклональные антитела включают «химерные» антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепей идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных у отдельных видов или принадлежащих отдельному классу или подклассу антител, и участок цепи (-ей)
 20 идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных у других видов или принадлежащих другим классам или подклассам антител, а также фрагменты таких антител, обладающих необходимой биологической активностью (патент США No. 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Описанные здесь химерные антитела включают «приматизированные»
 25 антитела, включающие вариабельный домен антигенсвязывающих последовательностей, полученных у нечеловекообразных приматов (*например*, обезьян Старого света и т.д.), а также участков константных последовательностей человека.

«Гуманизированные» формы антител животных (*например*, грызунов) представлены химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность,
 30 полученную из антитела животных. Для большей части гуманизированные антитела представлены человеческими иммуноглобулинами (антитело-реципиент), в которых остатки гипервариабельных участков реципиента замещены остатком гипервариабельного участка животного (антитела-донора), например, мыши, крысы, кролика или нечеловекообразного примата, при этом сохранена необходимая
 35 специфичность, аффинность и функциональность. В некоторых случаях остатки каркасного участка (КУ) иммуноглобулина человека замещаются соответствующими остатками животных. Более того, гуманизированные антитела могут включать остатки, не присутствующие в антителе-доноре или антителе-реципиенте. Такие модификации осуществляются для усиления действия антитела. В целом, гуманизированное антитело
 40 будет состоять практически полностью из, по меньшей мере, одного, но обычно двух вариабельных доменов, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют иммуноглобулину животных, и все или практически все КУ соответствуют последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело будет включать, по меньшей мере, часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как
 45 правило, иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см. в Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и приведенные ссылки: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris,

Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

В контексте данного изобретения термин «тио» относится к антителу с присоединенным в ходе рекомбинации цистеином, при этом приставка «hu», при ее использовании, относится к гуманизированному антителу.

«Человеческое антитело» представлено антителом, несущим аминокислотную последовательность, которая соответствует таковой последовательности антитела, вырабатываемого человеком и/или используемого в любом из способов для получения человеческих антител в соответствии с представленным здесь описанием. Такое определение человеческого антитела специфическим образом исключает гуманизированное антитело, включающее антигенсвязывающие остатки животного происхождения. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных известных науке способов, включая библиотеки фаговых дисплеев. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Для получения человеческих моноклональных антител также доступны способы, описанные в Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на воздействие антигеном, но при этом эндогенные локусы были приведены в неактивное состояние, например, введение мышам линии Xenomouse (см., например, патенты США No. 6075181 и 6150584 о технологии XENOMOUSETM). См. также, например, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) о человеческих антителах, полученных посредством способа В-клеточной гибридомы человека.

В контексте данного изобретения термин «гипервариабельный участок», «HVR» или «HV» относится к участкам вариабельного домена антитела, который отличается гипервариабельностью последовательности и/или образует структурно определяемую петлю. Как правило, антитела включают шесть гипервариабельных участков: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Количество отображаемых гипервариабельных участков описано в тексте данной заявки. Гипервариабельные участки по Kabat (CDR) основываются на вариабельности последовательности и используются наиболее часто (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Расположение структурных петель определяется по Chothia (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьирует от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это объясняется тем, что схема нумерации по Kabat располагает вставки в H35A и H35B; при отсутствии 35A и 35B, петля заканчивается на 32; в случае присутствия только 35A, петля заканчивается на 33; в случае присутствия 35A и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные участки МАТ представляют собой компромиссное решение между Kabat CDR и структурными петлями Chothia, и используются программным комплексом для моделирования МАТ Oxford Molecular. «Контактные» гипервариабельные участки основываются на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Остатки каждого из таких гипервариабельных участков указаны ниже.

Петля	Kabat	МАТ	Chothia	Контакт
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36

L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34	H30-H35B
(Нумерация по Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерация по Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Гипервариабельные участки могут включать следующие «расширенные гипервариабельные участки»: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL и 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельного домена пронумерованы согласно Kabat *et al.* (все определения представлены выше).

Остатки «каркасного участка» или «КУ» представлены остатками вариабельного домена в отличие от остатков гипервариабельного участка, определенных в тексте данной заявки.

Термин «остаток вариабельного домена, пронумерованного по Kabat» или «нумерация положения аминокислоты по Kabat», а также его вариации относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи при сопоставлении антител и описанной в Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). С использованием такой системы нумерации фактическая линейная последовательность аминокислот может содержать меньше или больше аминокислот, что соответствует укорочению или вставке в КУ или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, 82c и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 КУ тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может проводиться для отдельного антитела путем выравнивания гомологичных участков в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной последовательностью Kabat.

Система нумерации по Kabat обычно используется при указании остатка в вариабельном домене (примерное количество остатков в легкой цепи 1-107 и в тяжелой цепи 1-113) (например, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «индекс EU» обычно используется при указании остатка в константном участке тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU сообщается в Kabat *et al.*, см. выше).

Термин «индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатка человеческого антитела к IgG1. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в вариабельном домене антител обозначают нумерацию остатка по системе нумерации Kabat. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в вариабельном домене антител обозначают нумерацию остатка по системе нумерации EU (например, см. предварительная заявка на патент США No. 60/640323, Фигуры, отображающие нумерацию по EU).

Антитело с «созревшей аффинностью» представлено антителом с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких ГВУ, что приводит к улучшению аффинности антитела по отношению к антигену в сравнении с исходным антителом, не обладающим такими изменениями. Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут иметь показатели аффинности относительно антигена-мишени, измеряемые в наномолях или пикомолях. Антитела с созревшей аффинностью получают с использованием способов, известных науке. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783

(1992) описывает созревание аффинности путем перестановки домена VH и VL. Случайный мутагенез остатков HVR и/или каркасного участка описан в следующих источниках: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

«Блокирующее» антитело или антитело-«антагонист» представлено антителом, ингибирующим или снижающим биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Преимущественные блокирующие антитела или антитела-антагонисты значительно или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

В контексте данного изобретения «антитело-агонист» обозначает антитело, которое имитирует по меньшей мере, одно функциональное свойство интересующего полипептида.

«Видозависимое антитело», например, антитело млекопитающего к IgE человека, представлено антителом, которое имеет большую аффинность связывания с антигеном одного вида млекопитающего в сравнении с гомологом такого антигена другого вида млекопитающего. Как правило, видозависимое антитело «специфически связывается» с антигеном человека (т.е. имеет значение аффинности связывания (K_d) не более чем примерно 1×10^{-7} М, преимущественно не более чем примерно 1×10^{-8} М и наиболее преимущественно не более чем примерно 1×10^{-9} М), но обладает аффинностью связывания с гомологом антигена другого вида животного (млекопитающего), которое, по меньшей мере, примерно в 50 раз, или, по меньшей мере, примерно в 500 раз, или, по меньшей мере, примерно в 1000 раз слабее, чем аффинность связывания с антигеном человека. Видозависимое антитело может быть представлено любым из различных типов антител, как это определено выше, но преимущественно представлено гуманизированным или человеческим антителом.

Термин «аффинность связывания» обычно относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним центром связывания молекулы (например, антитела) и его связующимся партнером (например, антигеном). Если иное не указано, в контексте данного изобретения «аффинность связывания» относится к свойственной антителу аффинности связывания, которое отражает 1:1 взаимодействие между членами связующейся пары (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y может быть обычно представлена по константе диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена с использованием общих и известных науке способов, включая способы, описанные в данной заявке. Антитела с низкой аффинностью обычно связываются с антигеном медленно и легко диссоциируют, в то время как антитела с высокой аффинностью обычно связываются с антигеном более быстро и остаются связанными дольше. В науке известен целый ряд способов измерения аффинности связывания, и любой такой способ может использоваться в целях данного изобретения. Ниже представлены специфические иллюстративные варианты воплощения изобретения.

В контексте данного изобретения термин «или лучше» относится к аффинности связывания, т.е. более сильному связыванию между молекулой и ее связующимся партнером. При использовании в контексте данного изобретения термин «или лучше» относится к более сильному связыванию и отображается меньшим числовым значением K_d . Например, антитело со значением аффинности к антигену «0,6 нМ» или лучше может иметь значение аффинности относительно антигена, равное <0,6 нМ, т.е. 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ и т.д., или любое другое значение менее 0,6 нМ.

В одном варианте воплощения изобретения термин « K_d » или «значение K_d » или « K_d значение» измеряется по анализу связывания радиомеченого антигена (РИА),

выполняемого с версией Fab интересующего антитела и его антигена, как это описано следующим анализом, в ходе которого проводится измерение аффинности связывания в растворе Fab с антигеном путем выравнивания Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серии титраций немеченого антигена с последующим захватом связанного антигена на планшете, покрытом антителом к Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Для установления условий для анализа, пластины микротитратора (Dyplex) покрывают 5 мкг/мл связанного антитела к Fab (Cappel Labs) в 50 mM натрия карбонате (pH 9,6) и оставляют на всю ночь; затем действуют 2% (в/о) альбумином бычьей сыворотки в ФСБ в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (примерно 23°C). При использовании неадсорбирующей пластины (Nunc #269620), 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями интересующего Fab (например, соответствующего для оценки антитела к VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Интересующий Fab затем инкубируют в течение всей ночи, однако инкубация может продолжаться и дольше (например, 65 часов) для обеспечения достижения равновесия. Впоследствии смеси переносят в абсорбирующий планшет для инкубации при комнатной температуре (например, в течение 1 часа). Затем раствор удаляют и пластину промывают восемь раз с использованием 0,1% твина-20 в ФСБ. После того, как пластины высохли, в каждую лунку вносят 150 мкл сцинтилляционной жидкости (MicroScint-20; Packard) и пластины подвергаются анализу с использованием гамма-счетчика Topcount (Packard) в течение 10 минут. Концентрации каждого Fab, которые меньше или равны 20% значения максимального связывания, выбирают для использования в анализах конкурентного связывания.

Согласно другому варианту воплощения изобретения значение K_d измеряют с использованием анализов поверхностного плазмонного резонанса, например, BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единиц ответа (ЕО). Вкратце это можно описать следующим образом: кристаллы биодатчика карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore Inc.) активируют с помощью *N*-этил-*N'*-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорида (EDC) и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят в 10 mM натрия ацетата, pH 4,8, в концентрации 5 мкг/мл (примерно 0,2 мкМ) перед введением при низкой скорости 5 мкл/мин для достижения примерно 10 единиц ответа (ЕО) связанного белка. После введения антигена, для блокирования непрореагировавших групп вводят 1 М этаноламина. Для проведения кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) вводят в ФСБ с 0,05% твина-20 (ФСБТ) при 25°C при скорости потока примерно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) рассчитываются с использованием простой однозначной модели связывания Ленгмюра (программа анализа BIAcore, версия 3.2) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (K_d) рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Если скорость константы ассоциации превышает 106 М⁻¹ с⁻¹, как это определено в ходе анализа поверхностного плазмонного резонанса, такое значение скорости константы ассоциации может быть определено с использованием способа гашения флуоресценции, который измеряет повышение или снижение интенсивность излучения флуоресценции (возбуждение = 295 нм; эмиссия = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C 20 нМ антитела к антигену (форма Fab) в ФСБ, pH 7,2, в присутствии повышающихся концентраций антигена, измеренных спектрометром, например, спектрофотометром с возможностью остановки

потока (Aviv Instruments) или спектрофотометром SLM-Aminco серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемещаемой красной кюветой.

Согласно данному изобретению понятия «скорость ассоциации» или « k_{on} » также могут быть определены с использованием того же самого способа поверхностного плазмонного резонанса, который описан выше, с использованием BIAcoreTM-2000 или BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Фраза «практически подобен» или «практически такой же» в контексте данного изобретения обозначает достаточно высокую степень подобия между двумя числовыми значениями (одно обычно связано с антителом по изобретению, а другое - с эталонным антителом/антителом сравнения), таким образом, специалист в данной области сможет увидеть разницу между двумя значениями, имеющую незначительную или не имеющую биологическую и/или статистическую значимость в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значениями K_d).

Разница между двумя указанными значениями составляет предпочтительно менее чем примерно 50%, менее чем примерно 40%, менее чем примерно 30%, менее чем примерно 20%, менее чем примерно 10% как функция от значения эталонного антитела/антитела сравнения.

Фраза «существенно снижен» или «существенно различающийся» в контексте данного изобретения обозначает достаточно высокую степень подобия между двумя числовыми значениями (одно обычно связано с антителом по изобретению, а другое - с эталонным антителом/антителом сравнения), таким образом, специалист в данной области сможет увидеть разницу между двумя значениями, имеющую статистическую значимость в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значениями K_d , ответом НАМА). Разница между двумя указанными значениями составляет предпочтительно более чем примерно 10%, более чем примерно 20%, более чем примерно 30%, более чем примерно 40%, более чем примерно 50% как функция от значения эталонного антитела/антитела сравнения.

Понятие «антиген» обозначает предварительно определенный антиген, с которым связывается антитело избирательным образом. Антиген-мишень может быть представлен полипептидом, углеводом, нуклеиновой кислотой, липидом, гаптеном или другим встречающимся в природе или синтетическим соединением. Преимущественно, антиген-мишень представлен полипептидом.

В контексте данного изобретения «акцепторный каркасный участок человека» представляет собой каркасный участок, состоящий из аминокислотной последовательности каркасного участка VL или VH, полученного из каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасного участка человека. Акцепторный каркасный участок человека, «полученный из» каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасного участка человека может включать ту же аминокислотную последовательность или может содержать существующие ранее изменения в аминокислотной последовательности. В случае присутствия существующих ранее изменений в аминокислотной последовательности, отмечается преимущественно не более чем 5, не более чем 4 или менее, или 3 или менее существующих ранее изменений в аминокислотной последовательности. В случае присутствия существующих ранее изменений в аминокислотной последовательности в VH, такие изменения преимущественно отмечаются только в трех, двух или одном положении 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в таких положениях могут быть представлены 71A, 73T и/или

78А. В одном варианте воплощения изобретения акцепторный каркасный участок человека VL по своей последовательности идентичен последовательности каркасного участка VL иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасного участка человека.

5 «Консенсусная последовательность каркасного участка человека» представляет собой каркасный участок, содержащий наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе последовательностей каркасных участков VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляется из подгруппы последовательностей
10 вариабельных доменов. Обычно подгруппа последовательностей представлена подгруппой согласно Kabat *et al.* В одном варианте воплощения изобретения для VL подгруппа представлена подгруппой каппа I (согласно Kabat *et al.*). В одном варианте воплощения изобретения для VH подгруппа представлена подгруппой III (согласно Kabat *et al.*).

15 «Консенсусная последовательность подгруппы III VH» включает консенсусную последовательность, полученную из последовательностей аминокислот в подгруппе III вариабельного домена тяжелой цепи (согласно Kabat *et al.*). В одном варианте воплощения изобретения консенсусная аминокислотная последовательность подгруппы III VH включает, по меньшей мере, участок или полные следующие последовательности:
20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 49)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 50)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 51)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52).

«Консенсусная последовательность подгруппы I VL» включает консенсусную последовательность, полученную из последовательностей аминокислот в подгруппе
25 каппа I вариабельного домена легкой цепи (согласно Kabat *et al.*). В одном варианте воплощения изобретения консенсусная аминокислотная последовательность подгруппы I VL включает, по меньшей мере, участок или полные следующие последовательности: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 45)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 46)-L2-GVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 47)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 48).
30

«Немодифицированный каркасный участок человека» представляет собой каркасный участок, который имеет такую же аминокислотную последовательность, что и акцепторный каркасный участок человека, *например*, за исключением аминокислотных замен (человеческих на животных) в акцепторном каркасном участке человека.

35 «Измененный гипервариабельный участок» в контексте данного изобретения представляет собой гипервариабельный участок, состоящий из одной или нескольких (например, одной до примерно 16) замен аминокислот.

«Немодифицированный гипервариабельный участок» в контексте данного изобретения представляет собой гипервариабельный участок, имеющий такую же самую
40 аминокислотную последовательность, что и антитело животного, из которого такой участок был получен, *т.е.* за исключением одной или нескольких замен аминокислот.

Антитело, «связывающее» интересующий антиген, например, антиген-мишень опухолеассоциированного полипептида, представлено антителом, связывающим антиген с достаточной аффинностью, и такое антитело может использоваться в качестве
45 терапевтического агента в поражении клетки или ткани, экспрессирующей антиген, без значительной перекрестной реакции с другими белками. В таких вариантах воплощения изобретения степень связывания антитела с «нецелевым» белком будет составлять менее чем примерно 10% от связывания антитела с его белком-мишенью, как это определено

путем анализа флуоресцентной сортировки клеток (FACS) или радиоиммунопреципитацией. Относительно связывания антитела с молекулой-мишенью, термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с» или «специфично относительно» отдельного полипептида или антигенной детерминанты на отдельном полипептиде-мишени обозначает связывание, которое соизмеримо различается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения связывания молекулы в сравнении со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представлена молекулой с подобной структурой, но не обладающей активностью связывания. Например, специфическое связывание может быть определено путем конкурентного взаимодействия с контрольной молекулой, похожей на мишень, например, избыточным количеством немеченой мишени. В таком случае специфического связывания показано, что связывание меченой мишени с зондом конкурентным образом ингибируется избытком немеченой мишени. В контексте данного изобретения термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с» или «специфично относительно» отдельного полипептида или антигенной детерминанты отдельного полипептида-мишени может выражаться, например, молекулой со значением K_d для мишени примерно, по меньшей мере, 10^{-4} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-5} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-6} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-7} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-8} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-9} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-10} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-11} М, примерно, по меньшей мере, 10^{-12} М или более. В одном варианте воплощения изобретения термин «специфическое связывание» относится к связыванию, когда молекула связывается с отдельным полипептидом или антигенной детерминантой отдельного полипептида без существенного связывания с каким-либо другим полипептидом или антигенной детерминантой полипептида.

Антитело, которое «ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих полипептид FcRH5» или «ингибирующее рост» антитело представлено антителом, приводящем к соизмеримому ингибированию роста раковых клеток, обладающих экспрессией или гиперэкспрессией соответствующего полипептида FcRH5. Полипептид FcRH5 может быть представлен трансмембранным полипептидом, экспрессируемым на поверхности раковой клетки, или полипептидом, продуцируемым и секретируемым раковой клеткой. Преимущественно ингибирующее рост антитело к FcRH5 ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих FcRH5, более чем на 20%, преимущественно от примерно 20% до примерно 50%, и даже более преимущественно более чем на 50% (например, от примерно 50% до примерно 100%) в сравнении с соответствующим контролем, который обычно представлен опухолевыми клетками, не подвергнутыми воздействию исследуемым антителом. В одном варианте воплощения изобретения ингибирование роста может быть измерено при концентрации антитела от примерно 0,1 до 30 мкг/мл или от примерно 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, при этом ингибирование роста определяется спустя 1-10 дней после воздействия антителом на опухолевые клетки. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* может быть определено различными способами, например, такими, которые описаны в экспериментальных Примерах ниже. Антитело ингибирует рост в условиях *in vivo*, если введение антитела к FcRH5 в концентрации примерно 1 мкг/кг до примерно 100 мкг/кг массы тела приводит к снижению размера опухоли или пролиферации опухолевых клеток в течение периода от примерно 5 дней до 3 месяцев с момента первого введения антитела, преимущественно в течение примерно 5-30 дней.

Антитело, «индуцирующее апоптоз», представлено антителом, которое индуцирует программируемую гибель клеток, как это определено по связыванию аннексина V, фрагментации ДНК, уменьшению клетки, растяжению эндоплазматического ретикулула, фрагментации клетки и/или образованию мембранных везикул (называемых апоптозными тельцами). Клетка обычно представлена клеткой, избыточно экспрессирующей полипептид FcRH5. Преимущественно клетка представлена опухолевой клеткой, например, гематопоэтической клеткой, такой как В-клетка, Т-клетка, базофил, эозинофил, нейтрофил, моноцит, тромбоцит или эритроцит. Для оценки клеточных явлений, ассоциированных с апоптозом, существует целый ряд способов. Например, транслокация фосфатидилсерина (ФС) может быть измерена по связыванию аннексина; фрагментация ДНК может быть измерена по электрофоретическому расщеплению ДНК; ядерная/хроматиновая конденсация вместе с фрагментацией ДНК может быть оценена путем любого повышения количества гиподиплоидных клеток.

Преимущественно антитело, индуцирующее апоптоз, представлено антителом, приводящим к примерно 2-50-кратной, преимущественно примерно 5-50-кратной, но более преимущественно 10-50-кратной индукции связывания аннексина в сравнении с неподвергнутой воздействию антителом клетки в ходе анализа связывания аннексина.

Антитело, «индуцирующее гибель клетки», представлено антителом, приводящим жизнеспособную клетку к нежизнеспособности. Клетка представлена клеткой, экспрессирующей полипептид FcRH5 и принадлежащей к типу клеток, характеризующихся специфической экспрессией или гиперэкспрессией полипептида FcRH5. Клетка может быть представлена раковой или здоровой клеткой отдельного типа клеток. Полипептид FcRH5 может быть представлен трансмембранным полипептидом, экспрессируемым на поверхности раковой клетки, или полипептидом, продуцируемым и секретируемым раковой клеткой. Клетка может быть представлена раковой клеткой, например, В-клеткой или Т-клеткой. Гибель клетки *in vitro* может быть определена в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток, что позволит отличить гибель клетки, вызванную антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ) или комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ). Таким образом, анализ гибели клетки может проводиться с использованием инактивированной нагреванием сыворотки (т.е. в отсутствие комплемента) и в отсутствие иммунных эффекторных клеток. Для определения способности антитела индуцировать гибель клетки, потеря целостности мембраны, устанавливаемая по поглощению пропидиума йодида (ПИ), трипанового синего (см. Moore et al. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) или 7AAD, может оцениваться в сравнении с не подвергнутыми воздействию клетками. Преимущественно опосредуемые гибель клеток антитела представлены антителами, индуцирующими захват ПИ в ходе анализа захвата ПИ клетками BT474.

«Эффекторные функции» антитела относятся к биологической активности, свойственной участку Fc (нативной последовательности участка Fc или вариантной аминокислотной последовательности участка Fc) антитела, и варьируют для каждого изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают следующее: связывание C1q и комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание рецептора Fc; антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; понижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки); активация В-клетки.

В контексте данного изобретения термин «участок Fc» относится для определения С-терминального конца тяжелой цепи иммуноглобулина, включая нативную

последовательность участков Fc и вариантные участки Fc. Несмотря на то, что границы участка Fc в тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, участок Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяют от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до карбоксильного конца. С-терминальный лизин (остаток 447 согласно системы нумерации EU) участка Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или в ходе рекомбинации нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. В соответствии с этим, композиция с интактными антителами может включать популяции антител со всеми удаленными остатками K447, популяции антител с присутствием остатков K447, и популяции антител со смесью антител с/без остатков K447.

«Функциональный участок Fc» несет «эффекторную функцию» нативной последовательности участка Fc. Типичные «эффекторные функции» включают связывание C1q, связывание рецептора Fc, АЗКЦ, фагоцитоз, снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток, BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно подразумевают, чтобы участок Fc был скомбинирован со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела) и мог анализироваться с использованием различных описанных анализов, например, представленных в определениях.

«Нативная последовательность участка Fc» включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности участка Fc, встречаемого в природе. Участки Fc с нативной последовательностью человека включают участок Fc с нативной последовательностью IgG1 человека (аллотипы А и другие аллотипы), участок Fc с нативной последовательностью IgG2 человека, участок Fc с нативной последовательностью IgG3 человека, участок Fc с нативной последовательностью IgG4 человека, а также все встречающиеся в природе варианты.

«Вариантный участок Fc» включает аминокислотную последовательность, отличающуюся от нативной последовательности участка Fc по меньшей мере модификацией одной аминокислоты, преимущественно одной или несколькими заменами аминокислот. Преимущественно вариантный Fc участок имеет, по меньшей мере, одну замену аминокислоты в сравнении с нативной последовательностью участка Fc или участка Fc исходного полипептида, например, вариантный участок Fc имеет от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и преимущественно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности участка Fc или участка Fc исходного полипептида. Вариантный участок Fc будет преимущественно обладать, по меньшей мере, примерно 80% гомологичностью относительно участка Fc с нативной последовательностью и/или участка Fc исходного полипептида, и преимущественно, по меньшей мере, примерно 90% гомологичностью, но более преимущественно, по меньшей мере, примерно 95% гомологичностью.

«Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный рецепторами Fc (FcR), присутствующими на определенных цитотоксичных клетках (например, клетках-естественных киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), позволяет таким цитотоксичным клеткам-эффекторам специфически связываться с несущей антиген клеткой-мишенью с последующей гибелью клетки-мишени с помощью цитотоксинов. Антитела «захватывают» цитотоксические клетки и являются абсолютно необходимыми для такой гибели клеток. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ - NK-клетки - экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопозитивных клетках обобщена в Таблице

3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ молекулы может проводиться анализ АЗКЦ *in vitro*, например, анализ, описанный в патенте США No. 5500362 или 5821337. Полезные для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (НК-клетки). С другой стороны (или кроме того), активность АЗКЦ указанных молекул может быть оценена *in vivo*, например, с использованием животной модели, описанной Clynes et al., (USA) 95:652-656 (1998).

Термины «рецептор Fc» или «FcR» описывают рецептор, связывающийся с участком Fc антитела. Преимущественно, FcR представлен человеческим FcR с нативной последовательностью. Кроме того, преимущественный FcR представлен рецептором, связывающимся с антителом к IgG (гамма-рецептором), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и иные сплайс-формы таких рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно по своему цитоплазматическому домену. Цитоплазматический домен активирующего рецептора FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Цитоплазматический домен ингибирующего рецептора FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM). (См. M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR анализируются в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая рецепторы, которые будут идентифицированы в будущем, также включены в термин «FcR» в контексте данного изобретения. Термин также включает неонатальный рецептор FcRn, ответственный за перенос IgG от матери к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и период полужизни FcRn полипептидов с высокой аффинностью в сыворотке может быть проанализировано, например, с использованием трансгенных мышей или трансфицированных линий клеток человека, экспрессирующих человеческий FcRn, или с использованием приматов, которым были введены полипептиды с вариантным участком Fc. WO 2000/42072 (Presta) описывает варианты антитела с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

«Эффекторные клетки» представлены лейкоцитами, экспрессирующими один или несколько FcR и выполняющими эффекторные функции. Преимущественно, клетки экспрессируют по меньшей мере, FcγRII и выполняют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют КЗЦ, включают моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (НК-клетки), моноциты, цитотоксичные Т-клетки и нейтрофилы, при этом предпочтение отдается МКПК и НК-клеткам. Эффекторные клетки могут быть изолированы из нативного источника, например, из крови.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» или «КЗЦ» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), связанными с соответствующим когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может выполняться анализ КЗЦ, например, описанный в Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163. Вариантные полипептиды с измененными последовательностями аминокислот участка Fc (полипептиды с

вариантным участком Fc) и повышенной или пониженной способностью связываться с C1q описаны, *например*, в патенте США No. 6194551 B1 и WO 1999/51642. См. также, *например*, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Термин «антитело, включающее участок Fc» относится к антителу, включающему участок Fc. С-терминальный лизин (остаток 447 согласно системы нумерации EU) участка Fc может быть удален, например, во время очистки антитела, или в ходе рекомбинации нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Согласно этому, композиция, состоящая из антитела с участком Fc данного изобретения может включать антитело с K447, удаленными K447 или смеси антител с/без остатка K447.

«Внеклеточный домен» полипептида FcRH5 или «ВКД» относится к форме полипептида FcRH5, которая практически не содержит несвязанных трансмембранных и цитоплазматических доменов. Как правило, ВКД полипептида FcRH5 будет иметь менее чем 1% таких трансмембранных и/или цитоплазматических доменов и преимущественно будет иметь менее 0,5% таких доменов. Следует иметь в виду, что любые трансмембранные домены, идентифицированные для полипептидов FcRH5 данного изобретения, определены согласно критериям, которые были установлены в науке для определения подобного домена гидрофобного типа. Точные границы трансмембранного домена могут варьировать, но в большинстве случаев они составляют не более чем примерно 5 аминокислот на любом конце домена. В некоторых случаях внеклеточный домен полипептида FcRH5 может включать от примерно 5 или менее аминокислот на каждом конце границы трансмембранного домена/внеклеточного домена, как это определено в Примерах или способах, и такие полипептиды с/без связанного с ними сигнального пептида, и кодирующие их нуклеиновые кислоты, предусматриваются в данном изобретении.

Приблизительное расположение «сигнальных пептидов» описанного здесь полипептида FcRH5 приводится в данной заявке на изобретение и/или сопроводительных фигурах. Однако следует отметить, что С-терминальная граница сигнального пептида может варьировать, наиболее вероятно не более чем на 5 аминокислот с каждой стороны С-терминальной границы сигнального пептида, как уже было определено здесь, при этом С-терминальная граница сигнального пептида может быть идентифицирована с соблюдением критериев, установленных в науке для идентификации подобного типа элемента аминокислотной последовательности (например, Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.* 10: 1-6 (1997) и von Heinje *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Более того, считается также, что в некоторых случаях расщепление сигнальной последовательности секретируемого полипептида не целиком однородное, что приводит к секреции более одного вида. Такие зрелые полипептиды, в которых сигнальный пептид расщепляется в пределах не более 5 аминокислот с каждой стороны С-терминальной границы сигнального пептида (согласно приведенному здесь определению), и кодирующие их полинуклеотиды описаны в данном изобретении.

Термин «полипептидный вариант FcRH5» обозначает полипептид FcRH5, преимущественно активный полипептид FcRH5, как это определено в тексте данной заявки, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичность аминокислотной последовательности относительно полипептида FcRH5 полной длины с нативной последовательностью; последовательность полипептида FcRH5 не включает сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию), внеклеточный домен полипептида FcRH5, включает /не включает сигнальный пептид или другой фрагмент последовательности полипептида FcRH5 полной длины (согласно представленному здесь описанию) (например, вариант, кодируемый нуклеиновой кислотой,

представляющей только участок полной кодирующей последовательности полипептида FcRH5 полной длины). Такие варианты полипептида FcRH5 включают, например, полипептиды FcRH5, в которых добавлено или удалено один или несколько аминокислотных остатков на N- или C-конце нативной аминокислотной

5 последовательности полной длины. Как правило, вариант полипептида FcRH5 будет обладать идентичностью аминокислотной последовательности, составляющей, по меньшей мере, 80%, или в других случаях, по меньшей мере, примерно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в сравнении с нативной последовательностью полипептида FcRH5 полной длины (как
10 это описано в тексте данной заявки), при этом последовательность полипептида FcRH5 не будет включать сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию), внеклеточный домен полипептида FcRH5, включать или не включать сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию) или другой специфическим образом определяемый фрагмент последовательности полипептида FcRH5 полной длины
15 (согласно представленному здесь описанию). Как правило, варианты полипептида FcRH5 включают, по меньшей мере, 10 аминокислот, в других случаях, по меньшей мере, примерно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570,
20 580, 590, 600 аминокислот или более. В некоторых случаях, варианты полипептида FcRH5 будут иметь не более чем одну замену консервативной аминокислоты в сравнении с нативной последовательностью полипептида FcRH5, в других случаях не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен консервативных аминокислот в сравнении с нативной последовательностью полипептида FcRH5.

25 «Процентный показатель (%) идентичности аминокислотной последовательности» относительно пептидной или полипептидной последовательности, т.е. определенных здесь последовательностей полипептида FcRH5, определяется как процентный показатель остатков аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны остаткам аминокислот в специфической пептидной или полипептидной
30 последовательности, т.е. последовательности полипептида FcRH5, что определяется после выравнивания последовательностей и введения пропусков, в случае такой необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности без учета любых замен консервативных аминокислот как часть идентичности последовательности. Выравнивание для определения процентного
35 показателя идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными путями, известными науке, например, с использованием представленного на рынке программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области сможет определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые
40 для достижения максимального выравнивания по всей длине сопоставляемых последовательностей. В целях данного изобретения, значения % идентичности аминокислотной последовательности получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2, при этом полный исходный код для программы ALIGN-2 приводится в Таблице 1 ниже. Компьютерная программа
45 для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана компанией Genentech, Inc., а исходный код представлен в Таблице 1 ниже; данный код был предоставлен вместе с руководством пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Washington D.C., 20559, где была выдана регистрация авторского права США под

№TXU510087. Программа ALIGN-2 доступна для широкой публики и предоставляется компанией Genentech, Inc., Южное Сан-Франциско, шт. Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода, представленного в Таблице 1 ниже. Программа ALIGN-2 для своего использования должна быть скомпилирована в операционной системе UNIX, предпочтительно UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательности устанавливаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда программа ALIGN-2 используется для сравнения последовательностей аминокислот, % идентичности аминокислотной последовательности для отдельной аминокислотной последовательности A относительно заданной аминокислотной последовательности B (или другими словами: заданная аминокислотная последовательность A, включающая определенный % идентичности в сравнении с заданной аминокислотной последовательностью B) рассчитывается следующим образом:

в 100 раз меньше X/Y ,

где X является числом аминокислотных остатков, указанных как идентичные соответствия, определенные программой сопоставления последовательностей A и B ALIGN-2; Y - общее число аминокислотных остатков в последовательности B. Следует иметь в виду, что длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, и % идентичности аминокислотных последовательностей A и B не будет равно % идентичности аминокислотной последовательности B в сравнении с A.

Термин «вариант полинуклеотида FcRH5» или «вариант последовательности нуклеиновой кислоты FcRH5» обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид FcRH5, преимущественно активный полипептид FcRH5, как это определено в данной заявке, и имеющий, по меньшей мере, примерно 80% идентичность последовательности нуклеиновой кислоты в сравнении с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей нативную последовательность FcRH5 полной длины (согласно представленному здесь описанию), при этом последовательность полипептида FcRH5 полной длины не включает сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию), внеклеточный домен полипептида FcRH5, включает /не включает сигнальный пептид или любой другой фрагмент последовательности полипептида FcRH5 полной длины (согласно представленному здесь описанию) (например, вариант, кодируемый нуклеиновой кислотой, представляющей только участок полной кодирующей последовательности полипептида FcRH5 полной длины). Как правило, вариант полинуклеотида FcRH5 будет обладать идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты, составляющей, по меньшей мере, 80%, или в других случаях, по меньшей мере, примерно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в сравнении с нативной последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующих нативную полипептидную последовательность FcRH5 полной длины (как это описано в тексте данной заявки), при этом нативная последовательность полипептида FcRH5 полной длины не будет включать сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию), внеклеточный домен полипептида FcRH5, включать или не включать сигнальный пептид (согласно представленному здесь описанию) или другой специфическим образом определяемый фрагмент последовательности полипептида FcRH5 полной длины (согласно представленному здесь описанию). Варианты не включают нативную нуклеотидную последовательность.

Как правило, варианты полинуклеотидов FcRH5 включают, по меньшей мере, примерно 5 нуклеотидов, в других случаях, по меньшей мере, примерно 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290 или 1300 нуклеотидов, при этом в данном контексте термин «примерно» обозначает эталонную нуклеотидную последовательность плюс-минус 10% от длины такой последовательности.

«Процентный показатель (%) идентичности последовательности нуклеиновой кислоты» применительно к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующих FcRH5, определяется как процентный показатель нуклеотидов в кандидатной последовательности, идентичных нуклеотидам в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей FcRH5, и такой процентный показатель определяется после выравнивания последовательностей и включения пропусков, в случае такой необходимости, для достижения максимального процентного показателя идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процентного показателя идентичности последовательности нуклеиновых кислот может быть достигнуто различными путями, известными науке, например, с использованием представленного на рынке программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). В целях данного изобретения, значения % идентичности последовательности нуклеиновых кислот получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2, при этом полный исходный код для программы ALIGN-2 приводится в Таблице 1 ниже. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана компанией Genentech, Inc., а исходный код представлен в Таблице 1 ниже; данный код был предоставлен вместе с руководством пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Washington D.C., 20559, где была выдана регистрация авторского права США под №TXU510087. Программа ALIGN-2 доступна для широкой публики и предоставляется компанией Genentech, Inc., Южное Сан-Франциско, шт. Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода, представленного в Таблице 1 ниже. Программа ALIGN-2 для своего использования должна быть скомпилирована в операционной системе UNIX, предпочтительно UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательности устанавливаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда программа ALIGN-2 используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, % идентичности последовательности нуклеиновых кислот для отдельной последовательности нуклеиновых кислот А относительно заданной последовательности нуклеиновых кислот В (или другими словами: заданная последовательность нуклеиновых кислот А, включающая определенный % идентичности в сравнении с заданной последовательностью нуклеиновых кислот В) рассчитывается следующим образом:

в 100 раз меньше W/Z ,
 где W является числом нуклеотидов, указанных как идентичные соответствия, определенные программой сопоставления последовательностей C и D ALIGN-2; Z - общее число нуклеотидов в последовательности D. Следует иметь ввиду, что длина последовательности нуклеиновой кислоты C не равна длине последовательности

нуклеиновой кислоты D, и % идентичности последовательностей нуклеиновых кислот C и D не будет равен % идентичности последовательности нуклеиновой кислоты D в сравнении с C. Если не указано иное, все значения % идентичности указанных здесь последовательностей нуклеиновых кислот получены в соответствии с описанием, приведенным в предшествующем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

В других вариантах воплощения изобретения варианты полинуклеотидов FcRH5 представлены молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид FcRH5, и такие молекулы способны гибридизироваться, преимущественно при строгих условиях гибридизации и промывания, в нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид FcRH5 полной длины. Варианты полинуклеотидов FcRH5 могут кодироваться вариантом полинуклеотида FcRH5.

Термин «кодирующий участок полной длины» при использовании относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид FcRH5, относится к последовательности нуклеотидов, кодирующей полипептид FcRH5 полной длины (на прилагаемых фигурах указывается как участок между старт- и стоп-кодонами включительно). Термин «кодирующий участок полной длины» при использовании относительно АЗКЦ депонированных нуклеиновых кислот относится к участку кДНК, кодирующему полипептид FcRH5, который вставлен в вектор, обуславливающий АЗКЦ (на прилагаемых фигурах указывается как участок между старт- и стоп-кодонами включительно (старт- и стоп-кодона на фигурах указаны жирным подчеркнутым шрифтом)).

При использовании для описания различных представленных здесь полипептидов, термин «изолированный» обозначает полипептид, который был идентифицирован и выделен и/или восстановлен из компонента природной среды. Загрязняющие (примесные) компоненты в естественной среде представляют собой материалы, которые могут помешать терапевтическому использованию полипептида, и такие материалы могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. В преимущественных вариантах воплощения изобретения полипептид будут очищать (1) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков на N-конце или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом; или (2) до достижения однородности, определяемой способом электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, преимущественно, серебранки. Изолированный полипептид включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, при этом, по меньшей мере, один компонент естественной среды полипептида FcRH5 будет отсутствовать. Как правило, изолированный полипептид будут получать, по меньшей мере, с одним этапом очистки.

«Изолированная» нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид FcRH5, или другая нуклеиновая кислота, кодирующая другой полипептид, представлена молекулой нуклеиновой кислоты, которая была идентифицирована и выделена из, по меньшей мере, одной молекулы-загрязнителя нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Молекула изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, представлена в другой форме или условиях, в сравнении с формой и условиями, в которых она встречается в естественной среде. Таким образом, молекулы изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, отличаются от молекул изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид и находящейся в естественных клетках. Однако,

молекула изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, включает молекулы изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, которые содержатся в клетках, обычно экспрессирующих полипептид, при этом, например, молекула нуклеиновой кислоты отличается от своего положения в хромосоме в

5 сравнении с естественными клетками.

Термин «контрольные последовательности» относится к ДНК последовательностям, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в отдельном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, включают, например, промотор, в некоторых случаях

10 последовательности оператора, а также место связывания рибосомы. Как известно, эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота «функционально связана» в том случае, если она находится в функциональной взаимосвязи с последовательностью другой нуклеиновой кислоты.

15 Например, ДНК для предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, в том случае, если такая ДНК секретируется в качестве белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; центр

20 связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, термин «функционально связанный» обозначает, что взаимосвязанные последовательности ДНК находятся в непосредственной близости и, в случае секреторного лидера, находятся рядом и в фазе считывания. Однако необязательно, чтобы энхансеры находились

25 поблизости друг от друга. Связывание сопровождается лигированием в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, при соблюдении стандартных процедур используются синтезированные олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

«Строгость» реакции гибридизации легко определяется специалистом в данной области, и обычно такое определение состоит в эмпирическом вычислении, в зависимости

30 от длины зонда, температуры промывания и концентрации соли. В целом, более длинные зонды требуют повышенных температур для надлежащей гибридизации, в то время как более короткие зонды требуют более низких температур. Как правило, гибридизация зависит от способности денатурированной ДНК подвергаться повторной гибридизации в присутствии комплементарных тяжей в среде при температуре ниже температуры

35 плавления. Чем выше степень требуемой гомологичности между зондом и подвергаемой гибридизации последовательности, тем выше относительная температура, которая может использоваться. В результате следует, что более высокие значения относительной температуры будут определять более жесткие условия реакции, чем более низкие значения температуры. Дополнительная информация и пояснение строгости реакций

40 гибридизации приводится в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

В контексте данного изобретения «строгие условия» или «условия повышенной строгости» могут определяться следующим образом: (1) использование низкого значения ионной силы и высокой температуры для промывания, например, 0,015 М натрия

45 хлорида/0,0015 М натрия цитрата/0,1% натрия додецил сульфата при 50 ЭК; (2) использование во время гибридизации денатурирующего агента, такого как формамида, например, 50% (о/о) формамида с 0,1% бычьим сывороточным альбумином/0,1% Фиколл/0,1% поливинилпирролидона/50 мМ буфера натрия фосфата при pH 6,5 с 750

мМ натрия хлорида, 75 мМ натрия цитрата при 42 ЭК; или (3) гибридизация в течение всей ночи в растворе, который включает 50% формамид, 5×SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М натрия цитрат), 50 мМ натрия фосфат (pH 6,8), 0,1% натрия пирогосфат, 5× раствор Денхардта, ДНК спермы лососевых, подвергнутую воздействию ультразвуком (50 мг/мл), 0,1% НДС и 10% сульфата декстрана при 42 ЭК с 10-минутным промыванием при 42 ЭК в 0,2× SSC (натрия хлорид/натрия цитрат) с последующим 10-минутным промыванием при строгих условиях в присутствии 0,1×SSC и ЭДТА при 55 ЭК.

«Умеренно строгие условия» могут включать условия, описанные в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, и предусматривать использование раствора для промывания и условий гибридизации (например, температура, ионная сила и % НДС), являющихся менее строгими, чем описанные выше. Пример умеренно строгих условий представлен инкубацией в течение ночи при 37 ЭК в растворе, содержащем следующее: 20% формамид, 5×SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрия цитрат), 50 мМ натрия фосфат (pH 7,6), 5× раствор Денхардта, 10% декстрана сульфат и 20 мг/мл денатурированной ДНК спермы лососевых с последующим промыванием фильтров в 1×SSC при примерно 37-50 ЭК. Специалист в данной области сможет корректировать температуру, ионную силу и т.д. в соответствии с необходимостью настройки таких факторов, как длина зонда и т.д.

При использовании в контексте данного изобретения, термин «меченный антигенной детерминантой» относится к химерному полипептиду, состоящему из полипептида FcRH5, или антителу к FcRH5, слитому с «полипептидом-тэгом». Полипептид-тэг имеет достаточно остатков для образования антигенной детерминанты антитела, но такой полипептид достаточно короткий, поэтому не оказывает влияния на активность полипептида, с которым он слит. Кроме того, полипептид-тэг преимущественно является довольно уникальным, поэтому антитело не участвует в перекрестной реакции с другими антигенными детерминантами. Подходящие полипептиды-тэги, как правило, имеют, по меньшей мере, шесть аминокислотных остатков, но обычно примерно от 8 до 50 аминокислотных остатков (преимущественно примерно от 10 до 20 аминокислотных остатков).

В контексте данного изобретения термин «активный» или «активность» относится к форме (-ам) полипептида FcRH5, сохраняющего биологическую и/или иммунологическую активность нативного или встречающегося в природе FcRH5, при этом «биологическая» активность относится к биологической функции (ингибированию или стимуляции), оказываемой нативным или встречающимся в природе FcRH5, за исключением возможности индуцировать выработку антитела к антигенной детерминанте, которой обладает нативный или встречающийся в природе FcRH5; «иммунологическая» активность относится к способности индуцировать выработку антитела к антигенной детерминанте, которой обладает нативный или встречающийся в природе FcRH5.

Термин «антагонист» используется в самом широком своем смысле и включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида FcRH5. Подобным образом, термин «агонист» используется в самом широком своем смысле и включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида FcRH5. Подходящие молекулы агонистов или антагонистов специфическим образом включают агонистические или антагонистические антитела или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативных полипептидов FcRH5, пептиды, бессмысловые олигонуклеотиды, небольшие органические молекулы

и т.д. Способы идентификации агонистов или антагонистов полипептида FcRH5 могут включать контакт полипептида FcRH5 с кандидатной молекулой агониста или антагониста с последующим измерением определяемого изменения в одной или нескольких показателях биологической активности, которая обычно свойственна полипептиду FcRH5.

Термин «очищенный» обозначает, что молекула присутствует в образце в концентрации, по меньшей мере, 95% по весу, или, по меньшей мере, 98% по весу образца, в котором она содержится.

«Изолированная (выделенная)» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая сепарирована, по меньшей мере, из одной другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана, например, в естественной среде. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно включать молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержится в клетках, экспрессирующих молекулу нуклеиновой кислоты, но такая молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосом или в хромосомах, но их расположение в хромосомах отличается от своего естественного расположения.

В контексте данного изобретения термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представлен «плазмидой», т.е. кольцевой двухцепочечной петлей ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представлен фаговым вектором. Еще один тип вектора представлен вирусным вектором, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы в клетке-хозяине, в которую они введены, способны автономно реплицироваться (например, векторы бактерий с бактериальным происхождением репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть встроены в геном клетки-хозяина путем введения в клетку-хозяина, и такие векторы могут реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны регулировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы указаны в данной заявке как «рекомбинантные векторы экспрессии» (или просто «рекомбинантные векторы»). В целом, векторы экспрессии для использования в процедурах рекомбинации ДНК часто представлены в форме плазмид. В контексте данного изобретения термины «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемым образом, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются здесь взаимозаменяемым образом и относятся к полимерам нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть представлены дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами, или любым субстратом, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или в ходе реакции синтеза. Полинуклеотид может состоять из модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и их аналоги. В случае наличия структурной модификации нуклеотида, такая модификация может быть произведена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после синтеза, например, конъюгацией с меткой. Другие типы модификации включают, например, «кэпы», замены одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов соответствующим аналогом, нуклеотидные модификации, такие как,

например, лишённые заряда связи (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и связи с определённым зарядом (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), которые включают боковые цепи, такие как, например, цепи белков (например, нуклеазы, токсина, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), интеркаляторов (например, акридин, псорален и т.д.), хелатных веществ (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.д.), алкилирующих веществ, модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, может быть замещена любая гидроксильная группа, которая обычно присутствует в сахарах, например, группами фосфоната, фосфата, с использованием защиты стандартными защитными группами или активированными для образования дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или такие гидроксильные группы могут быть конъюгированы с твердым или полутвердым субстратом. Группа ОН на 5'- и 3'-конце может быть фосфорилирована или замещена аминами или органическими группами молекул с атомами углерода от 1 до 20. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные и известные науке формы рибозы или дезоксирибозы, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, аналоги карбоциклических сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилоза или ликсоза, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические нуклеотидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть замещены альтернативными группами. Такие альтернативные группы включают, но не ограничиваются, варианты воплощения изобретения, в которых фосфат замещен P(O) S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), «(O)NR.суб.2 («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH.суб.2 («формацетал»), в которых каждый R или R' представлен независимым образом H или замещен/не замещен алкилом (1-20 C), и в некоторых случаях содержит эфир (-O-) Не обязательно, чтобы все связи в полинуклеотиде были одинаковы. Представленное выше описание применимо ко всем полинуклеотидам, включая РНК и ДНК.

В контексте данного изобретения «олигонуклеотид» относится к коротким, обычно одноцепочечным, и обычно синтезированным полинуклеотидам, которые, как правило, но не обязательно, имеют в длину менее чем примерно 200 нуклеотидов. Термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» не являются взаимоисключающими. Представленное выше описание полинуклеотидов равным образом и полностью применимо к олигонуклеотидам.

Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются, гематобласты или рак крови, например, лимфому, лейкоз, миеломы или лимфоидные злокачественные новообразования, а также рак селезенки и рак лимфатических узлов, карциному, бластому и саркому. Наиболее специфические примеры рака включают В-клеточный рак, включая, например, лимфомы высокой, средней и низкой степени злокачественности (включая В-клеточные лимфомы, такие как, например, В-клеточная лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек и неходжкинская лимфома (НХЛ), лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома Беркитта, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома, фолликулярная лимфома и лимфома Ходжкина, а также Т-клеточные лимфомы) и лейкозы (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ),

такой как В-клеточный лейкоз (CD5+ В-лимфоциты), миелолейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и миелодисплазию), и другие гематологические и/или В- или Т-клеточные виды рака. Кроме того, сюда также включают виды рака

5 других гематопоетических клеток, например, полиморфноядерных лейкоцитов, таких как базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и моноцитов, дендритных клеток, тромбоцитов, эритроцитов и NK-клеток. Также сюда включают следующие раковые нарушения пролиферации В-клеток: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая

10 вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны. Происхождение В-клеточного рака включает следующее: В-клеточная лимфома маргинальной зоны происходит из В-клеток памяти, которые

15 находятся в маргинальной зоне; фолликулярная лимфома и диффузная В-крупноклеточная лимфома происходят из centroцитов в светлой зоне зародышевого центра; хронический лимфоцитарный лейкоз и мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз происходят из В1-клеток (CD5+); лимфома из клеток мантийной зоны происходит из нативных В-клеток в мантийной зоне; лимфома Беркитта происходит из центробластов

20 в темной зоне зародышевого центра. Ткани, включающие указанные здесь гематопоетические клетки, относятся к «тканям гематопоетических клеток» и включают тимус и костный мозг, а также ткани периферических лимфатических узлов, слизистую оболочку лимфоидной ткани, например, лимфоидной ткани желудка, миндалин, пейеровы бляшки и аппендикс, а также слизистую оболочку других лимфоидных тканей,

25 например, слизистую оболочку бронхов. Дополнительные специфические примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени,

30 рак желчного пузыря, гепатому, рак молочной железы, колоректальный рак, рак толстого кишечника, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почек, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, лейкоз и другие лимфопролиферативные нарушения, а также различные типа рака головы и шеи.

35 Указанное здесь «В-клеточное злокачественное новообразование» включает неходжкинскую лимфому (НХЛ), включая низкодифференцированную/фолликулярную НХЛ, мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ, среднелифференцированную/фолликулярную НХЛ, среднелифференцированную диффузную НХЛ, высокодифференцированную лимфобластную НХЛ, высокодифференцированную

40 иммунобластную НХЛ, высокодифференцированную мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленным ядром, НХЛ с массивным поражением, лимфому из клеток мантийной зоны, СПИД-ассоциированную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфоцитарную преобладающую лимфосаркому (ЛМЛС), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), хронический

45 лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), вялотекущую НХЛ, включая рецидивирующую вялотекущую НХЛ и устойчивую к ритуксимабу вялотекущую НХЛ; лейкоз, включая острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; лимфому клеток

мантийной зоны; и другие гематобластозы. Такие злокачественные новообразования могут быть подвергнуты лечению антителами, действие которых направлено на поверхностные маркеры В-клеток, такие как FcRH5. Такие заболевания подвергаются лечению путем введения антитела, действие которого направлено на поверхностный маркер В-клеток, такой как FcRH5, и такое лечение включает введение неконъюгированного («несвязанного») антитела или антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, как это описано в данной заявке. Подобные заболевания также могут подвергаться лечению с использованием комбинированной терапии, включая антитело к FcRH5 или конъюгат антитела к FcRH5-препарата в сочетании с другим антителом или конъюгатом антитело-препарат, другим цитотоксическим агентом, лучевой терапией или другим видом лечения, применяемого одновременно или последовательно в виде серий. В стандартном способе лечения, описанном в изобретении, антитело к FcRH5 вводится в комбинации с антителом к CD20, иммуноглобулином или фрагментом антитела, связывающем CD20, последовательно или одновременно. Антитело к CD20 может быть представлено несвязанным антителом или конъюгатом антитело-препарат. В варианте воплощения изобретения, предусматривающем использование комбинированной терапии, антитело к FcRH5 представлено антителом данного изобретения, и антитело к CD20 представлено препаратом Ритуксан® (ритуксимаб).

В контексте данного изобретения термин «неходжкинская лимфома» или «НХЛ» относится к раку лимфатической системы, за исключением лимфом Ходжкина. Лимфомы Ходжкина обычно отличаются от неходжкинских лимфом по присутствию клеток Рида-Штернберга при лимфоме Ходжкина и отсутствию указанных клеток при неходжкинских лимфомах. Примеры неходжкинских лимфом, которые охватываются термином в контексте данного изобретения, включают любую неходжкинскую лимфому, определенную как таковую специалистом в данной области (например, онкологом или патологом) в соответствии с известной в науке схемой классификации, например, пересмотренной Европейско-американской классификацией лимфом (REAL), описанной в Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). См., в частности, списки на Фиг. 11.57, 11.58 и 11.59. Более специфические примеры включают, но без ограничения, следующие: рецидивирующая или рефрактерная НХЛ, первичная низкодифференцированная НХЛ, НХЛ стадии III/IV, НХЛ, устойчивая к химиотерапии, лимфобластный лейкоз предшественников В-клеток и/или лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз и/или мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, В-клеточная пролимфоцитарная лимфома, иммуноцитома и/или лимфоплазмацитарная лимфома, лимфоплазмацитарная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, лимфома маргинальной зоны селезенки, экстранодальная лимфома MALT-типа маргинальной зоны, нодальная лимфома маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз, плазмацитома и/или миелома плазмацитов, низкодифференцированная/фолликулярная лимфома, среднелифференцированная/фолликулярная НХЛ, лимфома из клеток мантимальной зоны, фолликулярная лимфома, среднелифференцированная диффузная НХЛ, диффузная В-крупноклеточная лимфома, агрессивная степень НХЛ (включая агрессивную первичную НХЛ и агрессивную рецидивирующую НХЛ), рецидивирующая или рефрактерная НХЛ, возникшая после трансплантации аутологичных стволовых клеток, первичная В-крупноклеточная лимфома средостения, первичная выпотная лимфома, высокодифференцированная иммунобластная НХЛ, высокодифференцированная

лимфобластная НХЛ, высокодифференцированная мелкоклеточная НХЛ с нерасщепленным ядром, НХЛ с массивным поражением, лимфома Беркитта, крупноклеточный гранулярный лимфоцитарный лейкоз клеток-предшественников (периферических клеток), грибовидный микоз и/или синдром Сезари, лимфомы кожи, анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфангиома.

Нарушения в плазмацитах приводят к неконтролируемому делению или размножению клона плазмацитов. Плазмациты возникают из активированных В-лимфоцитов (т.е. В-клеток). Каждая В-клетка вырабатывает уникальный рецептор, известный как рецептор В-клетки, который находится на клеточной поверхности и специфичен относительно инородного вещества, т.е. антигена. Когда рецептор В-клетки связывается со своим когнатным антигеном, клетка, экспрессирующая рецептор, активируется и повторно вступает в клеточный цикл, вырабатывая много клональных копий самой себя. Клоны вызревают в плазмациты, которые остаются преимущественно в костном мозге и специализируются на выработке копий рецептора В-клеток, высвобождающихся в кровотоке в виде антител. При нарушении в плазмацитах, плазмацит или материнская В-клетка несут повреждение в геноме, что приводит к супрессии или нечувствительности к обычным ограничениям при делении клетки и/или активности. Дочерние плазмациты, полученные из таких клеток, являются злокачественными, т.к. они делятся неконтролируемым образом и/или вырабатывают избыточное количество одного и того же иммуноглобулина (антитела). Зачастую вырабатываемый иммуноглобулин неполный или имеет неправильную конформационную структуру, что может привести к накоплению белка (также известного как моноклональный белок, М-белок, парапротеин или амилоидный белок, в зависимости от отдельного нарушения) в сыворотке, тканях или органах (особенно в почках), приводя к дисфункции органа и/или его недостаточности. Плазмацитарные нарушения включают моноклональные гаммапатии неопределенной значимости (МГНО), множественную миелому (ММ), макроглобулинемию, болезнь тяжелых цепей и системный амилоидоз, вызванный легкой цепью (АЛ), и такие заболевания дифференцируют на основе пролиферации клона, степени участия костного мозга и типа экспрессируемого М-белка. Дополнительные плазмацитарные нарушения представлены изолированной плазмацитомой, экстрамедуллярной плазмацитомой, множественными изолированными плазмацитомами, плазмацитарным лейкозом, макроглобулинемией Вальденстрема, В-клеточными неходжкинскими лимфомами, В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом. Несмотря на то, что новые иммунотерапии с использованием, например, ритуксимаба и алемтузумаба, улучшили безрецидивную и общую выживаемость при некоторых В-клеточных злокачественных новообразованиях, было показано, что такие виды терапий не эффективны в лечении плазмацитарных нарушений, частично по причине того, что антигены мишени CD20 и CD52 экспрессируются злокачественными клональными плазмацитами в недостаточном количестве. Таким образом, существует необходимость в идентификации и разработке улучшенной терапии плазмацитарных нарушений. (См. опубликованные заявки на патент США No. 20080166742 и 20080317745, каждая из которых включена сюда во всей своей полноте посредством ссылки).

Экспрессия FcRH5 (IRTA2) в В-клетках, плазмацитах и клетках множественной миеломы (включая образцы клеток от пациентов с ММ) уже была доказана ранее (см. опубликованную заявку на патент США No. 20060251662, включенную сюда во всей своей полноте посредством ссылки). В соответствии с этим, применительно к схеме экспрессии FcRH5 в образцах множественной миеломы, молекула представляет собой превосходную мишень для лечения опухолей у млекопитающих, включая

плазмацитарные нарушения, такие как описанные здесь нарушения (т.е. множественная миелома), и заболеваний, связанных с выработкой антитела, например, аллергии или аутоиммунных заболеваний.

«Расстройство (нарушение)» является любым состоянием, которому пойдет на пользу лечение веществом/молекулой или способом изобретения. Этот термин включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая патологические состояния, которые предрасполагают возникновение у млекопитающего такого расстройства. Неограничивающие примеры нарушений, которые могут быть подвергнуты лечению в контексте данного изобретения, включают раковые состояния, такие как злокачественные и доброкачественные опухоли, злокачественные лимфоидные заболевания и состояния без лейкозов, нейронные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические и другие glandулярные, макрофагальные, эпителиальные, стромальные и бластоцельные нарушения, а также воспалительные, иммунологические и другие нарушения, связанные с ангиогенезом. Нарушения также включают следующие раковые состояния, такие как: нарушения пролиферации В-клеток и/или В-клеточные опухоли, например, лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

Термины «нарушение пролиферации клеток» и «пролиферативное расстройство» относятся к нарушениям, которые связаны с определенной степенью патологической пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения нарушение пролиферации клеток представлено раком.

В контексте данного изобретения «опухоль» относится ко всем случаям роста и пролиферации клеток новообразования, злокачественного или доброкачественного, а также всем предраковым и раковым клеткам или тканям.

В контексте данного изобретения термин «аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию или расстройству, возникшему и контролируемому относительно собственных тканей или органов организма, или к проявлению такого заболевания или расстройства или результирующего состояния. При большинстве таких аутоиммунных и воспалительных расстройств может существовать целый ряд клинических и лабораторных маркеров, включая, но не ограничиваясь, гипергаммаглобулинемию, высокие уровни аутоантител, накопления комплекса антиген-антитело в тканях (для таких расстройств эффективно лечение кортикостероидами или иммуносупрессантами), а также агрегаты лимфоидных клеток в пораженных тканях. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией относительно аутоиммунного заболевания, опосредованного В-клетками, считается, что В-клетки обуславливают свой патогенный эффект при аутоиммунных заболеваниях у человека посредством множественных механизмов, включая выработку аутоантитела, образование иммунного комплекса, активацию дендритных и Т-клеток, синтез цитокинов, непосредственное высвобождение хемокинов и обеспечение центра для эктопического неоплимогенеза. Каждый из таких путей может в различной степени принимать участие в патологии аутоиммунных заболеваний.

«Аутоиммунное заболевание» может быть органоспецифическим заболеванием (т.е. иммунный ответ специфическим образом направлен против системы органов, такой как эндокринная система, гематопоезическая система, кожа, сердечно-легочная система,

желудочно-кишечный тракт и печень, почки, щитовидная железа, уши, нервномышечная система, центральная нервная система и т.д.) или системным заболеванием, поражающим несколько систем органов (например, системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит, полимиозит и т.д.). Такие преимущественные заболевания включают следующие:

- 5 аутоиммунные ревматические заболевания (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродерма, волчанка, такая как СКВ и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, антифосфолипидный синдром и псориатический артрит), аутоиммунные желудочно-кишечные и печеночные расстройства (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютенная болезнь), васкулит (такие как, например, ANCA-отрицательный васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Черджа-Стросс, синдром Вегенера и микроскопическую ангиопатию), аутоиммунные неврологические расстройства (такие как, например, множественный склероз, синдром опсо-миоклонуса, миастению гравис, оптикомиелит Девика, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полинейропатии), нарушения функции почек (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и заболевание Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (такие как, например, псориаз, крапивница, сыпь, вульгарная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (такие как, например, заболевание внутреннего уха и потеря слуха), синдром Бехчета, синдром Рейно, трансплантация органа, аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, вызванные диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, базедова болезнь и тиреоидит)). Наиболее предпочтительно такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, множественный склероз, синдром Шегрена, базедову болезнь, ИЗСД, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

- Специфические примеры других аутоиммунных заболеваний, которые в некоторых случаях охватывают заболевания, представленные выше, включают, но не ограничиваются, следующие: артрит (острый и хронический, ревматоидный артрит, включая ювенильную форму ревматоидного артрита и стадии, такие как ревматоидный синовит, подагра и подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, коллаген-индуцированный артрит II типа, инфекционный артрит, болезнь Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, артрит позвоночника, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, хронический доминирующий полиартрит, реактивный артрит, менопаузальный артрит, артрит с пониженным количеством эстрогена, а также анкилозирующий спондилит/ревматоидный спондилит), аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшечный псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопия, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джобса, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный

дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, сыпь, герпетический дерматит, монетовидный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный ирритативный дерматит и атопический дерматит, х-связанный гипер-IgM синдром, аллергические внутриглазные воспалительные

5 заболеваний, крапивница, такая как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, миозит, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродерма (включая системную склеродерму), склероз, такой как системный склероз, множественный склероз (МС), такой как

10 спинооптический МС, первично-прогрессирующий МС (ППМС) и рецидивирующий ремитирующий МС (РРМС), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, множественный склероз, атаксический склероз, оптический нейромиелиит (ОНМ), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона, опосредуемые иммунной системой заболевания желудочно-кишечного тракта,

15 воспаление желудочно-кишечного тракта, колит, такой как язвенный колит, *colitis ulcerosa*, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), воспаление кишечника, гангренозная пиодермия, узловатая эритема, первичный склерозирующий холангит, респираторный

20 дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глаза, воспаление радужной оболочки глаза, хориоидит, аутоиммунное гематологическое расстройство, болезнь трансплантат против хозяина, ангионевротический отек, такой как наследственный ангионевротический отек,

25 повреждение черепного нерва как при менингите, герпес беременных, пемфигоид беременных, мошоночный зуд, аутоиммунное преждевременное нарушение овуляции, внезапная потеря слуха вследствие аутоиммунного состояния, опосредуемые IgE заболевания, такие как анафилаксия, и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит, и/или энцефалит ствола

30 головного мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом и без него, такой как острый или хронический гломерулонефрит, такой как первичный ГН, опосредуемый иммунной системой ГН, мембранозный ГН (мембранозная

35 нефропатия), идиопатический мембранозный ГН или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембранный или мембранозно-пролиферативный ГН (МПГН), включая I тип и II тип, и быстро прогрессирующий ГН, пролиферативный нефрит, аутоиммунная полигландулярная эндокринная недостаточность, баланит, включая ограниченный плазмноклеточный баланит, баланопостит, кольцевидная эритема, стойкая

40 дисхромическая эритема, мультиформная эритема, кольцевидная гранулема, блестящий лишай, склеротический и атрофический лишай, простой хронический лишай, спинулезный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предраковый кератоз, гангренозную пиодерму, аллергические состояния и ответы, пищевые аллергии, лекарственные аллергии, аллергии на укусы насекомых, редкие

45 аллергические расстройства, такие как мастоцитоз, аллергическая реакция, экзема, включая аллергическую или атопическую экзему, астеатотическую экзему, дисгидротическую экзему и везикулярную ладонно-подошвенную экзему, астму, такую как *asthma bronchiale*, бронхиальная астма и аутоиммунная астма, аллергическая астма

и детская астма, состояния, в которые вовлечена инфильтрация Т-клеток и хронические воспалительные ответы, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как фетальные группы крови А-В-О в процессе беременности, хроническое воспалительное заболевание легких, нарушение адгезии лейкоцитов, волчанку, включая волчаночный нефрит, волчаночный церебрит, детскую волчанку, внепочечную волчанку, экстраренальную волчанку, дискоидную волчанку и дискоидную красную волчанку, волчаночную алопецию, СКВ, такую как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, неонатальный волчаночный синдром (НВС) и диссеминированная

красная волчанка, юношеский сахарный диабет (I типа), включая детский ИЗСД, сахарный диабет взрослых (диабет II типа), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетический колит, диабетическое поражение крупных артерий, иммунный ответ, ассоциированный с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, в том числе лимфоматоидный гранулематоз, агранулоцитоз, васкулиты (включая васкулит, васкулит крупных сосудов, в том числе ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (Такаясу), васкулит сосудов среднего калибра (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартериит/узелковый периартериит), иммуноваскулит, васкулит в ЦНС, кожный васкулит, васкулит при гиперчувствительности, некротизирующий васкулит, такой как системный некротизирующий васкулит и ассоциированный с ANCA васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросс (CSS) и ассоциированный с ANCA васкулит сосудов малого калибра, гранулематоз Вегенера и микроскопический полиартериит), височный артериит, апластическую анемию, аутоиммунную апластическую анемию, Кумбс-положительную анемию, анемию Дамонда-Блэкфана, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, в том числе аутоиммунную гемолитическую анемию (ИУГА), пернициозную анемию (*anemiaperniciosa*), болезнь Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную(ые) нейтропению(и), цитопении, такие как панцитопения, лейкопения, заболевания, в которые вовлечен диапедез лейкоцитов, воспалительные нарушения в ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром множественного поражения органов, такой как вторичные синдромы при септицемии, травме или геморрагии, заболевания, опосредуемые комплексами антиген-антитело, заболевание, связанное с антителами против клубочковой базальной мембраны, антифосфолипидный синдром, моторный неврит, аллергический неврит, болезнь/синдром Бехчета, синдром Кастельмана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и кожный пемфигоид, пемфигус, в том числе обыкновенный пемфигус, пемфигус кожи, листовидный пемфигус, пемфигоид слизистой оболочки и эритематозный пемфигоид, врожденный буллезный эпидермолиз, глазное воспаление, преимущественно аллергическое глазное воспаление, такое как аллергический конъюнктивит, линейный IgA дерматоз, воспаление конъюнктивы, вызванное аутоиммунным заболеванием, аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, тепловое повреждение вследствие аутоиммунного состояния, преэклампсию, расстройство, вызываемое иммунными комплексами, такое как иммунокомплексный нефрит, опосредуемый антителами нефрит, нейровоспалительные расстройства, полиневропатии, хроническую невропатию, такую как IgM-полиневропатии или IgM-опосредованная невропатия, тромбоцитопению (например, такая как развивается у пациентов с инфарктом миокарда), в том числе тромботическую

тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), посттрансфузионную пурпуру (ПТП), индуцированную гепарином тромбоцитопению и аутоиммунную или иммунноопосредуемую тромбоцитопению, в том числе, например, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), включая хроническую или острую ИТП, склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, в том числе аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз, гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные заболевания, в том числе тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, болезнь Грейвса, болезнь глаз Грейвса (офтальмопатия или вызванная заболеванием щитовидной железы офтальмопатия), полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные полигландулярные синдромы, например, I типа (или полигландулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром «негнущегося человека» или «негнущегося субъекта», энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит или *encephalomyelitis allergica* и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), миастению гравис, такую как ассоциированная с тимомой миастения гравис, церебеллярную дегенерацию, нейромиотонию, опсоклонус или опсоклонус-миоклонус синдром (ОМС), и сенсорную невропатию, многоочаговую моторную невропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, пневмонит, такой как лимфоидный интерстициальный пневмонит (ЛИП), облитерирующий бронхиолит (не зависимый от трансплантата) в противоположность НСИП, синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA-дерматоз, острый лихорадочный нейтрофильный дерматоз, подороговичный пустулезный дерматоз, преходящий акантолитический дерматоз, цирроз, такой как первичный билиарный цирроз и пневмоцирроз, синдром аутоиммунной энтеропатии, целиакию или глютеиновую болезнь, спру-целиакию (глютеновую энтеропатию), рефрактерный спру, идиопатический спру, криоглобулинемию, такую как смешанная криоглобулинемия, боковой амиотрофический склероз (АЛС; болезнь Лу Геринга), заболевание коронарных артерий, аутоиммунное заболевание уха, такое как аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АИЗВУ), аутоиммунную потерю слуха, полихондрит, такой как рефрактерный или рецидивирующий, или возвратный полихондрит, легочно-альвеолярный протеиноз, синдром Когана/несифилитический интерстициальный кератит, паралич Белла, болезни/синдром Свита, аутоиммунную розацею, боль, ассоциированную с опоясывающим лишаем, амилоидоз, незлокачественный лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неясного значения, МГНЗ), периферическую невропатию, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, пароксизмальный паралич, и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительную миопатию, очаговый или сегментный, или очаговый сегментный гломерулосклероз (ОСГС), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, фибромиалгию, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, воспаление надпочечников, атрофию желудка,

пресенильную деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, синдром Дресслера, очаговую алопецию, синдром CREST (кальциноз, синдром Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие наличия антител к сперматозоидам, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Чагаса, ревматическую лихорадку, привычный выкидыш, альвеолит у сельскохозяйственных рабочих, полиморфную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, легочную аллергию птицеловов, аллергический гранулематозный ангиит, доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как аллергический и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легкого, трансфузионную реакцию, лепру, малярию, паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, кипаносомиоз, шистосомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, фиброзирующий медиастинит, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, кистозный фиброз, эндофтальмит, возвышенную стойкую эритему, гемолитическую болезнь новорожденных, эозинофильный фасциит, синдром Шутьмана, синдром Фелти, филариоз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронический циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фукса, пурпуру Геноха-Шенлейна, инфекцию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), ТКИН, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), инфекцию эховирусом, сепсис (синдром системного воспалительного ответа (ССВО)), эндотоксемию, панкреатит, тиреотоксикоз, инфекцию парвовирусом, инфекцию вирусом краснухи, поствакцинальные синдромы, инфекцию врожденной краснухой, инфекцию вирусом Эпштейна-Барра, инфекционный паротит, синдром Эванса, аутоиммунную гонадную недостаточность, хорею Сиденгама, постстрептококковый нефрит, облитерирующий тромбангиит, тиреотоксикоз, сухотку спинного мозга, хориоидит, гигантоклеточную полимиалгию, хронический пневмонит с гиперчувствительностью, конъюнктивит, такой как весенний катар, сухой кератоконъюнктивит и эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический нефритический синдром, нефропатию с минимальными изменениями, доброкачественное семейное повреждение и повреждение при ишемии-реперфузии, реперфузию органов при трансплантации, аутоиммунную реакцию в сетчатке, воспаление сустава, бронхит, хроническое обструктивное заболевание дыхательных путей/легких, силикоз, афты, афтозный стоматит, артериосклеротические расстройства (церебрально-сосудистая недостаточность), такие как артериосклеротическая энцефалопатия и артериосклеротическая ретинопатия, асперматогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемию, контрактуру Дюпюитрена, факоанафилактический эндофтальмит, аллергический энтерит, узловатую лепрозную эритему, идиопатический паралич лицевого нерва, синдром хронической усталости, ревматическую лихорадку, болезнь Хеммена-Рича, сенсоневральную потерю слуха, пароксизмальную гемоглобинурию, гипогонадизм, регионарный илеит, лейкопению, инфекционный мононуклеоз, поперечный миелит, первичную идиопатическую микседему, нефроз, симпатическую офтальмию, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангренозную пиодермию, тиреоидит Кервена, приобретенную атрофию селезенки, незлокачественную тимому, лимфофолликулярный тимит, витилиго, синдром токсического шока, пищевое отравление, состояния, вовлекающие инфильтрацию Т-клеток, дефект адгезии лейкоцитов, иммунные ответы, ассоциированные с острой и

замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, вовлекающие диапедез лейкоцитов, синдром полиорганного поражения, опосредуемые комплексами антиген-антитело заболевания, заболевания, направленные против базальной мембраны клубочков, аутоиммунные полиэндокринопатии, оофорит, первичную микседему, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическую офтальмию, ревматические заболевания, смешанное заболевание соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринную недостаточность, аутоиммунные полигландулярные синдромы, включая полигландулярный синдром I типа, идиопатический гипопаратиреоз взрослых (ИГАВ), кардиомиопатию, такую как кардиомиопатия с дилатацией, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), гемохромацитоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит, синусит решетчатой кости, лобной кости, верхней челюсти или клиновидной кости, аллергический синусит, связанное с эозинофилами расстройство, такое как эозинофилия, эозинофилия с инфильтрацией в легкие, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера, хроническую эозинофильную пневмонию, тропическую легочную эозинофилию, бронхолегочный аспергиллез, аспергиллому или содержащие эозинофилы гранулемы, анафилаксию, спондилоартропатии, серонегативный спондилоартрит, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, хронический кожно-слизистый кандидоз склеры и эписклеры, синдром Брутона, транзиторную гаммаглобулинемию новорожденных, синдром Вискотта-Олдрича, синдром атаксии-телеангиэктазии, ангиэктазию, аутоиммунные нарушения, ассоциированные с коллагеновыми заболеваниями, ревматизм, такой как хронический артроревматизм, лимфаденит, снижение ответа кровяного давления, сосудистую дисфункцию, тканевое повреждение, сердечно-сосудистую ишемию, гиперальгезию, почечную ишемию, церебральную ишемию и заболевание, сопровождающее васкуляризацию, аллергические расстройства, связанные с гиперчувствительностью, гломерулонефрит, реперфузионное повреждение, ишемическое реперфузионное расстройство, реперфузионное повреждение миокарда и других тканей, лимфоматозный трахеобронхит, воспалительные дерматозы, дерматозы с острыми воспалительными компонентами, полиорганную недостаточность, буллезные заболевания, почечный кортикальный некроз, острый гнойный менингит или другие воспалительные расстройства центральной нервной системы, окулярные и орбитальные воспалительные расстройства, синдромы, ассоциированные с трансфузией гранулоцитов, индуцированную цитокинами токсичность, нарколепсию, острое тяжелое воспаление, хроническое трудноизлечимое воспаление, пиелит, эндартериальную гиперплазию, пептическую язву, вальвулит и эндометриоз. Такие заболевания подвергаются лечению путем введения антитела, которое связывается с поверхностным маркером В-клеток, таким как FcRH5, и такое лечение включает введение неконъюгированного («несвязанного») антитела или антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, как это описано в данной заявке. Подобные заболевания также могут подвергаться лечению с использованием комбинированной терапии, включая антитело к FcRH5 или конъюгат антитела к FcRH5-препарата в сочетании с другим антителом или конъюгатом антитело-препарат, другим цитотоксическим агентом, лучевой терапией или другим видом лечения, применяемого одновременно или последовательно в виде серий.

«Лечение» или «ослабление симптомов» относится к терапевтическому лечению и профилактическим или превентивным мерам, в частности, к предотвращению или замедлению (снижению) отдельного патологического состояния или нарушения. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают субъекты с уже имеющимся

расстройством, а также субъекты, склонные к наличию такого расстройства, или субъектам, у которых такое расстройство должно быть предотвращено. Субъект или млекопитающее был (было) подвергнуто успешному «лечению» рака с экспрессией полипептида FcRH5, если, после получения терапевтического количества антитела к FcRH5 в соответствии со способами данного изобретения, у пациента отмечается отличительное и/или измеряемое снижение или отсутствие одного из следующих явлений: снижение количества раковых клеток или отсутствие раковых клеток; снижение размера опухоли; ингибирование (т.е. замедление в некоторой степени и, предпочтительно, остановка) инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая распространение рака в мягкие ткани и кость; ингибирование (т.е. замедление в некоторой степени и, предпочтительно, остановка) метастазов опухоли; ингибирование, в некоторой степени, роста опухоли; и/или ослабление в некоторой степени одного или нескольких симптомов, ассоциированных с отдельным видом рака; снижение смертности и заболеваемости, а также улучшение качества жизни. При предотвращении роста и/или гибели существующих раковых клеток с использованием антитела к FcRH5, такие явления могут быть цитостатическими и/или цитотоксическими. Снижение подобных признаков или симптомов также может ощущаться пациентом.

Указанные выше параметры для оценки успешного лечения и улучшения состояния заболевания легко измеряются с использованием стандартных процедур, знакомых доктору. Для лечения рака может быть измерена эффективность, например, путем оценки времени до прогрессирования заболевания (ВДП) и/или определения клинического ответа (КО). Метастазы могут быть определены в ходе тестов определения стадийности заболевания и сцинтиграфии кости и исследования кости на содержание кальция и других ферментов для определения распространения метастаз в кости. Для анализа метастаз в тазу и области лимфатических узлов может проводиться КТ. Для отслеживания метастазов в легких и печени используются рентгенография грудной клетки и измерение уровней печеночных ферментов, соответственно. Другие стандартные способы мониторинга заболевания включают трансректальную ультрасонографию (TRUS) и трансректальную аспирационную биопсию (TRNB).

При раке мочевого пузыря, который является наиболее локализованным раком, способы определения прогрессирования заболевания включают цитологический анализ мочи путем цистоскопии, мониторинг наличия крови в моче, визуализацию уретериального тракта ультразвуком или внутривенную пиелограмму, компьютерную томографию (КТ) и магнитно-резонансную томографию (МРТ). Наличие дистантных метастазов может быть оценено с использованием КТ брюшной полости, рентгенографии органов грудной клетки или радионуклидной визуализации скелета.

«Хроническое» введение относится к введению агента(ов) непрерывным образом, в отличие от острого режима введения, для поддержания первичного терапевтического эффекта (активности) в течение продолжительного периода времени. «Прерывистое» введение осуществляется временным образом с перерывами, но чаще всего имеет принцип цикличности.

«Индивидуум» представлен позвоночным животным. В определенных вариантах воплощения изобретения позвоночное животное представлено млекопитающим. Млекопитающие включают, но не ограничиваются, сельскохозяйственных животных (например, коров), используемых в спорте животных, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В определенных вариантах воплощения изобретения млекопитающее представлено человеком.

В целях лечения или снижения симптомов рака термин «млекопитающее» относится

к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, животных, используемых в спорте и из зоопарка, например, собак, кошек, рогатый скот, лошадей, овец, свиней, коз, кроликов и т.р. Млекопитающее предпочтительно представлено человеком.

- 5 Введение «в комбинации с» одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (сопутствующее) и последовательное введение в любом порядке.

- В контексте данного изобретения «носители» включают фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, являющиеся нетоксичными для клетки или млекопитающего, которые подвержены воздействию в указанных дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представлен забуференным раствором на основе воды. Примеры физиологически приемлемых носителей включают следующие: буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; 10 низкомолекулярный полипептид (менее чем примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, 15 такие как маннитол или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные сурфактанты, такие как ТВИН®, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и ПЛЮРОНИКС®.

- Под «твердой фазой» или «твердым субстратом» понимают неводную матрицу, к которой может присоединиться или прирасти антитело по данному изобретению. 25 Примеры твердых фаз, используемых в тексте данной заявки, включают фазы, образованные полностью или частично из стекла (например, стекла с контролируемым размером пор), полисахаридов (например, агарозы), полиакриламидов, полистирена, поливинилового спирта и силиконов. В определенных вариантах воплощения изобретения, в зависимости от контекста, твердая фаза может состоять из лунки 30 планшета для анализа, в других - из колонки для очистки (например, колонки для аффинной хроматографии). Этот термин также включает прерывистую твердую фазу дискретных частиц, описанную например, в патенте США No. 4275149.

- «Липосома» представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или сурфактанта, и может использоваться для доставки 35 препарата (например, антитела к FcRH5) в организме млекопитающего. Компоненты липосомы обычно размещаются в виде двух слоев, подобно размещению липидов в биологической мембране.

- «Небольшая молекула» или «небольшая» органическая молекула определяется здесь как молекула с молекулярной массой ниже примерно 500 дальтон. 40 «Индивидуум», «субъект» или «пациент» представлен позвоночным животным. В определенных вариантах воплощения изобретения позвоночное животное представлено млекопитающим. Млекопитающие включают, но не ограничиваются, сельскохозяйственных животных (например, коров), используемых в спорте животных, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. 45 В определенных вариантах воплощения изобретения млекопитающее представлено человеком.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, форма которой предусматривает наличие биологической активности активного действующего вещества,

и такая композиция не содержит каких-либо дополнительных компонентов, являющихся недопустимо токсичными для субъекта, которому вводят композицию. Такая композиция может быть стерильной.

«Стерильная» композиция является асептической, т.е. не содержит каких-либо живых микроорганизмов и их споры.

«Эффективное количество» антитела, как это указано в данной заявке, является количеством, эффективным для осуществления отдельной поставленной цели.

«Эффективное количество» может быть определено эмпирическим путем и стандартным образом относительно отдельной цели.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела или другого препарата, эффективного в «лечении» заболевания или расстройства у субъекта или млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество препарата может снизить количество раковых клеток, снизить размер опухоли, ингибировать (т.е. замедлять в некоторой степени и преимущественно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, ингибировать (т.е. замедлять в некоторой степени и преимущественно останавливать) метастазы опухоли, ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли, и/или в некоторой степени снижать один или несколько симптомов, ассоциированных с раком. См. представленное здесь определение термина «лечение». При предотвращении роста и/или гибели существующих раковых клеток с использованием препарата, такие явления могут быть цитостатическими и/или цитотоксическими. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в определенных дозах в течение определенных периодов времени и необходимому для достижения необходимого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на ранних стадиях заболевания.

«Количество, ингибирующее рост» относится к количеству антитела к FcRH5, способному ингибировать рост клетки, особенно опухоли, например, раковой клетки, в условиях *in vitro* или *in vivo*. «Количество антитела к FcRH5, ингибирующее рост» в целях ингибирования роста клеток новообразования может быть определено эмпирическим путем или стандартным образом.

«Цитотоксическое количество» антитела к FcRH5 представляет собой количество, способное вызывать разрушение клетки, особенно опухоли, например, раковой клетки, в условиях *in vitro* или *in vivo*. «Цитотоксическое количество» антитела к FcRH5 в целях ингибирования роста клеток новообразования может быть определено эмпирическим путем или стандартным образом.

«Клетка, экспрессирующая FcRH5», представляет собой клетку, которая экспрессирует эндогенный или трансфицированный полипептид FcRH5 на поверхности клетки или в секретированной форме. «Рак с экспрессией FcRH5» представляет собой рак с присутствием полипептида FcRH5 на клеточной поверхности или рак, характеризующийся выработкой и секрецией полипептида FcRH5. В некоторых случаях, при «раке с экспрессией FcRH5» отмечаются достаточные уровни полипептида FcRH5 на поверхности клеток, таким образом, антитело к FcRH5 может связываться с FcRH5, обладая терапевтическим эффектом относительно рака. В другом варианте воплощения изобретения, при «раке с экспрессией FcRH5» отмечаются достаточные уровни выработки и секреции полипептида FcRH5, таким образом, антитело к FcRH5 может связываться с FcRH5, обладая терапевтическим эффектом относительно рака. Что касается последнего, антагонист может быть представлен антисмысловым

олигонуклеотидом, который снижает, ингибирует или предотвращает выработку и секрецию секретируемого полипептида FcRH5 опухолевыми клетками. Рак с «гиперэкспрессией» полипептида FcRH5 представляет собой рак, характеризующийся достаточно высокими уровнями полипептида FcRH5 на поверхности клеток, или

5 выработкой и секрецией полипептида FcRH5 в сравнении с нераковыми клетками ткани этого же типа. Такая гиперэкспрессия может быть вызвана амплификацией гена или повышением транскрипции или трансляции. Гиперэкспрессия полипептида FcRH5 может определяться в анализе идентификации или прогностическом анализе путем оценки

10 повышенных уровней белка FcRH5, присутствующего на поверхности клетки, или секретируемого клеткой (например, посредством иммуногистохимического анализа с использованием антител к FcRH5, полученных относительно изолированного полипептида FcRH5; такой полипептид может быть получен с использованием способов рекомбинации ДНК из изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид FcRH5; посредством FACS-анализа и т.п.). С другой стороны или, кроме того, уровни

15 нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид FcRH5, или уровень мРНК в клетке может быть измерен, например, посредством флуоресцирующей гибридизации *in situ* с использованием зонда на основе нуклеиновой кислоты, соответствующего нуклеиновой кислоте, кодирующей FcRH5, или комплементу (FISH; см. WO98/45479, опубликованный в октябре 1998 г.), саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга или в ходе полимеразной

20 цепной реакции (ПЦР), например, количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Гиперэкспрессия полипептида FcRH5 также может быть определена путем измерения слущивающегося антигена в биологической жидкости, такой как сыворотка, например, с использованием анализов на основе антител (см. также, например, патент США No. 4933294, выданный 12 июня 1990 г.; WO91/05264, опубликованный 18 апреля

25 1991 г.; патент США No. 5401638, выданный 28 марта 1995 г.; и Sias et al., *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Кроме указанных выше анализов, специалисту в данной области доступны и другие анализы *in vivo*. Например, клетки в организме пациента могут быть подвергнуты воздействию антитела, которое в некоторых случаях может быть мечено определяемой меткой, например, радиоактивным изотопом, и связывание

30 антитела с клетками пациента может быть оценено, например, путем наружного сканирования на предмет радиоактивности или анализа материала биопсии, взятого у пациента перед воздействием антитела.

В контексте данного изобретения термин «иммуноадгезин» обозначает похожие на антитело молекулы, которые сочетают в себе специфичность связывания

35 гетерологичного белка («адгезина») с эффекторными функциями константных доменов иммуноглобулина. В структурном аспекте иммуноадгезины состоят из слитой аминокислотной последовательности с необходимой специфичностью связывания, которая отличается от свойства распознавания антигена, участка связывания антигена (т.е. является «гетерологичным») и последовательности константного домена

40 иммуноглобулина. Участок адгезина в молекуле иммуноглобулина обычно представляет собой прилегающую аминокислотную последовательность, состоящую, по меньшей мере, из участка связывания рецептора или лиганда. Последовательность константного домена иммуноглобулина в иммуноадгезине может быть получена из любого иммуноглобулина, например, подтипов IgG-1, IgG-2, IgG-3 или IgG-4, IgA (включая

45 IgA-1 и IgA-2), IgE, IgD или IgM.

Термин «метка» в контексте данного изобретения относится к определяемому соединению или композиции, которая конъюгирована прямым или косвенным образом с антителом с образованием «меченого» антитела. Метка может быть определяемой

сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение соединения субстрата или композиции, которое можно определить.

Термин «цитотоксический агент» в контексте данного изобретения относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Термин включает радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu), препараты химиотерапии, например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие вставочные агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как небольшие молекулы токсинов или ферментативно активные токсины бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты, а также различные противоопухолевые или противораковые препараты, представленные ниже. Другие цитотоксические агенты описаны ниже. Противоопухолевый агент вызывает деструкцию опухолевых клеток.

«Токсин» представляет собой любое вещество, способное оказывать разрушающий эффект на рост или пролиферацию клетки.

«Препарат химиотерапии» представляет собой химическое соединение, используемое в лечении рака, вне зависимости от механизма действия. Примеры препаратов химиотерапии включают химическое соединение, используемое в лечении рака. Примеры препаратов химиотерапии включают следующие: тиотепа и ЦИТОКСАН® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); каптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелесин, карцелесин и бизелесин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамид, оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитризомочевина, например, кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихимицин, в частности, калихимицин гамма II и калихимицин омега II (см., например, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); динемистин, включая динемистин А; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатина хромофор и родственные хромофоры антибиотика эндинового ряда хромопротеина), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРИАМИЦИН® доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат

и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; противоадриналиновые препараты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминоклевуленовая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколхин; диазихон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и анзатомицины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазилахон; 2,2',2''-трихлорэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, ТАКСОЛ® паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.),

АБРАКСАНTM без хромофора, композиция из наночастиц паклитаксела с добавленным в ходе рекомбинации альбумином (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и ТАКСОТЕР® доцетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; ГЕМЗАР® гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платинум; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; НАВЕЛБИН® винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; иринотекан (Camptosar, CPT-11) (включая режим лечения иринотеканом с 5-ФУ и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилмитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; комбрестатин; ВЕЛКАДЕ; Ревлимид® (леналидомид); лейковорин (LV); оксалиплатин, включая режим лечения оксалиплатином (ФОЛФОКС); ингибиторы РКС-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (например, эрлотиниб (ТарцеваTM)) и VEGF-A, снижающие пролиферацию клеток, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных соединений.

В данное определение также включены следующие соединения: антигормональные препараты, регулирующие или ингибирующие действие гормона на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов к эстрогену (SERM), включая, например, тамоксифен (включая НОЛВАДЕКС® тамоксифен), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и ФАРЕСТОН® торемифен; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, МЕГАСЕ® мегестрола ацетат, АРОМАСИН® экземестан, форместанин, фадрозол, РИВИСОР® ворозол, ФЕМАРА® летрозол и АРИМИДЕКС® анастрозол; и антиандрогенные препараты, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserelin; а также троксацитабин (1,3-диоксолан, аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, ингибирующие экспрессию генов в пути передачи сигнала, задействованного в пролиферации аберрантных клеток, такие как, например, РКС-альфа, Raf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии ФРЭС (например, АНГИОЗИМ® рибозим) и ингибитор

экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины генной терапии, например, вакцина АЛЛОВЕКТИН®, вакцина ЛЕУВЕКТИН® и вакцина ВАКСИД®; ПРОЛЕЙКИН® rIL-2; ЛУРТОТЕКАН® ингибитор топоизомеразы I; АБАРЕЛИКС® gmRN; винорелбин и эсперамицины (см. патент США No. 4675187), а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных соединений.

Кроме того, в определение «химиотерапевтического препарата» включены терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); цетуксимаб (ЭРБИТУКС®, Imclone); панитумумаб (ВЕКТИБИКС®, Amgen), ритуксимаб (РИТУКСАН®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (ОМНИТАРГ™, 2C4, Genentech), трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®, Genentech), тозитумомаб (БЕКСАР, Corixa) и конъюгат антитело-препарат гемтузумаб озогамидин (МИЛОТАРГ®, Wyeth).

«Препарат-ингибитор роста» в контексте данного изобретения относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки, в частности экспрессирующей FcRH5 раковой клетки, в условиях *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, препарат-ингибитор роста может быть представлен препаратом, который существенно ингибирует процентный показатель экспрессирующих FcRH5 клеток в S фазе. Примеры препаратов-ингибиторов роста включают препараты, блокирующие прогресс клеточного цикла (в другой момент, кроме S фазы), такие как препараты, индуцирующие остановку фаз G1 и M. Классические блокаторы M фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Препараты, останавливающие G1, также останавливают и фазу S, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ара-С. Дополнительная информация представлена в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в частности, на стр. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми препаратами, полученными из тисового дерева. Доцетаксел (ТАКСОТЕР®, Rhone-Poulenc Rorer) получен из европейского тисового дерева и является полусинтетическим аналогом паклитаксела (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел способствуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки путем предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

«Доксорубин» является антибиотиком антрациклинового ряда. Полное химическое название доксорубина: (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксид- α -L-лигнано-гексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Термин «цитокин» является родовым термином для белков, вырабатываемых одной популяцией клеток и действующих на другие клетки в качестве межклеточных медиаторов. Примеры таких цитокинов включают лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины, в свою очередь, включают гормон роста, например, гормон роста человека, N-метионил гормон роста человека, гормон роста крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гормоны-гликопротеины, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухолей- α ; мюллеров ингибирующий фактор; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин;

активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбopoэтин (ТПО); фактор роста нервов, такой как ФРН-α; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (ТФР), такие как ТФР-α и ТФР-β; инсулиноподобный фактор роста I и II; эритропоэтин (ЭПО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как
 5 интерферон-α, -β и -γ; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ); и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-1α, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-12; фактор некроза опухоли, такой как ФНО-α или ФНО-β; а также другие полипептидные факторы, включая ИЛФ
 10 и лиганд набора (ЛН). В контексте данного изобретения термин «цитокин» включает белки из естественных источников или культуры рекомбинантных клеток, а также биологически активные эквиваленты естественных последовательностей цитокинов.

Термин «листок-вкладыш» относится к инструкциям, которые обычно включены в представленные на рынке упаковки терапевтической продукции, и которые содержат
 15 информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, противопоказаниям и/или мерам предосторожности при использовании такой терапевтической продукции.

Термин «внутриклеточный метаболит» относится к соединению, образовавшемуся в результате метаболического процесса или реакции внутри клетки на конъюгат антитело-препарат (КАП). Метаболический процесс или реакция может быть
 20 представлен(а) процессом ферментации, например, протеолизом расщеплением пептидного линкера КАП или гидролизом функциональной группы, такой как гидразон, эфир или амид. Внутриклеточные метаболиты включают, но не ограничиваются, антитела и несвязанные препараты, подвергнутые внутриклеточному расщеплению после попадания в клетку, диффузии, захвата или транспортировки в клетку.

Термин «расщепленный внутри клетки» и «внутриклеточное расщепление» относится к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгат антитело-препарат (КАП), при которых разрывается ковалентная взаимосвязь, т.е. линкер, между
 25 молекулой препарата (D) и антителом (AT), что приводит к диссоциации несвязанного препарата из антитела внутри клетки. Таким образом, расщепленные молекулы КАП являются внутриклеточными метаболитами.
 30

Термин «биодоступность» относится к систематической доступности (например, концентрации в плазме/крови) отдельного количества препарата, введенного пациенту. Биодоступность является абсолютным термином, который указывает на измерение
 35 времени (скорости) и общего количества (степени) препарата, попавшего в общую систему кровообращения из введенной лекарственной формы.

Термин «цитотоксическая активность» относится к гибели клеток, цитостатическому или ингибирующему рост эффекту КАП или внутриклеточного метаболита КАП. Цитотоксическая активность может выражаться в виде значения IC₅₀, что является
 40 концентрацией (молярной или массовой) на единицу объема, в которой выживает половина клеток.

Термин «алкил» в контексте данного изобретения относится к насыщенному линейному или разветвленному моновалентному углеводородному радикалу с 1-12 атомами углерода (C₁-C₁₂), при этом алкильный радикал в некоторых случаях может
 45 иметь один или несколько представленных ниже заместителей. В другом варианте воплощения изобретения алкильный радикал представлен радикалом с 1-8 атомами углерода (C₁-C₈) или 1-6 атомами углерода (C₁-C₆). Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются, следующие: метил (Me, -CH₃), этил (Et, -CH₂CH₃), 1-

пропил (n-Pr, n-пропил, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-пропил (i-Pr, i-пропил, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1-бутил (n-Bu, n-бутил, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-метил-1-пропил (i-Bu, i-бутил, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-бутил (s-Bu, s-бутил, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-метил-2-пропил (t-Bu, t-бутил, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-пентил (n-пентил, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-метил-2-бутил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-метил-2-бутил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-метил-1-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-метил-1-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-гексил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-гексил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-гексил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$), 2-метил-2-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-метил-3-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-метил-3-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,3-диметил-2-бутил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,3-диметил-2-бутил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-гептил, 1-октил и т.п.

Термин «алкенил» относится к линейному или разветвленному моновалентному углеводородному радикалу с 2-8 атомами углерода ($\text{C}_2\text{-C}_8$) и по меньшей одной

ненасыщенной связью, т.е. углерод-углерод, sp^2 -двойная связь, при этом радикал алкенил может в некоторых случаях содержать один или несколько представленных здесь заместителей, и включает радикалы, имеющие «цис» и «транс» ориентации, и, с другой стороны, «Е» и «Z» ориентации. Примеры включают, но не ограничиваются, этиленил или винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) и т.п.

Термин «алкинил» относится к линейному или разветвленному моновалентному углеводородному радикалу с 2-8 атомами углерода ($\text{C}_2\text{-C}_8$) и по меньшей одной

ненасыщенной связью, т.е. углерод-углерод, sp -тройная связь, при этом радикал алкинил может в некоторых случаях содержать один или несколько представленных здесь заместителей. Примеры включают, но не ограничиваются, этинил ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), пропинил (пропаргил $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) и т.п.

Термин «карбоцил», «карбоциклил», «карбоциклическое кольцо» и «циклоалкил»

относится к моновалентному, неароматическому, насыщенному или частично ненасыщенному кольцу с 3-12 атомами углерода ($\text{C}_3\text{-C}_{12}$) в виде моноциклического кольца или 7-12 атомами углерода в виде двуциклического кольца. Двуциклические карбоциклы с 7-12 атомами могут быть соединены, например, в виде бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системы, а двуциклические карбоциклы с 9-10 атомами в кольце могут быть представлены в виде бицикло [5,6] или [6,6] системы, или в виде соединенных систем, таких как бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан и бицикло[3.2.2]нонан. Примеры моноциклических карбоциклов включают, но не ограничиваются, циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогексадиенил, циклогептил, циклооктил, циклононил, циклодецил, циклоундецил, циклододецил и т.п.

«Арил» означает моновалентный ароматический углеводородный радикал с 6-20 атомами углерода ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$), полученный путем удаления одного атома водорода от отдельного атома углерода в исходной системе ароматического кольца. Некоторые арильные группы представляют в виде типичных структур с обозначением «Ar». Арилы включают двуциклические радикалы, состоящие из ароматического кольца, слитого с насыщенным, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим кольцом. Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются, радикалы,

полученные из бензола (фенила), замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила, инденила, инданила, 1,2-дигидронафталина, 1,2,3,4-тетрагидронафтила и т.п. Арильные группы в некоторых случаях могут быть замещены независимым образом одним или несколькими представленными здесь заместителями.

5 Термины «гетероцикл», «гетероциклил» и «гетероциклическое кольцо» в тексте данной заявки используются взаимозаменяемым образом и относятся к насыщенному или частично ненасыщенному (т.е. с наличием одной или более двойных и/или тройных
10 связей в кольце) карбоциклическому радикалу с 3-20 атомами в кольце, в котором по меньшей мере один атом кольца представлен гетероатомом (азота, кислорода, фосфора и серы), а оставшиеся атомы в кольце представлены С, при этом один или несколько атомов в кольце в некоторых случаях могут быть замещены независимым образом одним или несколькими представленными ниже заместителями. Гетероцикл может быть представлен моноциклом, состоящим из 3-7-членного кольца (2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбираемых из N, O, P и S), или двойным кольцом, состоящим из 7-
15 10-членного кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбираемых из N, O, P и S), например: система из двойного кольца [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6]. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 - наше время), в частности, в
20 Томах 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. «Гетероциклил» также включает радикалы, при этом такие гетероциклические радикалы слиты с насыщенным, частично ненасыщенным или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваются, следующие: пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротииенил,
25 тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротииопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротииенил,
30 дигидрофуранил, пиразолидинилимидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, азабицикло[2.2.2]гексанил, 3Н-индолил хинолизинил и N-пиридилмочевина. В данное изобретение также включены спиро-молекулы. Примеры гетероциклической группы, в которой 2 атома углерода в кольце замещены атомами кислорода (=O), представлены пиримидинонилом и 1,1-диоксо-
35 тиоморфолинилом. Представленные здесь гетероциклические группы в некоторых случаях могут быть замещены независимым образом одним или несколькими представленными здесь заместителями.

Термин «гетероарил» относится к моновалентному ароматическому радикалу 5-, 6- или 7-членного кольца, и включает слитые кольцевые системы (по меньшей мере, с
40 одним ароматическим кольцом) из 5-20 атомов, содержащих один или несколько гетероатомов, которые выбираются независимым образом из атомов азота, кислорода и серы. Примеры гетероарильных групп представлены следующими: пиридинил (включая, например, 2-гидроксипиридинил), имидазолил, имидазопиридинил, пиримидинил (включая, например, 4-гидроксипиримидинил), пиразолил, триазолил,
45 пиразирил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуририл, оксидиазолил, триазолил, тиадиазолил, тиадиазолил, фуразанил,

бензофуразонил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридилил и фуropyридинил. Гетероарильные группы в некоторых случаях могут быть замещены независимым образом одним или несколькими представленными здесь заместителями.

5 Гетероциклические или гетероарильные группы могут быть связаны посредством углерода (углеродная связь) или азота (азотная связь), где это возможно. Например (не ограничиваясь), гетероциклы или гетероарилы соединены посредством углерода в положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, положении 2, 3, 4 или 5 фурана, 10 тетрагидрофурана, тифурана, тифена, пиррола или тетрагидропиррола, положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, положении 2 или 3 азиридина, положении 2, 3 или 4 азетидина, положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина.

Например (не ограничиваясь), гетероциклы или гетероарилы со связью посредством азота в положении 1 азаридина, азатидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3- 15 пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1Н-индазола, положении 2 изоиндола или изоиндолина, положении 4 морфолина и положении 9 карбазола или β-карболина.

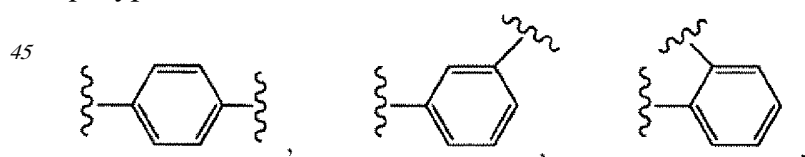
20 «Алкилен» относится к насыщенному, разветвленному, прямому или циклическому углеводородному радикалу из 1-18 атомов углерода, имеющего два моновалентных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходного алкана. Типичные радикалы алкилены включают, не ограничиваясь, следующие: метилен ($-\text{CH}_2-$), 1,2-этил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-пропил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-бутил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) и т.п.

«C₁-C₁₀ алкилен» является прямой, насыщенной углеводородной группой по формуле $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$. Примеры C₁-C₁₀ алкилена включают метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен и декален.

30 «Алкенилен» относится к насыщенному, разветвленному, прямому или циклическому углеводородному радикалу из 2-18 атомов углерода, имеющего два моновалентных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходного алкена. Типичные радикалы алкенилены включают, не ограничиваясь, следующие: 1,2-этилен ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

35 «Алкинилен» относится к насыщенному, разветвленному, прямому или циклическому углеводородному радикалу из 2-18 атомов углерода, имеющего два моновалентных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходного алкина. Типичные радикалы алкинилены включают, не ограничиваясь, следующие: ацетилен ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), пропаргил ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) и 4-пентинил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

«Арилен» является арильной группой, имеющей две ковалентные связи, которые могут находиться в орто, мета или пара положениях, как это показано на следующих фигурах:



при этом фенильная группа может быть не замещена или замещена вплоть до

четырьмя группами, включая, но не ограничиваясь, следующие: $-C_1-C_8$ алкил, $-O-(C_1-C_8$ алкил), -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -галоген, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; при этом каждый R' представлен независимым образом H , $-C_1-C_8$ алкилом или арилом.

«Арилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, соединенный с атомом углерода, как правило, sp^3 -атомом углерода, замещен арильным радикалом. Типичные арилалкильные группы включают, не ограничиваясь, следующие: бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и т.п. Арилалкильная группа состоит из 6-20 атомов углерода, например, молекулы алкила, включая алканильную, алкенильную или арилалкильную группы с 1-6 атомами углерода, и молекулы арила с 5-14 атомами углерода.

«Гетероарилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, соединенный с атомом углерода, как правило, sp^3 -атомом углерода, замещен гетероарильным радикалом. Типичные гетероарильные группы включают, но не ограничиваются, 2-бензимидазолилфенил, 2-фурилэтил и т.п. Гетероарилалкильная группа состоит из 6-20 атомов углерода, например, молекулы алкила, включая алканильную, алкенильную или гетероарилалкильную группы с 1-6 атомами углерода, и молекулы гетероарила с 5-14 атомами углерода и 1-3 гетероатомами (выбираемыми из N , O , P и S). Молекула гетероарила гетероарильной группы может быть представлена моноциклом, состоящим из 3-7-членного кольца (2-6 атомов углерода), или двойным кольцом, состоящим из 7-10-членного кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбираемых из N , O , P и S), например: система из двойного кольца [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6].

Термин «пролекарство» в контексте данной заявки на изобретение относится к предшественнику или производной форме фармацевтически активного вещества, обладающей меньшей цитотоксичностью относительно клеток опухоли в сравнении с исходным препаратом и способностью ферментативно активироваться или конвертироваться в более активную форму исходного препарата. См., например, *Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)* и *Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)*. Пролекарства по данному изобретению включают (но не ограничиваются) следующие: фосфат-содержащие пролекарства, тиофосфат-содержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептид-содержащие пролекарства, пролекарства с модифицированными D-аминокислотами, гликозилированные пролекарства, β -лактам-содержащие пролекарства, замещенные в некоторых случаях феноксиацетамид-содержащие пролекарства или замещенные в некоторых случаях фенилацетамид-содержащие пролекарства, 5-фторцитозин и другие 5-фторуридин пролекарства, которые могут быть конвертированы в более активные цитотоксичные и несвязанные препараты. Примеры цитотоксических препаратов, которые могут быть получены в форме пролекарства для использования в данном изобретении, включают, не ограничиваясь, описанные выше химиотерапевтические препараты.

Под «лучевой терапией» подразумевается использование направленных гамма-лучей или бета-лучей для индуцирования достаточного повреждения в клетке, что приводит к ограничению ее нормального функционирования или уничтожению клетки. Для определения дозы и продолжительности лечения в науке известен целый ряд способов.

Типичное лечение принимается в виде однократного введения, а типичные дозы варьируют от 10 до 200 единиц (Грей) в сутки.

«Метаболит» является продуктом, полученным в результате метаболизма в организме специфического соединения или его соли. Метаболиты соединения могут быть идентифицированы с использованием стандартных способов, известных науке, а их активность может быть определена с использованием описанных здесь тестов. Такие продукты могут быть получены, например, в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации, дезэтерификации, ферментативного расщепления и т.п. введенного соединения. В соответствии с этим, изобретение включает метаболиты соединений по изобретению, включая соединения, полученные в ходе процесса, состоящего из контакта соединения по изобретению с млекопитающим в течение периода, достаточного для получения продукта метаболизма.

«Липосома» представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или сурфактанта, и может использоваться для доставки препарата в организме млекопитающего. Компоненты липосомы обычно размещаются в виде двух слоев, подобно размещению липидов в биологической мембране.

«Линкер» обозначает химическую молекулу, состоящую из ковалентной связи или цепи атомов, которые ковалентным образом присоединяют антитело к молекуле препарата. В различных вариантах воплощения изобретения линкеры включают двухвалентный радикал, например, алкилдиил, арилен, гетероарилдиил, такие молекулы, как $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, повторяющиеся единицы алкилокси (например, полиэтиенокси, ПЭГ, полиметиленокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, Jeffamine™); а также двухкислотные эфиры и амиды, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолат, малонат и капроамид.

Термин «хиральный» относится к молекулам, обладающим свойством неналожимости зеркального партнера, в то время как термин «ахиральный» относится к молекулам, налагающимся на своего зеркального партнера.

Термин «стереоизомеры» относится к соединениям, имеющим идентичное химическое строение, но отличающимся взаимным расположением атомов или групп в пространстве.

«Диастереоизомер» относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальными отображениями один для другого. Диастереоизомеры обладают различными физическими свойствами, например, температурами плавления, кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереоизомеров могут быть разделены с использованием аналитических процедур с высоким разрешением, таких как электрофорез и хроматография.

«Энантиомеры» относятся к двум стереоизомерам соединения, не являющимся зеркальным отображением друг друга.

Используемые здесь стереохимические определения и принципы представлены в S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Много органических соединений существует в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость поляризованного света. При описании оптически активного соединения, приставки D и L или R и S, используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Приставки d и l или (+) и (-) используются для обозначения признака вращения в плоскости поляризованного света соединением, при этом (-) или l обозначает, что соединение является левовращательным.

Соединение с приставкой (+) или d является правовращательным.

Для отдельной химической структуры такие стереоизомеры идентичны, за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга.

Специфический стереоизомер также может относиться к энантиомеру, и смесь таких
 5 изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров в соотношении 50:50 относится к рацематной смеси или рацемату, которая может образоваться при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в химической реакции или процессе. Термины «рацематная смесь» и «рацемат» относятся к эквимольной смеси двух видов энантиомеров, лишенных оптической активности.

10 Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с разными зарядами, которые могут переходить друг в друга посредством низкоэнергетичного барьера. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопереходы посредством миграции протона, например, кето-энольные и имино-энаминные изомеризации. Валентные таутомеры
 15 включают взаимопереходы посредством реорганизации некоторых участвующих в образовании связи электронов.

В контексте данного изобретения фраза «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Типичные соли включают, но не ограничиваются,
 20 следующие: сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицинат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентисинат, fumarat, глюконат, глюкуроонат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метасульфонат «мезилат», этансульфонат, бензенсульфонат, *p*-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилеи-бис(2-
 25 гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может включать другую молекулу, такую как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть представлен любым органическим или неорганическим ионом, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может в своей структуре иметь более одного заряженного атома. В случаях, когда
 30 несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, такая соль может иметь несколько противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Если соединение по изобретению является основанием, фармацевтически приемлемая
 35 соль может быть получена любым подходящим и представленным в науке способом, включая, например, реакцию свободного основания с неорганической кислотой, такой как хлороводородная кислота, бромоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и т.п., или с органической кислотой, такой как уксусная кислота, трифторуксусная кислота, малеиновая кислота,
 40 янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пируватная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозиильная кислота, такая как глюкуроновая кислота или галактуриновая кислота, альфа-гидроксикислота, такая как лимонная кислота или винная кислота, аминокислота, такая как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматическая кислота,
 45 такая как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновая кислота, такая как *p*-толуолсульфоновая кислота этансульфоновая кислота или т.п.

Если соединение по изобретению является кислотой, необходимая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим способом, например,

реакцией свободной кислоты с органическим или неорганическим основанием, таким как амин (первичный, вторичный или третичный), гидроксидом щелочного металла или гидроксидом щелочноземельного металла или т.п. Иллюстративные примеры подходящих солей включают, но не ограничиваются, органические соли, полученные из аминокислот, таких как глицин и аргинин, аммония, первичных, вторичных и третичных аминов, и циклических аминов, таких как пиперидин, морфолин и пиперазин, неорганические соли, полученные из натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

Фраза «фармацевтически приемлемый» указывает, что вещество или композиция по своим химическим и/или токсическим свойствам должна быть совместимой с другими ингредиентами, составляющими композицию, и/или млекопитающим, подвергнутому лечению.

«Сольват» относится к ассоциации или комплексу из одной или нескольких молекул растворителя и соединения по изобретению. Примеры растворителей для образования сольватов включают, но не ограничиваются, воду, изопропанол, этанол, метанол, ДМСО, этилацетат, уксусную кислоту и этаноламин. Термин «гидрат» относится к комплексу, если молекула растворителя представлена водой.

Термин «защитная группа» относится к заместителю, который обычно используется для блокирования или защиты отдельной функциональной способности, при этом в реакцию вступают другие функциональные группы соединения. Например, «аминозащитная группа» является заместителем, присоединенным к аминогруппе и блокирующим или защищающим аминные свойства соединения. Подходящие аминозащитные группы включают ацетил, трифторацетил, t-бутоксикарбонил (BOC), бензилоксикарбонил (CBZ) и 9-фторэтилметиленоксикарбонил (Fmoc). Подобным образом, «гидроксильная защитная группа» относится к заместителю гидроксильной группы, который блокирует или защищает функциональную способность гидроксила. Подходящие защитные группы включают ацетил и силил. «Карбоксильная защитная группа» относится к заместителю карбоксильной группы, который блокирует или защищает функциональную способность карбоксила. Обычно используемые карбоксил-защитные группы включают фенилсульфонилэтил, цианозтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-(триметилсилил)этоксиметил, 2-(p-толуолсульфонил)этил, 2-(p-нитрофенилсульфонил)этил, 2-(дифенилфосфино)-этил, нитроэтил и т.п. Общее описание защитных групп и их использование представлено в T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

«Замещаемая группа» относится к функциональной группе, которая может быть замещена другой функциональной группой. Определенные замещаемые группы хорошо известны науке и их примеры включают, не ограничиваясь, следующие: галиды (например, хлорид, бромид, йодид), метансульфонил (мезил), p-толуолсульфонил (тозил), трифторметилсульфонил (трифлат) и трифторметилсульфонат.

Сокращения

ЛИНКЕРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ:

MC = 6-малеимидокапроил

Val-Cit или «vc» = валин-цитруллин (типичный дипептид в расщепляемом протеазой линкере)

Citrulline = 2-амино-5-уреидопентановая кислота

PAB = p-аминобензиооксикарбонил (пример «саможертвующего» линкерного компонента)

Me-Val-Cit = N-метил-валин-цитруллин (пептидная связь линкера была

модифицирована для предотвращения его расщепления катепсином В)

МС(PEG)6-ОН = малеимидокапроил- полиэтиленгликоль (может быть присоединен к цистеину в антителах).

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ:

5 ММАЕ = монометилауристатин Е (MW 718)

ММАF = вариант ауристатина Е (ММАЕ) с фенилаланином на С-конце препарата (MW 731.5)

ММАF-DMAEA = ММАF с DMAEA (диметиламиноэтиламин) в амидной связи с С-концевым фенилаланином (MW 801.5)

10 ММАF-TEG = ММАF с тетраэтиленгликолем, этерифицированным к фенилаланину

ММАF-NtBu = N-t-бутил, присоединенный в виде амида к С-концу ММАF

DM1 = N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтансин

DM3 = N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин

DM4 = N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтансин

15 Дальнейшие сокращения представлены следующими: АЕ = ауристатин Е, Вос =

N-(t-бутоксикарбонил), cit = цитруллин, dar = долапроин, DCC = 1,3-

дициклогексикарбодиимид, DCM = дихлорметан, DEA = диэтиламин, DEAD =

диэтилазодикарбоксилат, DEPC = диэтилфосфонилцианидат, DIAD =

диизопропилазодикарбоксилат, DIEA = N,N-диизопропиленамин, dil = долаизолейцин,

20 DMA = диметилацетамид, DMAP = 4-диметиламинопиридин, DME = этиленгликоль-

диметиловый эфир (или 1,2-диметоксиэтан), DMF = N,N-диметилформамид, DMSO =

диметилсульфоксид, doe = долафенин, dov = N,N-диметилвалин, DTNB = 5,5'-дителиобис

(2-нитробензойная кислота), DTPA = диэтилентриаминапентауксусная кислота, DTT =

дителиотреитол, EDCI = 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид,

25 EEDQ = 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин, ES-MS = масс-спектрометрия

с электрораспылением, EtOAc = этилацетат, Fmoc = N-(9-фторэтилметоксикарбонил),

gly = глицин, HATU = O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония

гексафторфосфат, HOBt = 1-гидроксибензотриазол, ВЭЖХ = высокоэффективная

жидкостная хроматография, ile = изолейцин, lys = лизин, MeCN (CH₃CN) = ацетонитрил,

30 MeOH = метанол, Mtr = 4-анисилдифенилметил (или 4-метокситритил), nor = (1S, 2R)-(+)

-норэфедрин, ФСБ = фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), ПЭГ = полиэтиленгликоль, Ph

= фенил, Pnp = p-нитрофенил, МС = 6-малеимидокапроил, phe = L-фенилаланин, PyBop

= бром-трис-пирролидинофосфония гексафторфосфат, SEC = эксклюзионная

хроматография, Su = сукцинимид, TFA = трифторуксусная кислота, TLC = тонкослойная

35 хроматография, УФ = ультрафиолет и val = валин.

«Несвязанная аминокислота цистеин» относится к остатку цистеиновой кислоты, который был введен в исходное антитело в ходе рекомбинации, имеет тиоловую функциональную группу (-SH) и не соединен внутримолекулярным или межмолекулярным дисульфидным мостиком.

40 Термин «значение реакционной способности тиола» является количественной характеристикой реакционной способности несвязанной аминокислоты цистеин.

Значение реакционной способности тиола является процентным показателем количества несвязанной аминокислоты цистеин в антителе с введенным в ходе рекомбинации цистеином, которая реагирует с тиоловым реагентом; такое значение преобразуется в

45 максимальное значение, равное 1. Например, несвязанная аминокислота цистеин в антителе с введенным в ходе рекомбинации цистеином, реагирующим со 100% выходом с тиоловым реагентом, таким как реагент биотин-малеимид, с образованием меченого биотином антитела, имеет значение реакционной способности тиола 1,0. Другая

аминокислота цистеин, введенная в ходе рекомбинации в это же самое или другое исходное антитело, реагирующее с 80% выходом с тиоловым реагентом, имеет значение реакционноспособности тиола 0,8. Другая аминокислота цистеин, введенная в ходе рекомбинации в это же самое или другое исходное антитело, которое вообще не вступает в реакцию с тиоловым реагентом, имеет значение реакционноспособности тиола 0. Определение значения реакционноспособности тиола отдельного цистеина может проводиться в ходе ИФА, масс-спектрологии, жидкостной хроматографии, ауторадиографии или других количественных анализов.

«Исходное антитело» является антителом, состоящим из аминокислотной последовательности, в которой один или несколько аминокислотных остатков замещены одним или несколькими остатками цистеина. Исходное антитело может состоять из нативной последовательности или последовательности дикого типа. Исходное антитело может иметь существовавшие ранее модификации аминокислотной последовательности (такие как вставки, делеции и/или замены) относительно нативной, модифицированной формы или формы дикого типа антитела. Исходное антитело может быть направлено относительно антигена-мишени, например, биологически важного полипептида. Антитела, направленные относительно неполипептидных антигенов (таких как опухолеассоциированных гликолипидных антигенов, см. US 5091178) также учитываются.

Таблица 1

```

/*
*
* C-C повышено с 12 до 15
5  * Z - среднее значение EQ
* B - среднее значение ND
* совпадение с разрывом представлено _M; стоп-стоп = 0; J (джокер) совпадение = 0
*/
#define      _M      -8      /* значение совпадения с разрывом */

10 int      _day[26][26] = {
/*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
15 /* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
20 /* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
25 /* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
30 /* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
35 /* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

```

40

45

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* максимальный скачок по диагонали */
#define MAXGAP 24 /* е продолжать накладывать штраф на гэпы длиннее
этого */
#define JMPS 1024 /* максимальный скачок в пути */
#define MX 4 /* сохранить, если есть по меньшей мере одно
основание MX-1 с момента последнего скачка */

#define DMAT 3 /* значение совпадающих оснований */
#define DMIS 0 /* штраф для несовпадающих оснований */
#define DINS0 8 /* штраф за гэп */
#define DINS1 1 /* штраф за основание */
#define PINS0 8 /* штраф за гэп */
#define PINS1 4 /* штраф за остаток */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* размер скачка (отрицательный для dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* номер основания при скачке в
последовательности x */
}; /* ограничивает последовательность до 2^16 -1 */

struct diag {
    int score; /* балл при последнем скачке */
    long offset; /* смещение предыдущего блока */
    short ijmp; /* индекс текущего скачка */
    struct jmp jp; /* список скачков */
};

struct path {
    int spc; /* количество лидирующих пробелов */
    short n[JMPS]; /* список скачка (гэпа) */
    int x[JMPS]; /* расположение скачка (последний элемент перед гэпом) */
};

char *ofile; /* имя выходного файла */
char *namex[2]; /* названия последовательностей: getseqs() */
char *prog; /* название программы для сообщений об ошибках */
char *seqx[2]; /* последовательности: getseqs() */
int dmax; /* лучшая диагональ: nw() */
int dmax0; /* конечная диагональ */
int dna; /* устанавливается, если ДНК: основная */
int endgaps; /* устанавливается, если налагается штраф на
окончание гэпа */
int gapx, gapy; /* общее количество гэпов в последовательности */
int len0, len1; /* длина последовательности */

int ngapx, ngapy; /* общий размер гэпов */
int smax; /* максимальный балл: nw() */
int *xbm; /* битовая матрица для сравнения */
long offset; /* текущее смещение в файле скачка */
struct diag *dx; /* удержание диагоналей */
struct path pp[2]; /* удержание пути для последовательностей */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/* Программа выравнивания Нидлмана-Вунша
*
* использование: программный файл 1 файл 2
* где файл 1 и файл 2 представляют последовательности двух ДНК или двух белков
* Последовательности могут быть указаны в верхнем или нижнем регистре и могут
содержать двусмысленность
* Любые строки, начинающиеся с «;», «>» или «<», игнорируются
* Максимальная длина файла 65535 (ограничена беззначным знаком «x» в структуре
скачка)
* Последовательность с 1/3 или более элементов ACGTU считается ДНК
* Результат представлен в файле «align.out»
*
* Программа может создать временный файл в /tmp для сохранения информации об
отслеживании
* Оригинальная версия разработана на BSD 4.3 с vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1,2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 для наложения штрафа на конечные гэпы */
    ofile = "align.out"; /* выходной файл */

    nw(); /* заполнение матрицы, получение возможных скачков */
    readjumps(); /* получение фактических скачков */
    print(); /* печать статистики, выравнивания */

    cleanup(0); /* отсоединить любые временные файлы */
}

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/* сделать выравнивание, вернуть наилучшее значение: основная()
* ДНК: значения по Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: RAM 250 значений
5 * Если баллы равны, мы предпочитаем несоответствия любому гэпу, предпочтительнее
* новому гэпу для расширения текущего гэпа, и предпочтительнее гэпу в
последовательности x
* гэпу в последовательности y.
*/
nw()
10 {
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx; /* keep track of delx */
    int        *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;          /* score for each type */
    int        ins0, ins1; /* insertion penalties */
15    register   id;          /* diagonal index */
    register   ij;          /* jmp index */
    register   *col0, *col1; /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;       /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
20    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
25    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
30    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
35    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
40            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
45        }
    }

```

Таблица 1 (продолжение)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* обновление штрафа для делеции в последовательности x;
     * предпочтение новой делеции в сравнении с текущей делецией
     * игнорирование MAXGAP в случае взвешенных конечных гэпов
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* обновление штрафа для делеции в последовательности y;
     * предпочтение новой делеции в сравнении с текущей делецией
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* использование максимального балла; предпочтительнее
     * несоответствие в любой делеции и делеции x в сравнении с
     * делецией y
     */

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;

```

...nw

Таблица 1 (продолжение)

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
5      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
10      offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
15  }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
20      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
25      }
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
        }
    }
30  if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (col1[yy] > smax) {
35      smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
40  col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
45  (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);
}

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
*
* print() – только видимые за пределами этого модуля
*
5  * static:
* getmat() – отслеживание лучшего пути, счетчик несоответствий: print()
* pr_align() – печать описанного выравнивания в матрице p[]: print()
* dumpblock() – распечатка блока строк с числами, stars: pr_align()
* nums() – выделение номера строки: dumpblock()
* putline() – выделение строки (название, [num], последовательность, [num]):
10 dumpblock()
* stars() – вставка линии со звездочками: dumpblock()
* stripname() – полоска любого пути и приставка из последовательности
*/

#include "nw.h"

15 #define SPC 3
#define P_LINE 256 /* максимальная исходящая строка */
#define P_SPC 3 /* расстояние между названием или номером и
последовательностью */

extern _day[26][26];
20 int olen; /* установка длины исходящей строки */
FILE *fx; /* выходной файл */

print()
{
25 int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
cleanup(1);
}
fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
30 fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
olen = 60;
lx = len0;
ly = len1;
firstgap = lastgap = 0;
if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
35 pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
ly -= pp[0].spc;
}
else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
lx -= pp[1].spc;
}
40 if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
lastgap = len0 - dmax0 - 1;
lx -= lastgap;
}
else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
45 lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
ly -= lastgap;
}
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
pr_align();
}

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * отслеживание лучшего пути, счетчик несоответствий
 */
static
5 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
10    double  pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
15    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
20        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
25            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
30                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
35        }
    }

    /* гомология pct:
     * при наложении штрафа, основание является самой короткой
    последовательностью
40     * также сброс лишних показателей и получение более короткого основного
    элемента
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
45        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<9%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "": "s");
5     fprintf(fx, "%s", outx);
fprintf(fx, "<, gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "": "s");
10     fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
15     else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
20     fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "": "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "": "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
25 }
static nm; /* соответствий в основном элементе – для проверки */
static lmax; /* длина незаполненных имен файлов */
static ij[2]; /* индекс скачка для пути */
static nc[2]; /* число в начале текущей строки */
static ni[2]; /* текущий номер элемента – для образования гэпа */
static siz[2];
30 static char *ps[2]; /* ptr для текущего элемента */
static char *po[2]; /* ptr для следующей выходящей диаграммы */
static char out[2][P_LINE]; /* исходящая строка */
static char star[P_LINE]; /* устанавливается stars() */
/*
* печать описанного выравнивания в структурном пути pp[]
35 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
40     register i;
    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
45         nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }

```

pr_align

Таблица 1 (продолжение)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
5         * есть ли у нас больше этой последовательности?
        */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* ведущий пропуск */
10            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* в гэпе */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
15        }
        else { /* используем элемент последовательности
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
20            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
            * находимся ли мы на следующем гэпе этой
            последовательности?
            */
25            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                * необходимо объединить все гэпы
                * в этом положении
                */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
30                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
35    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
40 }
/*
* распечатка блока строк с числами, stars: pr_align()
*/
static
dumpblock()
45 {
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

dumpblock

Таблица 1 (продолжение)
...dumpblock

```

5      (void) putc('\n', fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
              if (i == 0)
                  nums(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  stars();
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[1])
10                 fprintf(fx, star);
              if (i == 1)
                  nums(i);
          }
      }
15  }
  /*
  * выделение номера строки: dumpblock()
  */
  static
  nums(ix)                                nums
20  {
      int    ix;    /* индекс в строке последовательности [] */
      char    nline[P_LINE];
      register    i, j;
      register char *pn, *px, *py;
      for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
          *pn = ' ';
25  for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
      if (*py == ' ' || *py == '-')
          *pn = ' ';
      else {
          if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
30              j = (i < 0)? -i : i;
              for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                  *px = j%10 + '0';
              if (i < 0)
                  *px = '-';
          }
          else
35              *pn = ' ';
          i++;
      }
  }
  *pn = '\0';
  nc[ix] = i;
40  for (pn = nline; *pn; pn++)
      (void) putc(*pn, fx);
  (void) putc('\n', fx);
  }
  /*
45  * выделение строки (название, [num], последовательность, [num]): dumpblock()
  */
  static
  putline(ix)                                putline
  int    ix;
  {

```

Таблица 1 (продолжение)

...putline

```

5      int          i;
      register char *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void) putc(*px, fx);
      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

10     /* отсчет ведется от 1:
      * ni[] является текущим элементом (от 1)
      /*nc[] является числом в начале текущей строки
      */
      for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
15     (void) putc('\n', fx);
    }

    /*
    * ввод линии звездочек (последовательность всегда в out[0], out[1]): dumpblock()
20    */
    static
    stars()
    {
        int          i;
        register char *p0, *p1, cx, *px;

25        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
            !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
            return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
30            *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
            if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

35                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
                    nm++;
                }
                else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                    cx = '!';
                else
40                    cx = ' ';
            }
            else
                cx = ' ';
            *px++ = cx;
        }
45     *px++ = '\n';
     *px = '\0';
    }

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * полоса пути или приставка из pn, возврат len: pr_align()
 */
5  static
  stripname(pn)                                     stripname
  {
    char *pn; /* имя файла (можно пути) */
    register char *px, *py;

10    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
15    return(strlen(pn));
  }

```

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
20  * cleanup() – очистка любого временного файла
  * getseq() – считывание в последовательности, ДНК, длине, максимальной длине
  * g_calloc() -- calloc() с проверкой ошибок
  * readjumps() – получение хороших скачков, при необходимости, из временного файла
  * writejumps() – запись заполненной матрицы скачков во временный файл: nw()
  */
25  #include "nw.h"
  #include <sys/file.h>

  char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* временный файл для скачков */
  FILE *fj;
30  int cleanup(); /* очистка временного файла */
  long lseek();
  /*
  * удаление любого временного файла в случае превышения размера
  */
  cleanup(i)                                     cleanup
35  {
    int i;
    {
      if (fj)
          (void) unlink(jname);
      exit(i);
    }
40  }
/*
  * считывание в последовательности, ДНК, длине, максимальной длине
  * пропуск строк, начинающихся с «;», «<» или «>»
  * последовательность в верхнем или нижнем регистре
  */
45  char *
  getseq(file, len)                               getseq

```



```

char *file; /* имя файла */
int *len; /* длина последовательности */
{
    char line[1024], *pseq;
5    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
10    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
15            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
20        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

Таблица 1 (продолжение)
...getseq

```

25    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
    rewind(fp);
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
30        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
35                natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
40    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_calloc(msg, nx, sz)
45

```

g_calloc

```

char *msg; /* программа, вызывающая стандартные */
int nx, sz; /* номер и размер элементов */
{
    char *px, *calloc();
5    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
            nx, sz);
            exit(1);
        }
10    }
    return(px);
}

/*
 * получение конечных скачков из dx[] или временного файла, установка pp[], сброс
15 dmax: main()
 */
readjumps() readjumps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
20    register i, j, xx;
    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
25            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
30            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;



Таблица 1 (продолжение)  
...readjumps


            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
35                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset,
                sizeof(dx[dmax].offset));
                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
            }
            else
40                break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
45

```

```

    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
5         pp[1].n[i1] = -siz;
          xx += siz;
          /* id = xx - yy + len1 - 1 */
          pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
          gapy++;
          ngapy -= siz;
10      /* игнорирование MAXGAP при получении финальных гэпов */
          siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
          i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
15         pp[0].n[i0] = siz;
          pp[0].x[i0] = xx;
          gapx++;
          ngapx += siz;
          /* игнорирование MAXGAP при получении финальных гэпов */
          siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
20         i0++;
    }
    }
    else
        break;
}
25 /* порядок скачков в обратном порядке */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
30         i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
35    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }
}
40

```

45

Таблица 1 (продолжение)

```

/*
 * запись заполненной структуры скачка в предыдущий (если есть): nw()
 */
5 writejumps(ix)                                writejumps
    int    ix;
    {
        char *mktemp();

10        if (!fj) {
            if (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
15                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
20    }

```

III. Композиции и способы изобретения

Изобретение описывает антитела к FcRH5 или их функциональные фрагменты, а также способ их использования в лечении гематобластозов.

В одном аспекте изобретение описывает антитело, которое связывается, преимущественно специфически, с любым из описанных выше или ниже полипептидов. В некоторых случаях антитело представлено моноклональным антителом, фрагментом антитела, включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диателом, антителом с одним доменом, химерным антителом, гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом или антителом, которое конкурентным образом ингибирует связывание полипептидного антитела к FcRH5 с соответствующей антигенной детерминантой. Антитела данного изобретения могут быть в некоторых случаях представлены в виде конъюгатов с препаратами-ингибиторами роста или цитотоксическим агентом, например, токсином, включая, например, ауристин, майтансиноид, производное долостатина или калихимицина, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или т.п. Антитела данного изобретения могут в некоторых случаях вырабатываться в клетках СНО или бактериальных клетках, и преимущественно индуцировать гибель клетки, с которой они связываются. В целях определения, антитела данного изобретения могут быть помечены, присоединены к твердому субстрату или

40 Т.П.

В одном аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом моновалентная аффинность антитела к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) практически такая же, что и моновалентная аффинность мышинового антитела (например, аффинность мышинового антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5), и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO:

20).

В другом аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом моновалентная аффинность антитела к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) ниже, например, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 раз, чем моновалентная аффинность мышинового антитела (например, аффинность мышинового антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5), и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом моновалентная аффинность антитела к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) выше, например, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз, чем моновалентная аффинность мышинового антитела (например, аффинность мышинового антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5), и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В одном аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) практически такая же, что и аффинность мышинового антитела (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента Fab к FcRH5) в его двухвалентной форме, и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) ниже, например, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 раз, чем аффинность мышинового антитела (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента IgG к FcRH5), и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом аспекте изобретения описано гуманизированное антитело к FcRH5, при этом аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) выше, например, по меньшей мере, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз, чем аффинность мышинового антитела (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) или химерного антитела (например, аффинность химерного антитела в виде фрагмента IgG к FcRH5) в его двухвалентной форме, и такое гуманизированное антитело к FcRH5 состоит существенным образом из последовательностей переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи, как это указано на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5,

(например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет $0,5 \pm 0,1$ нМ.

В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет 0,4 нМ или больше.

- 5 В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет 0,5 нМ или больше.
- В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме
- 10 (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет 0,6 нМ или больше.
- В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, отличающееся тем, что аффинность антитела к FcRH5 в его двухвалентной форме (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет 0,7 нМ или больше.
- В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, которое отличается тем, что аффинность антитела в его двухвалентной форме к FcRH5
- 15 (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет от 0,3 нМ до 0,7 нМ.
- В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, которое отличается тем, что аффинность антитела в его двухвалентной форме к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет от 0,4 нМ до 0,6 нМ.
- 20 В другом своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело к FcRH5, которое отличается тем, что аффинность антитела в его двухвалентной форме к FcRH5 (например, аффинность антитела в виде IgG к FcRH5) составляет от 0,5 нМ до 0,55 нМ.

- В одном аспекте изобретения моновалентная аффинность мышинового антитела к FcRH5 практически такая же, что и аффинность связывания фрагмента Fab, состоящего
- 25 из последовательностей вариабельного домена, представленных на Фигуре 9 (SEQ ID NO: 18) и Фигуре 10 (SEQ ID NO: 20).

- Как это хорошо известно в науке, аффинность связывания лиганда со своим рецептором может определяться с использованием любого из целого ряда анализов и выражена с использованием целого ряда количественных значений. Согласно этому,
- 30 в одном варианте воплощения изобретения аффинность связывания выражается в виде значений K_d и отражает свойственную антителу аффинность связывания (например, со сведенными к минимум эффектами авидности). Как правило и преимущественным образом, аффинность связывания измеряется *in vitro* с использованием ассоциированных клеток или без них. Как это более подробно описывается ниже, кратная разница в
- 35 значении аффинности связывания может быть определена количественно в виде соотношения значения моновалентной аффинности связывания гуманизированного антитела (например, в форме Fab) и значения моновалентной аффинности связывания эталонного антитела/антитела сравнения (например, в форме Fab) (например, мышинное антитело, имеющее донорские последовательности гипервариабельного участка), при
- 40 этом значения аффинности связывания определяются при одинаковых условиях анализа. Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения кратная разница в значении аффинности связывания определяется как соотношение значений K_d гуманизированного антитела в форме Fab и упомянутого эталонного антитела/антитела сравнения Fab.
- Например, в одном варианте воплощения изобретения, если антитело по изобретению
- 45 (А) имеет значение аффинности, которое в «3 раза меньше», чем аффинность эталонного антитела (М), и если значение K_d для А составляет $3x$, значение K_d для М будет составлять $1x$, и соотношение K_d для А к K_d для М будет составлять 3:1. С другой стороны, в одном варианте воплощения изобретения если антитело по изобретению

(С) имеет значение аффинности, которое в «3 раза меньше», чем аффинность эталонного антитела (R), и если значение Kd для С составляет 1х, значение Kd для R будет составлять 3х, и соотношение Kd для С к Kd для R будет составлять 1:3. Для получения значений аффинности связывания может использоваться целый ряд анализов, известных науке, включая описанные здесь анализы, например, Вiasore, радиоиммуноанализ (РИА) и ИФА.

В одном аспекте изобретения описано антитело, связывающееся с FcRH5, и такое антитело включает:

(а) по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или шесть ГВУ, выбранных из следующей группы:

(i) HVR-L1, включающий последовательность KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, включающий последовательность SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, включающий последовательность QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, включающий последовательность GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR-H2, включающий последовательность ATISSGGSLTFYLDVSR (SEQ ID NO: 36); и

(vi) HVR-H3, включающий последовательность PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37).

В одном варианте воплощения изобретения HVR-L1 антитела по изобретению включают последовательность SEQ ID NO: 26. В одном варианте воплощения

изобретения HVR-L2 антитела по изобретению включают последовательность SEQ ID NO: 27. В одном варианте воплощения изобретения HVR-L3 антитела по изобретению

включают последовательность SEQ ID NO: 28. В одном варианте воплощения

изобретения HVR-H1 антитела по изобретению включают последовательность SEQ ID NO: 35. В одном варианте воплощения изобретения HVR-H2 антитела по изобретению

включают последовательность SEQ ID NO: 36. В одном варианте воплощения

изобретения HVR-H3 антитела по изобретению включают последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению, состоящее

из таких последовательностей (в указанной здесь комбинации) представлено гуманизированным или человеческим антителом.

В одном аспекте изобретения описано антитело, связывающееся с FcRH5, и такое антитело включает:

(а) по меньшей мере, один, два, три, четыре, пять или шесть ГВУ, выбранных из следующей группы:

(i) HVR-L1, включающий последовательность KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, включающий последовательность SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, включающий последовательность QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, включающий последовательность GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR-H2, включающий последовательность ATISSGGSLTFYLDVSR (SEQ ID NO: 36); и

(vi) HVR-H3, включающий последовательность PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37); и

(б) по меньшей мере, один вариант ГВУ, в котором последовательность такого варианта ГВУ включает модификацию, по меньшей мере, одного остатка последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 или 37. В одном варианте воплощения

изобретения HVR-L1 антитела по изобретению включает последовательность SEQ ID NO: 26. В одном варианте воплощения изобретения HVR-L2 антитела по изобретению

включает последовательность SEQ ID NO: 27. В одном варианте воплощения изобретения HVR-L3 антитела по изобретению включает последовательность SEQ ID NO: 28. В

одном варианте воплощения изобретения HVR-H1 антитела по изобретению включает

последовательность SEQ ID NO: 35. В одном варианте воплощения изобретения HVR-H2 антитела по изобретению включает последовательность SEQ ID NO: 36. В одном варианте воплощения изобретения HVR-H3 антитела по изобретению включает последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению, состоящее из таких последовательностей (в указанной здесь комбинации), представлено гуманизированным или человеческим антителом.

В одном аспекте изобретения описано антитело, состоящее из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести ГВУ, при этом каждый ГВУ существенным образом состоит из последовательности, выбираемой из группы последовательностей SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 или 37, а SEQ ID NO: 26 соответствует HVR-L1, SEQ ID NO: 27 соответствует HVR-L2, SEQ ID NO: 28 соответствует HVR-L3, SEQ ID NO: 35 соответствует HVR-H1, SEQ ID NO: 36 соответствует HVR-H2, и SEQ ID NO: 37 соответствует HVR-H3. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит из HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, при этом каждый такой ГВУ включает последовательность SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 и 37.

Варианты ГВУ в антителе изобретения могут иметь модификации одного или нескольких остатков в ГВУ.

Терапевтический агент для использования в субъекте-хозяине преимущественным образом вызывает небольшой иммунный ответ относительно агента в указанном субъекте или не вызывает иммунный ответ. В одном варианте воплощения изобретения описан подобный агент. Например, в одном варианте воплощения изобретения описано гуманизированное антитело, вызывающее и/или, как ожидается, будет вызывать ответ к человеческому антимышиному антителу (НАМА) при достаточно сниженной концентрации в сравнении с антителом, состоящим из последовательности SEQ ID NO: 18 и 20, в организме-хозяине. В другом примере изобретение описывает гуманизированное антитело, вызывающее и/или, как ожидается, которое будет вызывать минимальный ответ к человеческому антимышиному антителу (НАМА) или не вызывать такой ответ. В одном примере антитело по изобретению вызывает ответ к антимышиному антителу, и такой ответ вызывается при концентрации на уровне или менее клинически допустимой концентрации.

Гуманизированное антитело по изобретению может включать одну или несколько человеческих и/или человеческих консенсусных последовательностей гипервариабельного участка (например, каркасного участка) вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах воплощения изобретения в человеческой и/или человеческой консенсусной последовательности других участков (не гипервариабельных) присутствует одна или несколько дополнительных модификаций. В одном варианте воплощения изобретения вариабельный домен тяжелой цепи антитела по изобретению состоит из консенсусной последовательности каркасного участка человека, при этом в одном варианте воплощения изобретения такая последовательность представлена консенсусной последовательностью каркасного участка III подгруппы. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит из консенсусной последовательностью каркасного участка III подгруппы с модифицированной, по меньшей мере, одной аминокислотой в одном положении. В одном варианте воплощения изобретения вариабельный домен легкой цепи антитела по изобретению состоит из консенсусной последовательности каркасного участка человека, при этом в одном варианте воплощения изобретения такая последовательность представлена консенсусной последовательностью каркасного участка κI. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит из вариантной

консенсусной последовательности каркасного участка κI с модифицированной, по меньшей мере, одной аминокислотой в одном положении.

Кроме того, науке известно, что положение аминокислоты/разграничение гипервариабельного участка антитела может варьировать в зависимости от контекста и различных известных науке определений (более подробное описание представлено ниже). Некоторые положения в вариабельном домене могут быть представлены гибридными гипервариабельными положениями, и такие положения включены в гипервариабельный участок при одних и тех же критериях; кроме того, такие гибридные гипервариабельные положения находятся за пределами гипервариабельного участка при разных критериях. Одно или несколько таких положений также могут отмечаться в расширенных гипервариабельных участках (как это указано ниже). Изобретение описывает антитела, состоящие из модификаций в таких гибридных гипервариабельных положениях. В одном варианте воплощения изобретения такие гипервариабельные положения включают одно или несколько положений 26-30, 33-35В, 47-49, 57-65, 93, 94 и 101-102 в вариабельном домене тяжелой цепи. В одном варианте воплощения изобретения такие гибридные гипервариабельные положения включают одно или несколько положений 24-29, 35-36, 46-49, 56 и 97 в вариабельном домене легкой цепи. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит из варианта консенсусной последовательности каркасного участка подгруппы с модифицированными одним или несколькими гибридными гипервариабельными положениями.

В одном аспекте антитело по изобретению состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего вариантную консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы III человека, модифицированную в одном или нескольких положениях 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 и 101.

В одном аспекте антитело по изобретению состоит из вариабельного домена легкой цепи, включающего вариантную консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы I каппа человека, модифицированную в одном или нескольких положениях 24, 27-29, 56 и 97.

В одном аспекте антитело по изобретению состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего вариантную консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы III человека, модифицированную в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или положениях 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 и 101.

В одном аспекте антитело по изобретению состоит из вариабельного домена легкой цепи, включающего вариантную консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы I каппа человека, модифицированную в положении 1, 2, 3, 4, 5 или во всех положениях 24, 27-29, 56 и 97.

Антитело по изобретению может состоять из любых подходящих консенсусных последовательностей каркасного участка легкой цепи человека, и такое антитело обладает необходимыми биологическими характеристиками (например, необходимой аффинностью связывания). В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит, по меньшей мере, из участка (или полной) последовательности каркасного участка легкой каппа-цепи человека. В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению состоит, по меньшей мере, из участка (или полной) консенсусной последовательности каркасного участка подгруппы I каппа-цепи человека.

В одном аспекте антитело по изобретению состоит из вариабельных доменов тяжелой и/или легкой цепи (последовательности их каркасных участков), как это показано на

Фигурах 9-11.

В одном аспекте антитело по изобретению представлено гуманизированным антителом к FcRH5, конъюгированным с цитотоксическим агентом. В одном аспекте антитело по изобретению к FcRH5, конъюгированное с цитотоксическим агентом, ингибирует прогрессирование опухоли в ксенотрансплантатах.

В одном аспекте воплощения изобретения гуманизированное антитело и химерное антитело являются моновалентными. В одном варианте воплощения изобретения гуманизированное антитело и химерное антитело включают один участок Fab, присоединенный к участку Fc. В одном варианте воплощения изобретения эталонное химерное антитело состоит из последовательностей вариабельного домена, отображенных на Фигуре 2 (SEQ ID NO: 11) и Фигуре 4 (SEQ ID NO: 13), присоединенных к участку Fc человека. В одном варианте воплощения изобретения участок Fc человека представлен участком IgG (например, IgG1, 2, 3 или 4).

В одном аспекте изобретение описывает антитело, состоящее из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, указанную на Фигурах 9-11. В одном варианте воплощения изобретения вариабельный домен включает последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, указанную на Фигурах 9-11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из последовательности СН1 и Fc, как это указано на Фигуре 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, указанную на Фигурах 9-11, и последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, указанную на Фигурах 10-11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, указанную на Фигурах 10-11, и последовательность СН1 и/или Fc, указанную на Фигуре 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, включающего последовательность HVR1-НС, HVR2-НС и/или HVR3-НС, указанную на Фигурах 10-11, последовательность FR1-НС, FR2-НС, FR3-НС и/или FR4-НС, указанную на Фигурах 10-11, и последовательность СН1 и/или Fc, указанную на Фигуре 11.

В еще одном аспекте изобретение описывает антитело, состоящее из вариабельного домена легкой цепи, включающего последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, указанную на Фигурах 9 и 11. В одном варианте воплощения изобретения вариабельный домен включает последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, указанную на Фигурах 9 и 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из последовательности CL1, как это указано на Фигуре 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена легкой цепи, включающего последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, указанную на Фигурах 9 и 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена легкой цепи, включающего последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, и последовательность CL1, указанные на Фигурах 9 и 11. В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из вариабельного домена легкой цепи, включающего последовательность HVR1-LC, HVR2-LC и/или HVR3-LC, и последовательность FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC и/или FR4-LC, указанные на Фигурах 9 и 11, и последовательность CL1, указанную на Фигуре 11.

В одном аспекте антитело по изобретению включает антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином, в которых одна или более аминокислот исходного антитела

замещены несвязанной аминокислотой цистеин, как это описано в WO2006/034488; US 2007/0092940 (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки). С помощью рекомбинации может быть получена любая форма антитела к FcRH5, т.е. мутированная форма. Например, фрагмент исходного антитела Fab может быть получен в ходе рекомбинации с включенным в него цистеином (в данной заявке такой фрагмент указывается как «тиоFab»). Подобным образом, исходное моноклональное антитело может быть получено в процессе рекомбинации с образованием «ТиоМАТ». Следует отметить, что одиночные точечные мутации позволяют включить в тиоFab цистеин в ходе рекомбинации, в то время как такие одиночные точечные мутации позволяют включить в ТиоМАТ два остатка цистеина благодаря димерной структуре антитела IgG. Антитела к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином включают моноклональные антитела, гуманизированные или химерные моноклональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, полипептиды слияния и аналоги, которые преимущественным образом связываются с находящимися на клетках полипептидами FcRH5. С другой стороны, антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином может включать цистеин в указанном здесь положении антитела или Fab, благодаря схеме последовательности и/или выбору антитела без необходимости изменения исходного антитела, например, с использованием схемы и выбора антитела из библиотеки фаговых дисплеев, или посредством структуры последовательностей каркасных и константных участков легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела *de novo*. Антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином состоит из одной или более несвязанных аминокислот цистеин со значением реакционной способности тиоловой группы в диапазоне от 0,6 до 1,0, от 0,7 до 1,0 или от 0,8 до 1,0. Несвязанная аминокислота цистеин представлена остатком цистеина, который был введен в исходное антитело в ходе рекомбинации и не является частью дисульфидного мостика. Антитела с введенным в ходе рекомбинации цистеином могут использоваться для присоединения цитотоксических соединений и/или соединений, используемых для визуализации, в месте присоединенного в ходе рекомбинации цистеина посредством, например, малеимида или галогенацетила. Нуклеофильная реакционная способность функциональной тиоловой группы остатка Цис относительно группы малеимида примерно в 1000 раз выше в сравнении с функциональностью любой другой аминокислоты в белке, например, аминогруппы остатков лизина или аминогруппы на N-конце. Специфическая функциональность тиоловой группы в реагентах йодоацетила и малеимида может обуславливать реакцию с аминогруппами, однако для этого требуется более высокое значение pH (>9,0) и более длительное время реакции (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

В одном аспекте изобретения антитело к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином включает цистеин в подходящем положении, при этом такое положение пронумеровано в легкой цепи согласно Kabat et al. (см. Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) и согласно системы нумерации EU в тяжелой цепи (включая участок Fc) (см. Kabat et al. (1991) выше).

В одном аспекте изобретение включает антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, включающее одну или несколько несвязанных аминокислот цистеин, при этом антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином связывается с полипептидом FcRH5, и такое антитело получают с помощью процесса, состоящего из замены одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела к FcRH5 цистеином, при этом исходное антитело включает, по меньшей мере,

одну последовательность HVR, как это описано выше.

В определенном аспекте изобретение описывает антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, которое состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичность, или, в других случаях, по меньшей мере, примерно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность в сравнении с последовательностью антитела полной длины с включенным в ходе рекомбинации цистеином, как это описано выше, или последовательностью антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином без сигнального пептида.

В еще одном аспекте изобретение описывает изолированное антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, состоящим из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью, которая гибридизирует в комплемент молекулы ДНК, кодирующей (а) антитело с включенным в ходе рекомбинации цистеином и аминокислотной последовательностью полной длины (как это описано в данной заявке), (б) последовательность антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином при отсутствии сигнального пептида (как это описано в данной заявке), (в) внеклеточный домен трансмембранного белка антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином с/без сигнального пептида (как это описано в данной заявке), (г) аминокислотную последовательность, кодируемую любой последовательностью нуклеиновых кислот (как это описано в данной заявке), или (д) любой другой определяемый специфическим образом фрагмент аминокислотной последовательности антитела полной длины с включенным в ходе рекомбинации цистеином (как это описано в данной заявке).

В специфическом аспекте изобретение описывает изолированное антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином без N-терминальной сигнальной последовательности и/или без начального метионина, и такое антитело кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность (как это описано в данной заявке). Кроме того, также описаны процессы получения такого антитела, и такие процессы включают в себя культивацию клетки-хозяина, содержащий вектор, который, в свою очередь, состоит из соответствующей молекулы аминокислоты, кодирующей в подходящих для экспрессии такого антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином условиях, а также для восстановления антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином из культуры клеток.

Другой аспект изобретения описывает изолированное антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, и такое антитело или не содержит трансмембранный домен, или такой трансмембранный домен инактивирован. Кроме того, также описаны процессы получения такого антитела, и такие процессы включают в себя культивацию клетки-хозяина, содержащей вектор, который, в свою очередь, состоит из соответствующей молекулы аминокислоты, кодирующей в подходящих для экспрессии такого антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином условиях, а также для восстановления антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином из культуры клеток.

В других аспектах изобретение описывает изолированные химерные антитела к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином, и такое антитело слито с гетерологичным (не FcRH5) полипептидом. Примеры таких химерных молекул состоят из любого из описанных выше антител с включенным в ходе рекомбинации цистеином, слитых с гетерологичным полипептидом, например, последовательностью антигенной детерминанты или участком Fc иммуноглобулина.

Антитело к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином может быть представлено моноклональным антителом, фрагментом антитела, химерным антителом, гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом или антителом, которое конкурентным образом ингибирует связывание полипептидного антитела к FcRH5 с соответствующей антигенной детерминантой. Антитела данного изобретения могут быть в некоторых случаях представлены в виде конъюгатов с препаратами-ингибиторами роста или цитотоксическим агентом, например, токсином, включая, например, ауристатин, майтансиноид, производное долостатина или калихимицина, антибиотик, радиоактивный изотоп, нуклеолитический фермент или т.п. Антитела данного изобретения могут в некоторых случаях вырабатываться в клетках СНО или бактериальных клетках, и преимущественно ингибируют рост или пролиферацию или индуцируют гибель клетки, с которой они связываются. В целях диагностики, антитела данного изобретения могут быть помечены, присоединены к твердому субстрату или т.п.

В других аспектах данное изобретение описывает векторы, состоящие из ДНК, кодирующей любое из описанных здесь антител к FcRH5 и антител к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином. Также описаны клетки-хозяева, включающие такой вектор. Например, клетки-хозяева могут быть представлены клетками яичника китайского хомячка (СНО), клетками *E. coli* или дрожжевыми клетками. Процесс получения любого из описанных здесь полипептидов также описан и состоит из культивации клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии необходимого полипептида и восстановления необходимого полипептида из культуры клеток.

Антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином могут использоваться в лечении рака и включают антитела, специфичные относительно клеточной поверхности и трансмембранных векторов, а также опухолеассоциированных антигенов (ОАА). Такие антитела могут использоваться в качестве несвязанных антител (неконъюгированных с молекулой препарата или меткой антител) или в качестве конъюгатов антитело-препарат (КАТ). Антитела по изобретению с включенным в ходе рекомбинации цистеином могут быть сайт-специфическими и могут быть эффективно соединены с тиол-реактивным реагентом. Тиол-реактивный (тиоловый) реагент может быть представлен многофункциональным агентом-линкером, захватываемым реагентом-меткой, флуорофором или промежуточным веществом препарата-линкера. Антитело с включенным в ходе рекомбинации цистеином может быть помечено определяемой меткой, иммобилизированной на твердофазном носителе, и/или конъюгировано с молекулой препарата. Реакционная способность тиола может быть обобщена для любого антитела, в котором замена аминокислот реакционноспособной аминокислотой цистеин может осуществляться в пределах следующих диапазонов легкой цепи: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; а также в пределах следующих диапазонов тяжелой цепи: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, а также в участке Fc в диапазонах H270-H280, H366-H376, H391-401, при этом нумерация положений аминокислот начинается с положения 1 по системе нумерации Kabat (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) и продолжается последовательно, как это описано в WO2006034488; US 2007/0092940. Реакционная способность тиола может быть обобщена для определенных доменов антитела, например, константного домена легкой цепи (CL) и константных доменов тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3. Замена цистеином приводит к установлению значения реакционной

способности тиола 0,6 и выше и может быть получена для константных доменов тяжелых цепей α , β , γ , ϵ and μ интактных антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая следующие подклассы IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Подобные антитела и их использование описано в WO2006/034488; US 2007/0092940.

5 Антитела по изобретению с включенным в ходе рекомбинации цистеином преимущественно сохраняют антигенсвязывающую способность их дикого типа, прототипа исходного антитела. Таким образом, антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином способны связываться, преимущественно специфическим образом, с антигенами. Такие антигены включают, например, опухолеассоциированные
10 антигены (ОАА), рецепторные белки клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, трансмембранные белки, сигнальные белки, регуляторные факторы клеточной выживаемости, регуляторные факторы пролиферации клеток, молекулы, влияющие на (например, молекулы, которые обладают известным или подозреваемым влиянием на функциональность) развитие или дифференциацию тканей,
15 лимфокины, цитокины, молекулы, принимающие участие в регуляции клеточного цикла, молекулы, участвующие в образовании и развитии сосудов, и молекулы, влияющие (например, молекулы, которые обладают известным или подозреваемым влиянием на функциональность) на ангиогенез. Опухлеассоциированный антиген может быть представлен фактором кластера дифференцировки (т.е. белком CD, включая, но не
20 ограничиваясь, FcRH5). Антитела по изобретению к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином преимущественно сохраняют антигенсвязывающую способность их прототипа - исходного антитела к FcRH5. Таким образом, антитела по изобретению к FcRH5 с включенным в ходе рекомбинации цистеином способны связываться, преимущественно специфическим образом, с антигенами FcRH5, включая
25 изоформы FcRH5 человека бета и/или альфа, включая случаи экспрессии таких антигенов на поверхности клеток, включая, без ограничения, В-клетки.

В одном аспекте антитела по изобретению могут быть конъюгированы с любой молекулой-меткой, которая может быть ковалентным образом присоединена к антителу посредством реакционноспособной молекулы, активированной молекулы или
30 реакционноспособной тиоловой группы цистеина (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304: 147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). Присоединенная метка может использоваться для: (i) обеспечения определяемого сигнала; (ii) взаимодействия со
35 второй меткой для модификации определяемого сигнала, обеспечиваемого первой или второй меткой, например, для обеспечения FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции); (iii) стабилизации взаимодействий или повышения аффинности связывания с антигеном или лигандом; (iv) для влияния на подвижность, например, подвижность при электрофорезе, или клеточную проницаемость, относительно
40 показателя заряда, гидрофобности, формы и других физических параметров; или (v) для обеспечения захвата молекулы, для модуляции аффинности лиганда, связывания антитела/антигена или комплексообразования ионов.

Меченые антитела с включенным в ходе рекомбинации цистеином могут использоваться в диагностических анализах, например, для определения экспрессии
45 отдельного антигена в специфических клетках, тканях или сыворотке. Для диагностического применения антитело будет обычно помечено с помощью определяемой молекулы. Доступен целый ряд меток, которые обычно группируются по следующим категориям:

Радиоизотопы (радионуклиды), такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At или ^{213}Bi . Антитела, меченные радиоизотопом, используются в визуализационных экспериментах с захватом мишени-рецептора. Антитело может быть помечено с помощью реагентов-лигандов, которые связывают, образуют хелатные или другие комплексы с радиоактивным металлом, в которых реагент реагирует с введенной в ходе рекомбинации тиоловой группой антитела с использованием способов, описанных в *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Лиганды, приводящие к образованию хелатных комплексов, могут образовывать комплекс с ионом металла, включая DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Радионуклиды могут быть подвергнуты воздействию посредством комплексообразования с конъюгатами антитело-препарат по изобретению (Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Линкерные реагенты, такие как DOTA-малеимид (4-малеимидобутирамидобензил-DOTA) могут быть получены посредством реакции аминокбензил-DOTA с 4-малеимидомасляной кислотой (Fluka), активированной изопропилхлорформиатом (Aldrich) при соблюдении процедуры Axworthy et al (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (4):1802-1807). Реагенты на основе DOTA-малеимида реагируют с несвязанными остатками цистеина в антителах с введенным в ходе рекомбинации цистеином и обеспечивают комплексообразование антитела с металлом (Lewis et al (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86). Линкерные хелатообразующие реагенты для мечения, такие как DOTA-NHS (1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота моно (N-гидроксисукцинимидный эфир) представлены на рынке (Macrocyclics, Dallas, TX). Визуализация связывания с рецептором меченых радионуклидами антител может обеспечивать маркер пути активации путем определения и количественного анализа прогрессированного накопления антител в ткани опухоли (Albert et al (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Конъюгированные радиометаллы могут оставаться внутри клетки после распада лизосом.

Комплексы металлов с лигандами, подходящими для использования в качестве меток антител для визуализационных экспериментов описаны в следующих источниках: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo et al (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

Флуоресцирующие метки, такие как редкоземельные хелаты (хелаты европия), типы флуоресцеина, включая FITC, 5-карбоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин, типы родамина, включая TAMRA, дансил, лиссамин, цианины, фикоэритрины, техасский

красный и их аналоги. Флуоресцирующие метки могут быть конъюгированы с антителами, используя способы, описанные, например, в *Current Protocols in Immunology* (см. выше). Флуоресцирующие красители и флуоресцирующие реагенты для мечения включают реагенты, представленные на рынке компаниями Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) и Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Также описаны или представлены различные метки фермент-субстрат (US 4275149). Фермент обычно катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, и такое изменение может быть измерено с помощью различных способов. Например, фермент может катализировать изменение окраски субстрата, что может быть измерено путем спектрофотометрии. С другой стороны, фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Способы количественного определения изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат переходит в электронно-возбужденное состояние в ходе химической реакции и может излучать свет, который и подлежит измерению (с помощью хемилюминометра, например), или быть донором энергии для флуоресцирующего акцептора. Примеры ферментных меток включают люциферазы (например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу; US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, например, пероксидазу хрена (ПХ), щелочную фосфатазу (ЩФ), β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаров (например, глюкооксидазу, галактооксидазу, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказу и ксантиоксидазу), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п. Способы конъюгации ферментов с антителами описаны в O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Примеры комбинаций фермент-субстрат включают, например, следующие:

(i) Пероксидаза хрена (ПХ) с перекисью водорода в качестве субстрата, при этом перекись водорода окисляет предшествующий краситель (например, ортофенилендиамин (ОФД) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМВ));

(ii) Щелочная фосфатаза (ЩФ) с пара-нитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата; и

(iii) β -D-галактозидаза (β -D-Gal) с хромогенным субстратом (например, p-нитрофенил- β -D-галактозидазой) или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидазой.

Специалисту в данной области известен целый ряд других комбинаций фермент-субстрат. Для получения общей информации см. US 4275149 и US 4318980.

Метка может быть косвенным образом конъюгирована с боковой цепью аминокислот, активированной цепью аминокислот, антителом с введенным в ходе рекомбинации цистеином и т.п. Например, антитело может быть конъюгировано с биотином, и одна из трех обширных категорий меток, указанных выше, может быть конъюгирована с авидином или стрептавидином, или наоборот. Биотин связывается избирательным образом со стрептавидином, и, таким косвенным образом метка может быть конъюгирована с антителом. С другой стороны, для достижения косвенной конъюгации метки с вариантом полипептида, такой вариант полипептида участвует в конъюгации с небольшим гаптенем (например, диоксином), и одна из различных типов указанных выше меток конъюгирует с вариантом полипептида к гаптenu (например, антителом к диоксину). Таким образом, может быть достигнута косвенная конъюгация метки с вариантом полипептида (Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

Антитело по данному изобретению может быть проанализировано с использованием любого известного способа анализа, например, ИФА, анализа конкурентного связывания, прямого и непрямого сендвич-анализа, а также анализа иммунопреципитации (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

Метка для определения может использоваться для локализации, визуализации и количественного определения связывания или в ходе анализа идентификации. Меченые антитела по изобретению могут распознавать рецепторы клеточной поверхности. Другое использование антител, меченых для возможного определения, заключается в способе, основанном на иммунозахвате цепочки гранул, который заключается в конъюгации гранулы с меченым флуоресцентной меткой антителом и определении сигнала флуоресценции при связывании с лигандом. Подобные способы определения связывания используют эффект поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для измерения и выявления взаимодействий антигена с антителом.

Метки для определения, такие как флуоресцентные красители и хемилюминесцентные красители (Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058) обеспечивают наличие определяемого сигнала и обычно применяются для мечения антител, обладающих преимущественно следующими свойствами: (i) меченое антитело должно воспроизводить очень сильный сигнал с очень слабым фоном, таким образом, могут быть определены небольшие количества антител в ходе анализов с/без использования клеток; и (ii) меченое антитело должно быть фотоустойчивым, чтобы была возможность отмечать, мониторить и записывать флуоресцирующий сигнал без существенного обесцвечивания цвета. Для применений, предполагающих связывание меченого антитела с мембранами или поверхностями клеток, особенно живых клеток, метки предпочтительно (iii) должны обладать хорошей растворимостью в воде для достижения эффективной концентрации конъюгата и чувствительности определения, и (iv) быть нетоксичными относительно живых клеток, чтобы не разрушать нормальные процессы метаболизма клеток или не вызывать преждевременную гибель клеток.

Непосредственное количественное определение интенсивности клеточной флуоресценции и регистрация явлений флуоресценции меток, например, связывание конъюгатов пептид-краситель на клеточной поверхности, может проводиться с использованием системы (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.), которая автоматически смешивает и считывает результаты, проводит нерадиоактивные анализы с живыми клетками или гранулами (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). Использование меченых антител также включает анализы связывания рецепторов клеточной поверхности, анализы иммунозахвата, твердофазные иммуноферментные анализы с флуоресцентным усилением (FLISA), анализы расщепления каспазой (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 618-23; US 6372907), апоптоза (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) и цитотоксичности. Анализ по способу флуорометрии в микрообъеме может использоваться для идентификации пониженной или повышенной экспрессии молекулы, действие которой направлено на поверхность клетки (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

Меченые антитела по изобретению используются в качестве визуализационных биомаркеров и зондов в ходе различных способов и процедур биомедицинской и молекулярной визуализации, таких как: (i) МРТ (магнитно-резонансная томография); (ii) микроКТ (компьютерная томография); (iii) СПЕКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); (iv) ПЭТ (позитрон-эмиссионная томография) Chen et al (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) биолюминесценция; (vi) флуоресценция; и (vii) ультразвук. Иммуносцинтиграфия является процедурой визуализации, в ходе которой антитела, меченные радиоактивным веществом, вводятся животному или пациенту-человеку, после чего получают изображение участков организма, в которых локализуется такое антитело (US 6528624). Визуализационные биомаркеры могут быть измерены объективным образом и оценены как индикатор нормальных биологических процессов, патогенетических процессов или фармакологического ответа на терапевтическое вмешательство. Биомаркеры могут быть нескольких типов: тип 0 представлен маркерами естественной динамики заболевания, которые коррелируют в продольном направлении с известными клиническими индексами, например, оценкой МРТ синовиального воспаления при ревматоидном артрите; маркеры I типа охватывают эффект вмешательства в соответствии с механизмом действия, даже если такой механизм действия и не взаимосвязан с клиническим результатом; маркеры II типа функционируют в качестве суррогатных конечных точек, при этом изменение или поступление сигнала биомаркера позволяет предсказать биологическую пользу для «валидации» необходимого ответа, например, для измерения эрозии кости при ревматоидном артрите с использованием КТ. Таким образом, визуализационные биомаркеры могут предоставить фармакодинамическую (ФД) терапевтическую информацию о следующем: (i) экспрессия отдельного белка; (ii) связывание препарата с отдельным белком-мишенью, т.е. избирательность; и (iii) данные клиренса и фармакокинетические данные по периоду полужизни. Преимущества использования визуализационных маркеров *in vivo* в сравнении с лабораторными биомаркерами следующие: неинвазивное лечение, возможность количественного определения, оценка всего организма, возможность введения и оценки повторной дозы, т.е. использование нескольких временных точек, а также потенциально переносимые эффекты результатов доклинических (небольшие животные) исследований в клинические (человек) исследования. В некоторых случаях применения биовизуализация вытесняет или сводит к минимуму количество экспериментов над животными в ходе доклинических исследований.

Способы мечения пептидов широко известны. См. Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

Пептиды и белки, меченые двумя молекулами, т.е. флуоресцирующим репортером и тушителем, в достаточной степени подвергаются анализу FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции). Группы репортера обычно представлены флуоресцентными

красителями, которые переходят под действием определенной длины волны света в возбужденное состояние и переносят энергию группе-акцептору, или тушителю, вместе с соответствующим стоксовым сдвигом для эмиссии при максимальной яркости.

Флуоресцентные красители включают молекулы с повышенной степенью ароматизации, такие как флуоресцеин и родамин, а также их производные. Флуоресцирующий репортер может частично или существенно подвергаться «тушению» со стороны молекулы-тушителя в интактном пептиде. При расщеплении пептида пептидазой или протеазой, может быть измерено определяемое повышение флуоресценции (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248: 18-34).

Меченые антитела по изобретению также могут использоваться в качестве агента для аффинной очистки. В ходе этого процесса меченое антитело иммобилизируют на твердой фазе, например, смоле Sephadex или фильтровальной бумаге, с использованием хорошо известных науке способов. Иммобилизированное антитело вступает в контакт с образцом, содержащим антиген, который необходимо очистить, и затем основа промывается с использованием подходящего растворителя, который удалит практически весь материал из образца, за исключением подвергаемого очистке антигена, который оказывается связанным с иммобилизированным вариантом пептида. Наконец, основа промывается другим подходящим растворителем, например, глициновым буфером, pH 5,0, что приведет к разрыву связи между антигеном и вариантом пептида.

Реагенты для мечения обычно обладают реакционноспособными функциональными группами, что позволяет им реагировать (i) непосредственно с тиоловой группой цистеина в антителе с введенным в ходе рекомбинации цистеином для образования меченого антитела; (ii) с линкерным реагентом для образования промежуточного вещества линкер-метка; или (iii) с линкерным антителом для образования меченого антитела. Реакционноспособные функциональные группы реагентов для мечения включают следующие: малеимид, галогенацетил, йодоацетамид сукцинимидиловый эфир (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиоцианат, сульфонил хлорид, 2,6-дихлортриазинил, пентафторфениловый эфир и фосфорамидит, однако могут использоваться и другие функциональные группы.

Типичной реакционноспособной функциональной группой является N-гидроксисукцинимидиловый эфир (NHS) заместителя карбоксильной группы определяемой метки, например, в биотине или флуоресцентном красителе. Эфир NHS метки может быть предварительно образован, выделен, очищен и/или охарактеризован, или он может быть образован *in situ* и вступать в реакцию с нуклеофильной группой антитела. Как правило, карбоксильная форма метки активируется путем реакции с некоторой комбинацией реагента карбодиимида, например, дициклогексилкарбодиимида, диизопропилкарбодиимида или реагентом урония, например, TSTU (O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат, HBTU (O-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат) или HATU (O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат), активатора, такого как 1-гидроксисукцинимидом для образования эфира NHS метки. В некоторых случаях метка и антитело могут быть соединены посредством *in situ* активации метки и реакции с антителом с образованием конъюгата метка-антитело за один этап. Другие активирующие и связующие реагенты включают TBTU (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат), TFFH (N,N',N'',N'''-тетраметилурония 2-фтор-гексафторфосфат), PyBOP (бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидино-фосфония гексафторфосфат, EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-

1,2-дигидро-хиолин), DCC (дициклогексилкарбодиимид); DIPCDI (диизопропилкарбодиимид), MSNT (1-(меситилен-2-сульфонил)-3-нитро-1Н-1,2,4-триазол и ариловые сульфонилгалиды, например, триизопропилбензенсульфонил хлорид.

Альбуминсвязывающие соединения пептид-Fab согласно изобретению:

5 В одном аспекте антитело по изобретению слито с альбуминсвязывающим белком. Связывание белка в плазме может служить эффективным средством улучшения фармакокинетических свойств молекул с коротким периодом жизни. Альбумин находится в плазме в наибольшем количестве относительно всех других белков плазмы. Альбуминсвязывающие пептиды (АСП) сыворотки могут изменять фармакодинамику

10 активных доменов слитых белков, включая изменение захватом тканей, проникновение в ткани и диффузию. Такие фармакодинамические параметры могут быть подвергнуты модуляции путем специфического отбора подходящей последовательности альбуминсвязывающего пептида (US 20040001827). Целый ряд альбуминсвязывающих пептидов был идентифицирован путем способами скрининга фаговых дисплеев (Dennis

15 et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Соединения по изобретению включают последовательности АСП, изученные (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277: 35035-35043 в Таблицах III и IV, страница 35038; (ii) US 20040001827 в [0076] SEQ ID NO: 9-22; и (iii) WO 01/45746 на страницах 12-13 (включено в данный документ во всей своей

20 полноте посредством ссылки). Альбуминсвязывающие (АСП)-Fabs получены в ходе рекомбинации путем слияния альбуминсвязывающего пептида с С-концом тяжелой цепи Fab в стехиометрическом соотношении 1:1 (1АСП/1 Fab). Было показано, что взаимосвязь таких АСП-Fab с альбумином повышает период полужизни антитела более чем в 25 раз у мышей и кроликов. Описанные выше реакционноспособные остатки Цис

25 могут быть введены в такие АСП-Fab и использоваться для сайт-специфической конъюгации с цитотоксическими препаратами с последующими in vivo исследованиями на животных.

Типичные последовательности антигенсвязывающего пептида включают, но не ограничиваются, аминокислотные последовательности, перечисленные в SEQ ID NO:

30 53-57:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 53

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 54

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 55

RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO: 56

35 DICLPRWGCLW SEQ ID NO: 57.

Конъюгаты антитело-препарат

В другом аспекте изобретение описывает иммуноконъюгаты, или конъюгаты антитело-препарат (КАП), состоящие из антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, препарат, агент-ингибитор роста,

40 токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивным изотопом (т.е. радиоиммуноконъюгат). В другом аспекте изобретение дополнительно описывает способы использования иммуноконъюгатов. В одном аспекте иммуноконъюгат состоит из любого из указанных выше антител к FcRH5, которые

45 ковалентным образом присоединяются к цитотоксическому агенту или определяемому агенту.

В одном аспекте антитело к FcRH5 связывается с той же самой антигенной детерминантой на FcRH5, с которой связывается и другое антитело к FcRH5.

В другом аспекте антитело к FcRH5 связывается с антигенной детерминантой FcRH5, которая отличается от антигенной детерминанты, с которой связывается другое антитело к FcRH5.

В одном аспекте антитело по изобретению специфически связывается с FcRH5 животного одного вида и не связывается специфическим образом с FcRH5 животного другого вида. В одном варианте воплощения изобретения один вид животного представлен человеком и/или приматом (например, яванским макакой), а второй вид животного представлен мышью и/или представителем семейства собачьих. В одном варианте воплощения изобретения один вид животного представлен человеком. В одном варианте воплощения изобретения один вид животного представлен приматом, например, яванским макакой. В одном варианте воплощения изобретения другой вид животного представлен семейством мышиных, например, мышью. В одном варианте воплощения изобретения второй вид животного представлен представителем семейства собачьих.

В одном аспекте изобретения описаны композиции, состоящие из одного или нескольких антител по изобретению и носителя. В одном варианте воплощения изобретения носитель фармацевтически приемлемый.

В одном аспекте изобретения описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к FcRH5.

В одном аспекте изобретения описаны векторы, состоящие из нуклеиновых кислот по изобретению.

В одном аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, состоящие из нуклеиновых кислот или вектора по изобретению. Вектор может быть представлен любым типом, например, рекомбинантным вектором, таким как вектор экспрессии. Может использоваться любая клетка-хозяин из целого ряда представленных. В одном варианте воплощения изобретения клетка-хозяин является прокариотической клеткой, например, *E. coli*. В одном варианте воплощения изобретения клетка-хозяин является эукариотической клеткой, например, клеткой млекопитающего, такой как клетка яичников китайского хомячка (CHO).

В одном аспекте изобретение описывает способы для получения антител по изобретению. Например, изобретение описывает способ получения антитела к FcRH5 (который, как это определено в данной заявке, включает антитело полной длины или его фрагмент), и такой способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора изобретения, кодирующего указанное антитело (или его фрагмент), и восстановление указанного антитела.

В одном аспекте изобретение описывает готовое изделие, состоящее из контейнера, включающее композицию, при этом композиция состоит из одного или нескольких антител к FcRH5. В одном варианте воплощения изобретения композиция состоит из нуклеиновой кислоты по изобретению. В одном варианте воплощения изобретения композиция, состоящая из антитела, дополнительно включает носитель, который в некоторых вариантах воплощения изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном варианте воплощения изобретения изделие по изобретению дополнительно включает инструкции по введению композиции (например, антитела) пациенту.

В одном аспекте изобретение описывает набор, состоящий из одного контейнера с композицией, включающей одно или несколько антител к FcRH5, и другого контейнера, включающего буфер. В одном варианте воплощения изобретения буфер фармацевтически приемлемый. В одном варианте воплощения изобретения композиция, состоящая из антагониста, дополнительно включает носитель, который в некоторых

вариантах воплощения изобретения является фармацевтически приемлемым. В одном варианте воплощения изобретения набор дополнительно включает инструкции по введению композиции (например, антитела) пациенту.

В одном аспекте изобретение описывает использование антитела к FcRH5 в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает использование нуклеиновой кислоты для получения препарата для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает использование вектора экспрессии для получения препарата для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает использование клетки-хозяина по изобретению для получения препарата для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает использование готового изделия в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская

лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает использование набора в виде лекарственной формы для терапевтического и/или профилактического использования для лечения заболевания, такого как рак, опухоль и/или нарушение пролиферации клеток. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания, опухоли и/или нарушения пролиферации выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования роста клетки, экспрессирующей FcRH5, и указанный способ включает в себя контакт упомянутой клетки с антителом по изобретению, что приводит к ингибированию роста указанной клетки. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ терапевтического лечения млекопитающего, имеющего раковую опухоль, состоящую из клеток, экспрессирующих FcRH5, и указанный способ состоит из введения упомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, что позволяет эффективно вылечить указанное млекопитающее. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ лечения или предотвращения нарушения пролиферации клеток, вызванного гиперэкспрессией FcRH5; указанный способ состоит из введения нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела по изобретению, что позволяет эффективно вылечить или предотвратить упомянутое нарушение клеточной пролиферации. В одном варианте воплощения изобретения упомянутое нарушение пролиферации представлено раком. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования роста клетки, при этом рост такой клетки, по меньшей мере, зависит от потенцирующего рост эффекта FcRH5; указанный способ состоит из контакта упомянутой клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, что приводит к ингибированию роста упомянутой клетки. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ терапевтического лечения опухоли у млекопитающего, при этом рост такой опухоли, по меньшей мере, зависит от потенцирующего рост эффекта FcRH5; указанный способ состоит из контакта упомянутой клетки с эффективным количеством антитела по изобретению, что приводит

к эффективному лечению упомянутой опухоли. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

В одном аспекте изобретение описывает способ лечения рака, состоящий из введения пациенту фармацевтической композиции, включающей описанный здесь конъюгат, приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество. В одном варианте воплощения изобретения раковые заболевания выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны. В одном варианте воплощения изобретения пациенту вводят цитотоксический агент в комбинации с соединением-конъюгатом антитело-препарат.

В одном аспекте изобретение описывает способ ингибирования пролиферации В-клеток, состоящий из воздействия на клетку иммуноконъюгатом, включающим антитело по изобретению, в условиях, обеспечивающих связывание иммуноконъюгата с FcRH5. В одном варианте воплощения изобретения нарушения пролиферации В-клеток выбираются из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны. В одном варианте воплощения изобретения В-клетка представлена ксенотрансплантатом. В одном варианте воплощения изобретения воздействие осуществляется в условиях *in vitro*. В одном варианте воплощения изобретения воздействие осуществляется в условиях *in vivo*.

В одном аспекте изобретение описывает способ определения присутствия FcRH5 в образце, подозреваемом на содержание FcRH5; указанный способ включает в себя воздействие на упомянутый образец антителом по изобретению с последующим определением связывания упомянутого антитела с FcRH5 в образце, при этом такое связывание антитела с FcRH5 в образце является доказательством присутствия белка в упомянутом образце. В одном варианте воплощения изобретения образец представлен биологическим образцом. В дополнительном варианте воплощения изобретения биологический образец содержит В-клетки. В одном варианте воплощения изобретения биологический образец получают у млекопитающего, у которого отмечается или которое подозревается на наличие нарушения пролиферации В-клеток, включая (но не ограничиваясь) следующее: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В одном аспекте изобретение описывает способ диагностики нарушения пролиферации клеток, вызванного повышением количества клеток, таких как В-клеток, экспрессирующих FcRH5; способ заключается в контакте исследуемых клеток в биологическом образце с любым из указанных выше антител, определении уровня антитела, связанного с исследуемыми клетками в образце, путем определения связывания

антитела с FcRH5, и сравнении уровня связанного с клетками антитела в контрольном образце, при этом уровень связанного антитела нормализуется относительно количества FcRH5-экспрессирующих клеток в исследуемых и контрольных образцах, и, кроме того, более высокий уровень связанного в исследуемом образце антитела в сравнении с

5 контрольным образцом указывает на присутствие нарушения клеточной пролиферации, вызванной клетками, экспрессирующими FcRH5.

В одном аспекте изобретение описывает способ выявления растворимого FcRH5 в крови или сыворотке, и такой способ заключается в контакте исследуемого образца крови или сыворотки млекопитающего, подозреваемого на наличие нарушения В-

10 клеточной пролиферации, с антителом к FcRH5 с последующим определением повышения растворимого FcRH5 в исследуемом образце в сравнении с контрольным образцом крови или сыворотки здорового млекопитающего. В одном варианте воплощения изобретения используется способ диагностики нарушения пролиферации В-клеток, вызванного повышением уровня растворимого FcRH5 в крови или сыворотке

15 млекопитающего.

В одном аспекте изобретение описывает способ связывания антитела по изобретению с клеткой, экспрессирующей FcRH5, и такой способ заключается в контакте упомянутой клетки с антителом по изобретению. В одном варианте воплощения изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения

20 изобретения антитело конъюгировано с агентом-ингибитором роста.

Способы изобретения могут использоваться для воздействия на любое соответствующее патологическое состояние, например, клетки и/или ткани, экспрессирующие FcRH5. В одном варианте воплощения изобретения клетка, служащая мишенью в способе изобретения, представлена гематопозитической клеткой. Например,

25 гематопозитическая клетка может быть представлена клеткой, включенной в следующую группу клеток: лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и клетки-естественные киллеры. В одном варианте воплощения изобретения клетка, служащая мишенью в способе изобретения, представлена В- или Т-клеткой. В одном варианте воплощения изобретения клетка, служащая мишенью в способе изобретения, представлена раковой

30 клеткой. Например, раковая клетка может выбираться из группы, включающей клетки лимфомы, лейкоза или миеломы.

Способы данного изобретения могут дополнительно включать другие этапы лечения. Например, в одном варианте воплощения изобретения способ дополнительно включает этап, в ходе которого клетка-мишень и/или ткань-мишень (например, раковая клетка)

35 подвергается воздействию лечению облучением или препаратом химиотерапии.

Как уже было описано в данной заявке, экспрессия FcRH5 (или IRTA2) не подлежала регулированию в клеточных линиях множественной миеломы и лимфомы Беркитта. В соответствии с этим, в одном варианте воплощения способов изобретения клетка, служащая мишенью (например, раковая клетка), представлена клеткой,

40 экспрессирующей FcRH5, в сравнении с клеткой, не экспрессирующей FcRH5. В дополнительном варианте воплощения изобретения клетка-мишень представлена раковой клеткой, в которой экспрессия FcRH5 повышена в сравнении со здоровой нераковой клеткой ткани этого же типа. В одном варианте воплощения изобретения способ по изобретению вызывает гибель клетки-мишени.

В других аспектах данного изобретения описаны векторы, состоящие из ДНК, кодирующей любое из описанных здесь антител. Также описаны клетки-хозяева, включающие такой вектор. Например, клетки-хозяева могут быть представлены клетками яичника китайского хомячка (CHO), клетками E. coli или дрожжевыми

45

клетками. Процесс получения любого из описанных здесь антител также описан и состоит из культивации клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии необходимого антитела и восстановления необходимого антитела из культуры клеток.

В еще одном аспекте изобретение описывает композицию, состоящую из антитела к FcRH5, как это описано в данной заявке, в комбинации с носителем. В некоторых случаях носитель представлен фармацевтически приемлемым носителем.

Другой аспект данного изобретения направлен на использование полипептидного антитела к FcRH5 (как это описано в данной заявке) для получения препарата, который может использоваться для лечения состояния, реагирующего на введение полипептидного антитела к FcRH5.

Другой аспект изобретения представляет композицию, состоящую из смеси соединений антител-препаратов по Формуле I, при этом средний показатель нагрузки препарата на антитело составляет от примерно 2 до примерно 5 или от примерно 3 до примерно 4.

Другой аспект изобретения описывает фармацевтическую композицию, включая соединение КАП по Формуле I, смесь соединений КАП по Формуле I, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, а также фармацевтически приемлемый растворитель, носитель или вспомогательное вещество.

Другой аспект изобретения описывает фармацевтическую комбинацию, состоящую из соединения КАП по Формуле I и второго соединения, обладающего противораковыми свойствами или другими терапевтическими эффектами.

Другой аспект изобретения описывает способ гибели или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или раковых клеток, состоящий из подвергания клеток воздействию количеством конъюгата антитело-препарат по Формуле I, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, и такое воздействие эффективно для гибели или пролиферации раковых клеток или опухолевых клеток.

Другой аспект изобретения описывает способ лечения рака, состоящий из введения пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, состоящей из КАП по Формуле I.

Другой аспект изобретения описывает изделия, т.е. наборы, состоящие из конъюгата антитело-препарат, контейнера и листка-вкладыша или этикетки с указанием процедуры лечения.

Аспект изобретения представляет собой способ получения конъюгата антитело-препарат по Формуле I, состоящий из следующих этапов: (а) реакция группы цистеина антитела с введенным в ходе рекомбинации цистеином с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения антитело-линкер АТ-Л; (б) реакция АТ-Л с активированной молекулой препарата D с образованием конъюгата антитело-препарат; в ином случае, аспект может включать другие этапы: (в) реакция нуклеофильной группы молекулы препарата с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения препарат-линкер П-Л; (г) реакция П-Л с группой цистеина с введенным в ходе рекомбинации цистеином с образованием конъюгата антитело-препарат.

Аспект изобретения представляет анализ определения раковых клеток, включающий следующее: (а) воздействие на клетки конъюгатом препарата и антитела к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином; (б) определение степени связывания конъюгата препарата и антитела к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином с клетками.

А. Антитела к FcRH5

В одном варианте воплощения изобретения описаны антитела к FcRH5, которые могут использоваться в качестве терапевтических агентов. Типичные антитела включают поликлональные, моноклональные, гуманизированные, биспецифические антитела и антитела-гетероконъюгаты.

1. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела получают преимущественным образом у животных путем множественных подкожных (п/к) или интраперитонеальных (и/п) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Это может оказаться полезным для конъюгации соответствующего антигена (особенно при использовании искусственно полученных белков) с белком, который является иммуногенным для вида животных, которые должны быть иммунизированы. Например, антиген может быть конъюгирован с гемоцианином фиссуреллы (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина с использованием бифункционального или дериватизирующего агента, например, малеимидобензойлсульфосукцинимидного эфира (конъюгация посредством остатков цистеина), N-гидроксисукцинимид (посредством остатков лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 являются разными алкильными группами.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или их производных путем комбинации, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов и мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и внутрикожного введения раствора в нескольких местах. Спустя один месяц у животных повышают количество пептида или конъюгата от 1/5 до 1/10 от начального количества в полном адъюванте Фрейнда путем подкожного введения раствора в нескольких местах. Спустя 7-14 дней, у животных отбирают кровь, и сыворотка анализируется на предмет титра антитела. Концентрацию белка (или конъюгата) у животных повышают до достижения плато значения титра. Конъюгаты также могут быть получены с использованием рекомбинантной клеточной культуры в виде белков слияния. Кроме того, для усиления иммунного ответа, могут использоваться препараты, вызывающие агрегацию, например, алюмин.

2. Моноклональные антитела

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием способа гибридомы, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или путем процедур рекомбинации ДНК (патент США No. 4816567).

В способе гибридомы производится иммунизация мыши или другого подходящего животного-хозяина, такого как хомяк, с получением лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации. С другой стороны, лимфоциты также могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты изолируют и затем сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и культивируют на подходящей питательной среде, содержащей одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживаемость неслитых, исходных клеток миеломы (также указываются как партнеры слияния). Например, если исходные клетки миеломы содержат недостаточное количество фермента гипоксантина-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ), питательная среда для гибридом обычно будет включать гипоксантин, аминоптерин

и тимидин (среда НАТ), которые препятствуют росту клеток с дефицитом ГГФТ.

Предпочтительный партнер слияния в виде миеломных клеток представлен клетками, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную и высокую выработку антитела избранными антитело-вырабатывающими клетками, и чувствительны к
 5 избирательной среде относительно неслитых материнских клеток. Предпочтительные клеточные линии миеломы представлены линиями миеломы мышей, например, полученные из опухолей мышей МОРС-21 и МРС-11, предоставленные Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, США, и клетки SP-2 и производных, например, или X63-Ag8.653, предоставленные Американской коллекцией типовых культур, Manassas,
 10 Virginia, США. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Питательная среда, в которой культивируют клетки миеломы, подвергается анализу
 15 на предмет выработки моноклональных антител, направленных против антигена. Преимущественно, специфичность связывания моноклональных антител, выработанных клетками гибридомы, может быть определена путем иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, например, радиоиммуноанализом (РИА) или твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА).

20 Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, в ходе анализа Скэтчарда, описанного в Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

После идентификации клеток гибридомы, вырабатывающих антитела с необходимой специфичностью, аффинностью и/или активностью, путем ограничения процедур деления
 25 и роста с использованием стандартных способов могут быть субклонированы клоны (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие для данной цели условия питательной среды включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных, например, путем интраперитонеальной инъекции
 30 клеток мыши.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, выделяют соответствующим образом из питательной среды, асцитной жидкости или сыворотки с использованием стандартных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, аффинная
 35 хроматография (например, с использованием белка А или белка G-сефарозы), ионообменная хроматография, гидроксиапатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ и т.д.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами,
 40 кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы служат в качестве преимущественного источника такой ДНК. После изоляции ДНК может быть включена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. Coli*, клетки линии COS обезьяны, клетки яичников китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в противном случае не вырабатывают
 45 белок иммуноглобулина, для организации синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзор статей о рекомбинантной экспрессии бактериями ДНК, кодирующей антитело, представлен в Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

В дополнительном варианте воплощения изобретения моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)

описали выделение мышинных и человеческих антител, соответственно, с использованием фаговых библиотек. Последующие публикации описывают получение высокоаффинных (диапазон нМ) человеческих антител (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)) путем замены в цепях, а также комбинаторной инфекции и *in vivo* рекомбинации в качестве стратегии для конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти способы являются достойными альтернативами традиционным способам получения моноклональных антител из гибридомы для изоляции моноклональных антител.

ДНК, кодирующая антитело, может быть модифицирована для получения химерного антитела или полипептида слияния, например, путем замены последовательностей константного домена тяжелой цепи и легкой цепи человека (C_H и C_L) гомологичными мышинными последовательностями (патент США No. 4816567; и Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или путем слияния кодирующей иммуноглобулин последовательности со всей или частью кодирующей последовательности полипептида, не являющегося иммуноглобулином (гетерологичным полипептидом).

Последовательности полипептидов, не являющихся иммуноглобулинами, могут быть замещены константными доменами антитела, или же замещены переменными доменами одного антигенсвязывающего сайта антитела для создания химерного двухвалентного антитела, состоящего из одного антигенсвязывающего сайта, обладающего специфичностью к антигену, и другого антигенсвязывающего сайта, обладающего специфичностью к другому антигену.

3. Человеческие и гуманизированные антитела

Антитела к FcRH5 могут дополнительно состоять из гуманизированных или человеческих антител. Гуманизированные формы животных (например, мышинных) антител представлены химерными иммуноглобулинами, цепями иммуноглобулинов или их фрагментами (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другими антигенсвязывающими субпоследовательностями антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина животных. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки гипервариабельных участков (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов животных (антитела-донора), например, мыши, крысы или кролика, обладающими необходимой специфичностью, аффинностью и реакционной способностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка (КУ) Fv иммуноглобулина человека замещаются соответствующими остатками животных. Гуманизированные антитела также могут состоять из остатков, которые отсутствуют в антителе-реципиенте или импортируемых последовательностях CDR или каркасного участка. В целом, гуманизированное антитело будет состоять практически полностью из, по меньшей мере одного, но обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все участки CDR соответствуют иммуноглобулину животных, и все или практически все КУ соответствуют последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело в некоторых случаях также может состоять из, по меньшей мере, участка константного домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Способы гуманизации животных антител широко известны науке. Как правило, гуманизированное антитело включает один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из другого (животного) источника. Такие аминокислотные остатки животных часто называют «импортными» остатками, и обычно их получают из

5 «импортируемого» переменного домена. Гуманизация может существенным образом осуществляться путем соблюдения способа Винтера и сотрудников [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], путем замещения CDR или последовательностей CDR грызунов соответствующими последовательностями антитела человека. В соответствии с этим,

10 такие «гуманизированные» антитела представлены химерными антителами (патент США No. 4816567), в которых менее чем один интактный переменный домен человека замещен соответствующей последовательностью видов животных. На практике, гуманизированные антитела обычно представлены человеческими антителами, в которых остатки CDR и, возможно, некоторые остатки КУ замещены остатками из

15 аналогичных участков антител грызунов.

Выбор переменных доменов легкой и тяжелой цепей человека, которые используются в получении гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности и НАМА-ответа (человеческое антимышиное антитело), если такое антитело предназначено для лечения людей. Снижение или элиминация НАМА-ответа

20 является существенным аспектом клинической разработки подходящих терапевтических препаратов. См., например, Khazzaeli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990),

25 50:1495. Как уже было описано здесь ранее, изобретение представляет антитела, которые были гуманизированы таким образом, что НАМА-ответ является пониженным или элиминированным. Варианты таких антител в дальнейшем могут быть получены с использованием стандартных известных науке способов, некоторые из которых

30 подробно описаны ниже. Согласно так называемому принципу «наилучшего соответствия», последовательность переменного домена в антителе грызунов подлежит скринингу относительно всей библиотеки известных последовательностей переменного домена человека. Последовательность V-домена человека, которая близка к таковой последовательности грызунов, идентифицируется, и для гуманизированного антитела выбирается каркасный участок (КУ) в пределах такой последовательности (Sims et al.,

35 *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Другой способ подразумевает использование отдельного каркасного участка, полученного из консенсусной последовательности всех антител человека из отдельной подгруппы тяжелых и легких цепей. Такой каркасный участок может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285

40 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Например, аминокислотная последовательность антитела, как это описано в данной заявке, может служить в качестве стартовой (исходной) последовательности для диверсификации каркасного участка и/или гиперпеременных последовательностей. Выбранная последовательность каркасного участка, к которой присоединяется

45 начальная гиперпеременная последовательность, указана в данной заявке в качестве акцепторного каркасного участка человека. Акцепторный каркасный участок человека может быть получен из иммуноглобулина человека (его VL и/или VH участков), но, преимущественно, акцепторный каркасный участок человека может быть получен из

консенсусной последовательности каркасного участка человека, поскольку было доказано, что такие каркасные участки обладают минимальной или даже отсутствующей иммуногенностью для пациентов-людей.

В случаях, когда акцептор получен из иммуноглобулина человека, возможно выбрать последовательность каркасного участка человека на основе гомологичности его донорской последовательности каркасного участка путем выравнивания донорской последовательности каркасного участка с различными последовательностями каркасного участка человека из коллекции последовательностей каркасных участков человека; это поможет выбрать наиболее гомологичную последовательность каркасного участка человека в качестве акцептора.

В одном варианте воплощения изобретения описанные здесь консенсусные последовательности каркасных участков человека получены из консенсусных последовательностей каркасных участков VH подгруппы III и/или каппа VL подгруппы I.

В случаях, когда акцептор может иметь последовательность, идентичную выбранной последовательности каркасного участка человека, полученной из иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасного участка человека, данное изобретение предусматривает, что акцепторная последовательность может состоять из существующих ранее замен аминокислот относительно последовательности иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасного участка человека. Такие предварительно существующие замены преимущественно минимальны, а разница в сравнении с последовательностью иммуноглобулина человека или консенсусной последовательностью каркасного участка человека составляет обычно четыре, три, две или одну аминокислоты.

Остатки гипервариабельных участков антитела животного включены в акцепторные каркасные участки VL и/или VH человека. Например, можно ввести остатки в соответствии с остатками CDR по Kabat, остатки гипервариабельной петли по Chothia и остатки MAT, и/или контактирующие остатки. В некоторых случаях остатки расширенного гипервариабельного участка представлены следующими: 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102, или 95-102 (H3).

При «введении» остатков гипервариабельных участков (как это описано в данной заявке), следует иметь в виду, что такое введение может быть достигнуто различными путями, например, нуклеиновая кислота, кодирующая необходимую аминокислотную последовательность, может быть получена путем мутации нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность вариабельного домена мыши, таким образом, что остатки каркасного участка изменены на остатки акцепторного каркасного участка человека, или путем мутации нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность вариабельного домена человека, таким образом, что остатки гипервариабельного домена изменены на остатки животного, или путем синтеза нуклеиновой кислоты, кодирующей необходимую последовательность, и т.д.

В описанных здесь примерах варианты гипервариабельного привитого участка были получены путем мутагенеза (по Кункелю) нуклеиновой кислоты, кодирующей акцепторные последовательности человека, с использованием отдельного олигонуклеотида для каждого гипервариабельного участка. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Соответствующие изменения в каркасный участок и/или гипервариабельный участок могут быть введены с использованием стандартных способов с целью коррекции и повторного установления надлежащих взаимодействий между

гипервариабельным участком и антигеном.

Фагмиды (или указываемый здесь также в некоторых контекстах фаговый дисплей) могут использоваться в качестве удобного и быстрого способа получения и скрининга многих различных потенциальных вариантов антител в библиотеке, полученных путем рандомизации последовательности. Однако специалисту в данной области известны и другие способы получения и скрининга измененных антител.

Было доказано, что фагмиды являются мощным инструментом для получения и выбора новых белков, которые связываются с лигандом, например, антигеном. Использование подобного способа фагмид позволяет получить большую библиотеку вариантов белков, которые могут быть быстро отсортированы на предмет тех последовательностей, которые связываются с молекулой-мишенью с высокой степенью аффинности. Нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты полипептиды, обычно слиты с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей белок вирусной оболочки, такой как ген III или ген VIII. Были разработаны моновалентные системы фаговых дисплеев, в которых последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая белок или полипептид, слита с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующую участок гена III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). В моновалентной системе фаговых дисплеев ген слияния экспрессируется в малых количествах, и дикий тип гена III также экспрессируется, при этом сохраняется инфекционная способность частиц. Способы получения пептидных библиотек и скрининг таких библиотек был описан во многих патентах (например, патенте США No. 5723286, патенте США No. 5432018, патенте США No. 5580717, патенте США No. 5427908 и патенте США No. 5498530).

Библиотеки антител или антигенсвязывающих полипептидов были получены с использованием целого ряда способов, включая изменение одного гена путем вставки случайных последовательностей ДНК или путем клонирования семейства родственных генов. Способы отображения антитела или антигенсвязывающих фрагментов с использованием фагмид были описаны в патентах США No. 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 и 5658727. Затем библиотека подвергается скринингу на предмет экспрессии антител или антигенсвязывающих белков с необходимыми характеристиками.

Способы замены выбранной аминокислоты в матричной аминокислотной последовательности хорошо известны в науке, и некоторые из них описаны в тексте данной заявки. Например, остатки гипервариабельного участка могут быть замещены с помощью способа Кункеля. См, например, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

Последовательность олигонуклеотидов включает один или несколько необходимых наборов кодонов для тех остатков гипервариабельного участка, которые следует заменить. Кодон представляет собой различные триплеты нуклеотидов, используемых для кодирования необходимого варианта аминокислот. Кодоны могут быть представлены с использованием символов для обозначения отдельных нуклеотидов или эквимоллярных смесей нуклеотидов, как это показано ниже в соответствии с кодом IUB.

КОДЫ IUB

G Гуанин
A Аденин
T Тимин
C Цитозин

R (A или G)

Y (C или T)

M (A или C)

K (G или T)

5 S (C или G)

W (A или T)

H (A или C или T)

B (C или G или T)

V (A или C или G)

10 D (A или G или T) H

N (A или C или G или T)

Например, в кодоне DVK, D может быть представлен нуклеотидами A или G или T; V может быть представлен A или G или C; и K может быть представлен G или T. Такой кодон может составлять 18 различных кодонов и может кодировать аминокислоты

15 Ала, Трп, Тир, Лиз, Тре, Асн, Лиз, Сер, Арг, Глу, Гли и Цис.

Олигонуклеотиды или праймеры могут быть синтезированы с использованием стандартных способов. Олигонуклеотиды могут быть синтезированы, например, путем твердофазного синтеза, и такие олигонуклеотиды содержат последовательности, представляющие собой все возможные комбинации нуклеотидных триплетов (кодонов),

20 которые будут кодировать необходимую группу аминокислот. Синтез олигонуклеотидов с избранной нуклеотидной «дегенерацией» в определенных положениях хорошо известен науке. Такой набор нуклеотидов с определенным набором кодонов может быть синтезирован с использованием представленных на рынке средств для синтеза нуклеиновых кислот (например, представленных компанией Applied Biosystems, Foster
25 City, CA), или может быть предоставлен компаниями (например, Life Technologies, Rockville, MD). Таким образом, набор синтезированных олигонуклеотидов, имеющих отдельный набор кодонов, будет включать, как правило, множество олигонуклеотидов с различными последовательностями, а различия между кодонами находятся в пределах общей последовательности. Олигонуклеотиды, как это используется в соответствии с
30 изобретением, имеют последовательность, которая позволяет осуществлять гибридизацию нуклеиновых кислот шаблонного переменного домена, а также может включать сайты рестриктаз для проведения клонирования.

В одном способе последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислот, могут быть созданы путем олигонуклеотид-опосредованного мутагенеза.

35 Такой способ хорошо известен в науке, как это описано в Zoller *et al. Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). В нескольких словах его можно описать следующим образом: последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислот, создают путем гибридизации олигонуклеотида, кодирующего необходимый набор кодонов для матричной ДНК, при этом такая матричная ДНК является одноцепочечной
40 и полученной из плазмиды. После гибридизации, для синтеза полной второй комплементарной цепи матричной ДНК, которая и будет встроена в олигонуклеотидный праймер и будет содержать набор кодонов, используется ДНК-полимераза.

Как правило, используются олигонуклеотиды длиной, по меньшей мере, 25 нуклеотидов. Оптимальный олигонуклеотид будет иметь длину 12-15 нуклеотидов,
45 которые полностью комплементарны матричной последовательности (т.е. любой из ее сторон, кодирующих мутацию). Это обеспечивает надлежащую гибридизацию олигонуклеотида в молекулу одноцепочечной матричной ДНК. Олигонуклеотиды легко синтезируются с использованием известных науке способов, например, описанных

в Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

Матричная ДНК создается с помощью векторов, полученных из M13 векторов бактериофагов (на рынке представлены векторы M13mp18 и M13mp19), и векторов, которые состоят из одноцепочечной фаговой точки начала репликации, как это описано в Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая должна быть мутирована, может быть вставлена в один из таких векторов для получения одноцепочечной матричной ДНК. Получение одноцепочечной матричной ДНК описано в главах 4.21-4.41 в Sambrook et al. (см. выше).

Для изменения нативной последовательности ДНК, олигонуклеотид подвергается гибридизации в одноцепочечную матричную ДНК при соответствующих условиях гибридизации. Затем добавляется ДНК-полимераза, обычно T7 ДНК-полимераза или фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, для синтеза комплементарной цепи матричной ДНК с использованием олигонуклеотида в качестве праймера для синтеза. Таким образом, образуется гетеродуплексная молекула, в которой одна цепь ДНК кодирует мутированную форму гена 1, а другая цепь ДНК (оригинальная матрица) кодирует нативную, неизмененную последовательность гена 1. Такая гетеродуплексная молекула затем переносится в подходящую клетку-хозяин, обычно прокариотическую, например, *E. coli* JM101. После культивации, клетки помещают в чашки с агарозой и подвергают скринингу с использованием радиомеченого фосфором-32 олигонуклеотидного праймера для выявления бактериальных колоний, содержащих мутированную ДНК.

Описанный выше способ может быть модифицирован таким образом, что созданная гетеродуплексная молекула с двумя плазмидными цепями включает мутации. Модификации могут быть представлены следующими: одноцепочечный олигонуклеотид присоединяется к одноцепочечной матрице, как это описано выше. Смесь трех дезоксирибонуклеотидов (дезоксирибоаденозин (dATP), дезоксирибогуанозин (dGTP) и дезоксириботимидин (dTTP)) комбинируется с модифицированным дезоксирибоцитозином dCTP-(aS) (который может быть предоставлен компанией Amersham). Такая смесь добавляется к матрично-олигонуклеотидному комплексу. После добавления в смесь ДНК-полимеразы, получают цепь ДНК, идентичную матрице, за исключением мутированных оснований. Кроме того, такая мутированная новая ДНК будет включать dCTP-(aS) вместо dCTP, что служит для защиты ДНК от расщепления рестрикционными эндонуклеазами. После того, как матричная цепь двухцепочечного гетеродуплекса будет подвергнута действию соответствующей рестриктазы, матричная цепь может быть расщеплена с помощью экзоIII-нуклеазы или любой другой нуклеазы после участка, содержащего сайты для мутаций. Затем реакция прекращается с высвобождением молекулы, которая лишь частично является одноцепочечной. Затем образуется полный двухцепочечный гетеродуплекс ДНК с использованием ДНК-полимеразы в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотидных трифосфатов, АТФ и ДНК-лигазы. Такая гомодуплексная молекула затем может быть перенесена в подходящую клетку-хозяин.

Указанная выше последовательность олигонуклеотида имеет достаточную длину для гибридизации в матричную нуклеиновую кислоту и может (но не обязательно) содержать сайты рестрикции. Матричная ДНК создается с помощью векторов, полученных из M13 векторов бактериофагов, или векторов, которые состоят из одноцепочечной фаговой точки начала репликации, как это описано в Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, которая должна быть мутирована, может быть вставлена в один из таких векторов для получения одноцепочечной матричной ДНК. Получение одноцепочечной матричной ДНК описано в главах 4.21-4.41 в Sambrook

et al. (см. выше).

Согласно другому способу, связывание антигена может быть восстановлено в ходе гуманизации антител посредством отбора восстановленных гипервариабельных участков (см. заявку на патент США No. 11/061841, от 18 февраля 2005). Способ включает

5 введение гипервариабельных участков животных в акцепторный каркасный участок и дальнейшее введение одной или нескольких аминокислотных замен в один или несколько гипервариабельных участков без модификации последовательности акцепторного

10 гипервариабельных участков без модификации последовательности акцепторного каркасного участка. С другой стороны, введение одной или нескольких аминокислотных замен может сопровождаться модификациями в последовательности акцепторного

10 гипервариабельных участков без модификации последовательности акцепторного каркасного участка.

Согласно другому способу, библиотека может быть получена путем обеспечения олигонуклеотидов в нисходящем и восходящем направлениях, и каждый такой олигонуклеотид будет иметь множество вариантов с разными последовательностями, устанавливаемыми наборами кодонов. Олигонуклеотиды в нисходящем и восходящем

15 направлениях вместе с вариабельным доменом последовательности матричной нуклеиновой кислоты могут использоваться в полимеразной цепной реакции для получения «библиотеки» продуктов ПЦР. Продукты ПЦР могут указываться в данной заявке как «кассеты нуклеиновых кислот», т.к. они могут быть слиты с другой родственной или неродственной последовательностью нуклеиновой кислоты, например,

20 белками вирусной оболочки и доменами димеризации, с использованием установленных процедур молекулярной биологии.

Последовательность ПЦР праймеров включает один или несколько необходимых наборов кодонов для доступных для растворителя и чрезвычайно варьируемых положений в гипервариабельном участке. Как это уже было описано выше, кодон

25 представляет собой различные триплеты нуклеотидов, используемых для кодирования необходимого варианта аминокислот.

Выбранные антитела, соответствующие необходимым критериям (устанавливаются в ходе соответствующих этапов скрининга/селекции), могут быть выделены и клонированы с использованием стандартных способов рекомбинации.

30 Кроме того, важным является тот факт, что антитела будут гуманизированы с сохранением высокой аффинности связывания с антигеном и другими желательными биологическими свойствами. Для достижения такой цели и согласно одному аспекту изобретения, гуманизированные антитела получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с

35 использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко представлены и известны специалисту в данной области. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформации выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Такая конформация позволяет

40 произвести анализ вероятной роли остатков в функционировании кандидатной иммуноглобулиновой последовательности, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать антиген. Таким образом, остатки КУ может быть выбраны и скомбинированы из последовательностей реципиента и импортируемых последовательностей для получения необходимой характеристики

45 антитела, например, повышенной аффинности к антигену-мишени. В целом, остатки гипервариабельного участка непосредственно и более существенным образом оказывают влияние на связывание антигена.

Предусмотрены различные формы гуманизированного антитела к FcRH5. Например,

гуманизированное антитело может быть представлено фрагментом антитела, таким как Fab, которое в некоторых случаях конъюгировано с одним или несколькими цитотоксическими агентами для получения иммуноконъюгата. С другой стороны, гуманизированное антитело может быть представлено интактным антителом, таким как интактное антитело к IgG1.

Как альтернатива гуманизации, могут быть получены человеческие антитела. Например, на сегодняшний день возможно получение трансгенных животных (например, мышей), которые способны (при иммунизации) вырабатывать полный репертуар антител человека в отсутствие эндогенной выработки иммуноглобулинов. Например, уже было описано, что гомозиготная делеция гена участка соединения тяжелой цепи антитела (J_H) у химерных мышей и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному ингибированию эндогенной выработки антител. Перенос генетической информации иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких мутантных мышей зародышевой линии приводит к выработке человеческих антител при воздействии антигеном. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33 (1993); патент США No. 5545806, 5569825, 5591669 (все GenPharm); 5545807; и WO 97/17852.

С другой стороны, для выработки человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* от варибельного домена (V) иммуноглобулина генного репертуара от иммунизированных доноров, может использоваться способ фаговых дисплеев (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]). Согласно этому способу гены V домена антитела клонируют внутри рамки считывания большего или меньшего гена оболочечного белка нитевидного бактериофага, такого как M13 fd, и отображаются в виде фрагментов функционального антитела на поверхности фаговых частиц. Принимая во внимание, что нитчатые частицы содержат копию одноцепочечной ДНК генома фага, выбор, основанный на функциональных свойствах антитела, также приводит к отбору гена, кодирующего антитело, обладающее такими свойствами. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей может использоваться на целом ряде форматов, проанализированных, например, в Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея может использоваться несколько источников сегментов V-гена. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) по принципу случайного выбора была выделена разнотипная матрица антител к оксазолону из небольшой комбинаторной библиотеки генов V, полученных из селезенки иммунизированных мышей. Можно создать репертуар генов V от иммунизированных доноров-людей, а антитела для разнообразной матрицы антигенов (включая собственные антигены) могут быть существенным образом изолированы с соблюдением способов, описанных в Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См. также патенты США No. 5565332 и 5573905.

Как уже было указано выше, человеческие антитела также могут быть получены с помощью активированных *in vitro* В-клеток (см. патенты США No. 5567610 и 5229275).

4. Фрагменты антител

В определенных обстоятельствах преимущественным является использованием фрагментов антител, а не полных антител. Более меньший размер фрагмента обеспечивает его быстрое выведение, что может привести к повышенному доступу к солидной опухоли.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно такие фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical*

Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако сейчас такие фрагменты могут быть получены непосредственно путем рекомбинации клеток-хозяев. Фрагменты антител Fab, Fv и ScFv также могут экспрессироваться и секретироваться в *E. coli*, что позволяет легко получить большие количества таких фрагментов.

5 Фрагменты антитела могут быть выделены из библиотек фаговых дисплеев антител, как это описано выше. С другой стороны, фрагменты Fab'-SH могут быть восстановлены непосредственным образом из *E. coli* и соединены в ходе химической реакции с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Согласно
10 другому способу, фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с повышенным временем полужизни *in vivo* состоят из остатков антигенной детерминанты рецепторов, как это описано в патенте США No. 5869046. Специалисту в данной области должны быть известны и другие способы получения фрагментов антител. В других вариантах
15 воплощения изобретения выбранное антитело представлено одноцепочечным фрагментом Fv (scFv). См. WO 93/16185; патент США No. 5571894; и патент США No. 5587458. Fv и sFv являются единственными видами с интактными комбинационными сайтами, которые не содержат константных участков; таким образом, такие фрагменты подходят для пониженного неспецифического связывания во время применения *in vivo*.
20 Белки слияния sFv могут быть сконструированы для слияния с эффекторным белком на amino- или карбоксильном конце sFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck выше. Фрагмент антитела также может быть представлен «линейным антителом», например, как это описано в патенте США 5641870. Такие фрагменты линейного антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

25 5. Биспецифические антитела

Биспецифические антитела являются антителами, обладающими специфичностью связывания с как минимум двумя антигенными детерминантами. Типичные биспецифические антитела могут связываться с двумя разными антигенными детерминантами белка FcRH5, как это описано в данной заявке. Другие такие антитела
30 могут состоять из участка связывания FcRH5 и участка связывания другого белка. С другой стороны, область FcRH5 может быть скомбинирована с областью связывания триггерной молекулы на лейкоците, такой как молекула рецептора Т-клетки (например, CD3), или рецепторами Fc к IgG (FcγR), такими как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), т.о. сосредотачиваются и локализуются защитные клеточные механизмы
35 против клеток, экспрессирующих FcRH5. Биспецифические антитела также могут использоваться для локализации цитотоксических агентов в клетке, экспрессирующей FcRH5. Такие антитела обладают доменом связывания FcRH5 и доменом, который связывается с цитотоксическим агентом (например, сапорином, анти-интерфероном-α, алкалоидом барвинка, цепью А рицина, метотрексатом или радиоактивным изотопом гаптенем).
40 Биспецифические антитела могут быть получены в виде антител с полной длиной или фрагментов антител (например, F(ab')₂: биспецифические антитела).

WO 96/16673 описывает биспецифическое антитело к ErbB2/FcγRIII, а патент США No. 5837234 описывает биспецифическое антитело ErbB2/FcγRI. Биспецифическое антитело к ErbB2/Fcα представлено в WO98/02463. Патенты США No. 5821337 и 6407213
45 рассматривают биспецифические антитела к ErbB2/CD3. Были описаны дополнительные биспецифические антитела, которые связываются с антигенной детерминантой на антигене CD3 и другой антигенной детерминантой. См., например, патенты США No. 5078998 (антитело к CD3/антигену опухолевых клеток); 5601819 (антитело к CD3/ИЛ-

2R; антитело к CD3/CD28; антитело к CD3/CD45); 6129914 (антитело к CD3/злокачественному антигену В-клеток); 7112324 (антитело к CD3/CD19); 6723538 (антитело к CD3/CCR5); 7235641 (антитело к CD3/EpCAM); 7262276 (антитело к CD3/антигену опухоли яичников); и 5731168 (антитело к CD3/CD4IgG).

Способы получения биспецифических антител известны науке. Традиционное получение биспецифических антител полной длины основывается на ко-экспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, при этом две цепи имеют разную специфичность (Millstein et al., *Nature* 305:537-539 (1983)). Принимая во внимание случайное распределение тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, такие гибридомы (квадромы) позволяют получить потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которая обычно производится путем аффинной хроматографии, является достаточно трудоемкой процедурой, и выход продукта очень низкий. Подобные процедуры описаны в WO 93/08829 и в Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

Согласно другому подходу, вариабельные домены антитела с необходимой специфичностью связывания (комбинированные сайты антитело-антиген) сливают с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Преимущественным образом, слияние происходит в константном домене тяжелой цепи Ig, который включает, по меньшей мере, часть шарнирного, C_H2 и C_H3 участков. Предпочтительно, что первый константный участок тяжелой цепи (C_H1) состоял из участка связывания с легкой цепью, присутствующей, по меньшей мере, в одном из слитых белков. ДНК, кодирующие слияние тяжелой цепи иммуноглобулина и, при необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, вводят в отдельные векторы экспрессии и ко-трансфицируют в подходящую клетку-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в соблюдении взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов по изобретению с неравными соотношениями трех полипептидных цепей, используемых в конструировании, а также оптимальный выход необходимого биспецифического антитела. Кроме того, возможно вставить кодирующую последовательность для двух или всех трех полипептидов в один вектор экспрессии, при этом экспрессия по меньшей мере, двух полипептидных цепей в равных соотношениях характеризуется высоким выходом, или такие соотношения не имеют существенного влияния на выход необходимой комбинации цепей.

В преимущественном варианте воплощения изобретения с использованием такого подхода биспецифические антитела состоят из гибрида тяжелой цепи иммуноглобулина с одной специфичностью связывания в одном домене и гибрида пары тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина (что обеспечивает другую специфичность связывания) в другом домене. Было выявлено, что такая асимметричная структура облегчает разделения необходимого биспецифического соединения с нежелательными комбинациями цепей иммуноглобулинов, т.к. присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкое разделение. Такой подход описан в WO 94/04690. Дополнительная информация по получению биспецифических антител представлена, например, в Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

Согласно другому подходу, описанному в патенте США No. 5731168, может быть сконструирован участок взаимодействия между парой молекул антител для получения максимально большего числа гетеродимеров, восстановленных из рекомбинантной клеточной культуры. Преимущественный участок взаимодействия состоит, по меньшей мере, из домена C_H3. В таком способе одна или несколько небольших аминокислотных

цепей из участка взаимодействия молекулы первого антитела замещаются большими боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). В участке взаимодействия молекулы другого антитела создаются компенсирующие «пустоты» одинакового или разного размеров относительно большой боковой цепи(ей) путем замены больших боковых аминокислотных цепей более меньшими цепями (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера относительно других нежелательных конечных продуктов, таких как гомодимеры. Биспецифические антитела, получаемые таким способом, указываются в тексте данной заявки как «антитела с выпуклостями».

Биспецифические антитела стоят из «гетероконъюгированных» антител или антител, присоединенных перекрестными связями. Например, одно антитело в гетероконъюгате может быть соединено с авидином, другое - с биотином. Такие антитела были предложены, например, для введения в иммунную систему против нежелательных клеток (патент США No. 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любого подходящего способа образования перекрестных связей. Науке известны подходящие агенты для образования перекрестных связей, и такие агенты описаны также в патенте США No. 4676980 вместе с целым рядом способов образования перекрестных связей.

Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также были описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены с образованием химической связи. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описывают процедуру, в которой интактные антитела подлежат протеолитическому расщеплению для получения фрагментов F(ab')₂. Такие фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплексообразователя (т.е. натрия арсенита) для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученные фрагменты Fab' затем преобразовывают в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из производных соединений Fab'-TNB переводят в Fab'-тиол путем восстановления с использованием меркаптоэтиламина, и затем смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут использоваться в качестве агентов для избирательной иммобилизации ферментов.

Недавний прогресс облегчил непосредственное восстановление фрагментов Fab'-SH из *E. coli*, и такие фрагменты могут быть соединены путем химической реакции с образованием биспецифических антител. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описал получение полностью гуманизированного биспецифического антитела F(ab')₂. Каждый фрагмент Fab' был секретирован отдельным образом из *E. coli* и подвергнут контролируемому химическому взаимодействию в условиях *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело было способно связываться с клетками, избыточно экспрессирующими рецептор ErbB2, и здоровыми Т-клетками человека, а также служило в качестве триггера литической активности человеческих цитотоксических лимфоцитов относительно мишеней-опухолей молочной железы.

Также были описаны различные способы получения и изоляции фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела были получены с использованием лейциновых молний. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun были соединены с участками Fab' двух различных антител путем

слияния генов. Гомодимеры антител были восстановлены в области каркасного участка с образованием мономеров и затем повторно окислены с образованием гетеродимеров антител. Такой способ также может использоваться для получения гомодимеров антител. Способ «диатела», описанный Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), предоставил альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител. Фрагменты состоят из V_H , присоединенного к V_L с помощью линкера, который является достаточно коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами одной и той же цепи. В соответствии с этим, домены V_H и V_L одного фрагмента соединяют с комплементарными доменами V_H и V_L другого фрагмента, образуя тем самым два антигенсвязывающих участка. Также сообщалась и другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител путем использования одноцепочечных димеров Fv (sFv). См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Изобретение описывает также антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Антитела-гетероконъюгаты

Данное изобретение также описывает антитела-гетероконъюгаты. Антитела-гетероконъюгаты состоят из двух присоединенных ковалентным образом антител. Такие антитела были предложены, например, для введения в иммунную систему против нежелательных клеток (патент США No. 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Предусматривается, что антитела могут быть получены *in vitro* с использованием известных в области химического синтеза белков способов, включая использование агентов, образующих перекрестные связи. Например, иммунотоксины могут быть созданы с использованием реакции обмена дисульфида или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для данной цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, а также реагенты, описанные, например, в патенте США No. 4676980.

7. Мультивалентные антитела

Мультивалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связывается антитело, быстрее, чем бивалентное антитело. Антитела данного изобретения могут быть представлены мультивалентными антителами (за исключением класса IgM) с тремя или более антигенсвязывающими участками (например, тетравалентные антитела), которые могут быть с легкостью получены путем использования рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Мультивалентное антитело может состоять из домена димеризации и трех или нескольких антигенсвязывающих участков. Преимущественный домен димеризации состоит из участка Fc или шарнирного участка. В таком случае антитело будет состоять из участка Fc и трех или более антигенсвязывающих участков на аминоконце относительно участка Fc. Преимущественное описываемое здесь мультивалентное антитело состоит из от трех до примерно восьми, но преимущественно четырех, антигенсвязывающих участков. Мультивалентное антитело состоит из по меньшей мере одной полипептидной цепи (и преимущественно двух полипептидных цепей), и такая полипептидная цепь (цепи) состоит из двух или более переменных доменов. Например, полипептидная цепь(и) может состоять из $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, при этом $VD1$ является первым переменным доменом, $VD2$ является вторым переменным доменом, Fc является первой полипептидной цепью участка Fc, $X1$ и $X2$ представляют аминокислоту или полипептид, и n составляет 0 или 1. Например, полипептидная цепь(и) будет состоять

из: цепь VH-CH1-гибкий линкер-VH-CH1-Fc участок; или цепь VH-CH1-VH-CH1-Fc участок. Описанное здесь мультивалентное антитело преимущественным образом будет дополнительно состоять из, по меньшей мере, двух (но предпочтительнее четырех) 5
вариабельных доменов легкой цепи полипептидов. Описанное здесь мультивалентное антитело может состоять, например, из примерно от двух до примерно восьми) 10
вариабельных доменов легкой цепи полипептидов. Вариабельные домены легкой цепи состоят из вариабельного домена легкой цепи и, в некоторых случаях, могут также включать домен CL.

8. Инжиниринг эффекторной функции

В некоторых случаях может быть необходимой модификация антитела по 10
изобретению относительно его эффекторной функции, например, для повышения антиген-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или 15
комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) антитела. Это может быть достигнуто путем введения одной или нескольких замен аминокислот в участок Fc антитела. С 20
другой стороны или кроме того, в участок Fc могут быть введены остатки цистеина, что приводит к образованию дисульфидных мостиков между цепями в данном участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать повышенной 25
способностью к интернализации и/или повышенной способностью к комплемент-опосредованной гибели клеток и/или антител-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). См. Caron et al., *J. Exp Med.*, 176:1191-1195 (1992) и Shopes, B., *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой 30
активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных кросс-линкеров, как это описано Wolff et al., *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). С другой стороны, антитело может быть получено в результате рекомбинации с наличием 35
двойных участков Fc, что объясняет повышенный лизис комплемента и свойства АЗКЦ. См. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Для повышения времени полужизни антитела в сыворотке, в антитело может быть введена антигенная 40
детерминанта для связывания со «спасительным» рецептором (в частности, фрагмент антитела), как это описано, например, в патенте США No. 5739277. В контексте данного изобретения термин «антигенная детерминанта для связывания со «спасительным» 45
рецептором» относится к антигенной детерминанте участка Fc молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), которая ответственна за повышение периода полужизни в сыворотке *in vivo* молекулы IgG.

9. Иммуноконъюгаты

Изобретение описывает иммуноконъюгаты (или конъюгаты антитело-препарат, или 35
КАП (используются взаимозаменяемым образом)), состоящие из антитела, конъюгированного с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, препарат, агент-ингибитор роста, токсин (например, ферментативно активный токсин 40
бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивным изотопом (т.е. радиоиммуноконъюгат).

В определенных вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат состоит из антитела и химиотерапевтического агента или другого токсина. Химиотерапевтические агенты, используемые в получении таких иммуноконъюгатов, уже были описаны выше. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться, 45
включают А цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana proteins* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*,

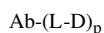
курцин, кротин, ингибитор из *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Для получения радиоконъюгированных антител имеется целый ряд радионуклидов. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием целого ряда бифункциональных белоксвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис (p-азидобензойл) гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(p-дiazониябензойл)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен в соответствии с описанием, представленным в Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатным агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO94/11026.

Конъюгаты антитела и одного или нескольких небольших молекул токсинов, таких как калихимицин, белки ауристатины, такие как монометилауристин (ММАЕ) (синтетический аналог доластатины), майтансиноиды, такой как DM1, трихотен и CC1065, а также производные таких токсинов, обладающие активностью токсина, также могут использоваться.

Типичные иммуноконъюгаты - конъюгаты антитело-препарат

Иммуноконъюгат (или «конъюгат антитело-препарат» («КАП»)) по изобретению могут быть представлены соединениями по Формуле I (см. ниже), при этом антитело конъюгировано (т.е. связано ковалентной связью) с одной или несколькими молекулами препарата (D) посредством линкера (L) (в некоторых случаях). КАП могут включать конъюгаты ТиоМАТ-препарат («КТП»).



I

Согласно этому, антитело может быть конъюгировано с препаратом непосредственным образом или посредством линкера. В Формуле I p является средним числом молекул препарата на молекулу антитела, и такое число может варьировать, например, от примерно 1 до примерно 20 молекул препарата на антитело, и в некоторых вариантах воплощения изобретения - от 1 до примерно 8 молекул препарата на антитело. Изобретение включает композицию, состоящую из смеси соединений антител-препаратов по Формуле I, при этом средний показатель нагрузки препарата на антитело составляет от примерно 2 до примерно 5 или от примерно 3 до примерно 4.

а. Типичные линкеры

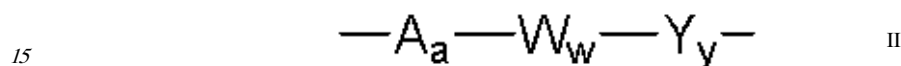
Линкер может состоять из одного или нескольких линкерных компонентов. Типичные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил («МС»), малеимидопропанойл («ПР»), валин-цитруллин («вал-цит» или «vc»), аланин-фенилаланин («ала-фен»), p-аминобензилоксикарбонил («РАВ»), а также следующие линкеры, образованные в результате конъюгации с линкерными реагентами: N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио) пентаноат-образующий линкер 4-меркаптопентановой кислоты («SPP»), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1 карбоксилатобразующая линкерная молекула 4-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)метил)циклогексанкарбоновая кислота («SMCC», также указывается здесь как «MCC»), 2,5-диоксопирролидин-1-ил 4-(пиридин-2-илдисульфанил) бутанобразующая линкерная молекула 4-меркаптобутановой

кислоты («SPDB»), N-сукцинимидил (4-йодо-ацетил) аминокислота («SIAB»), этиленокси-
-CH₂CH₂O- в виде одной или нескольких повторяющихся единиц («EO» или «PEO»).

Дополнительные линкерные компоненты также известны науке, и некоторые из них описаны в данной заявке.

5 Линкер может быть представлен «расщепляемым линкером», который облегчает высвобождение препарата в клетке. Например, могут использоваться кислотнеустойчивый линкер (например, гидразон), протеазо-чувствительный линкер (например, пептидазо-чувствительный), фотонестойчивый линкер, диметилловый линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); патент
10 США No. 5208020).

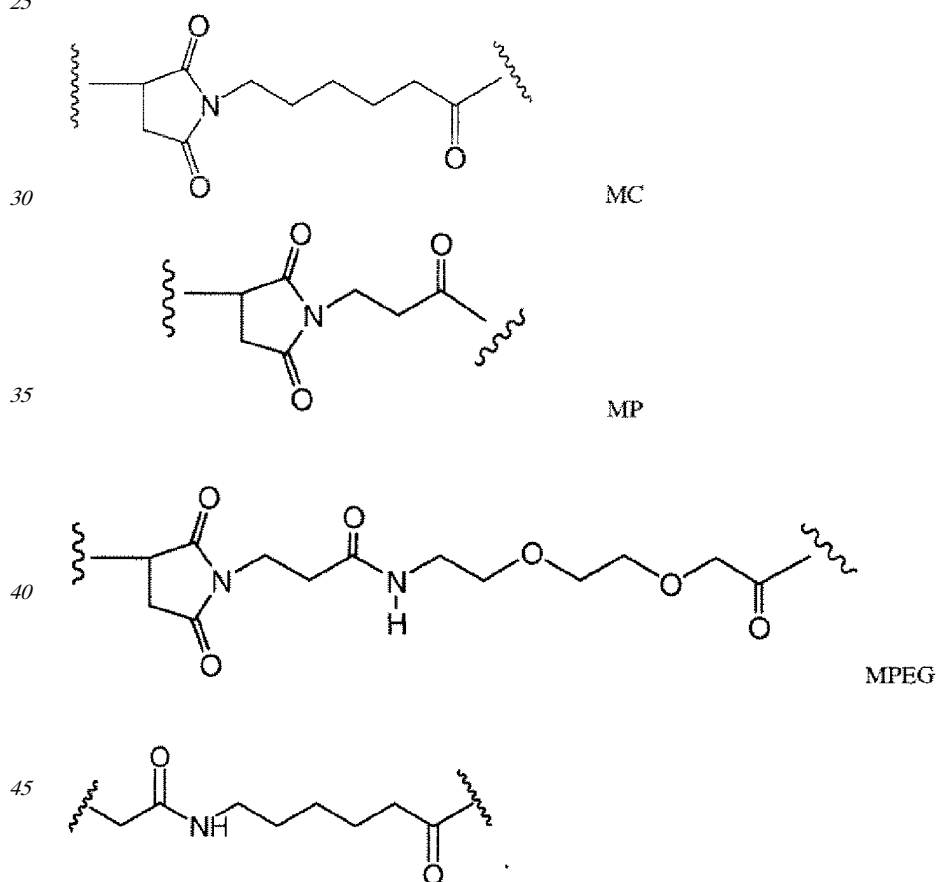
В определенных вариантах воплощения изобретения линкер представлен линкером по Формуле II:



где A является расширяющей единицей, и a является целым числом от 0 до 1; W является единицей аминокислоты, и w - целым числом от 0 до 12; Y является спейсерной единицей, и y - число 0, 1 или 2; и AT, D и p определяются согласно Формуле I.

20 Типичные варианты воплощения изобретения с такими линкерами описаны в US 2005-0238649 A1 (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки).

В некоторых вариантах воплощения изобретения линкерный компонент может состоять из «расширяющей единицы», которая связывает антитело с другим компонентом линкера или молекулой препарата. Типичные расширяющие единицы
25 представлены ниже (волнистая линия указывает на ковалентную связь с антителом):



В некоторых вариантах воплощения изобретения линкерный компонент может

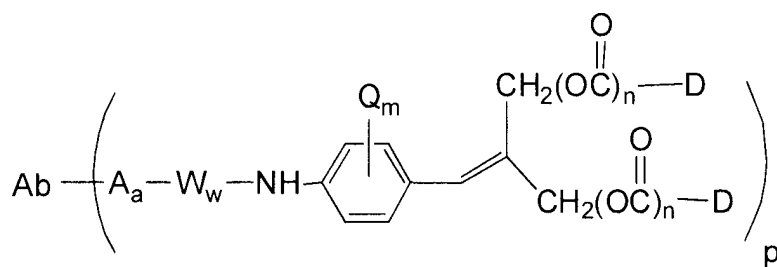
состоять из аминокислотной единицы. В одном таком варианте воплощения изобретения аминокислотная единица позволяет осуществлять расщепление линкера протеазой, облегчая, таким образом, высвобождение препарата из иммуноконъюгата под воздействием внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты. См., например, Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784. Типичные аминокислотные единицы включают, но не ограничиваются, дипептид, трипептид, тетрапептид и пентапептид. Типичные дипептиды включают следующие: валин-цитруллин (vc или вал-цит), аланин-фенилаланин (af или ала-фен); фенилаланин-лизин (fk или фен-лиз); или N-метил-валин-цитруллин (Me-вал-цит). Типичные трипептиды включают следующие: глицин-валин-цитруллин (гли-вал-цит) и глицин-глицин-глицин (гли-гли-гли). Аминокислотная единица может состоять из аминокислотных остатков, которые встречаются естественным образом, а также редкие аминокислоты и не представленные в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные единицы могут быть получены и оптимизированы в своей избирательности на предмет ферментативного расщепления отдельным ферментом, например, опухолеассоциированной протеазой, катепсином В, С и D или плазмином.

В некоторых вариантах воплощения изобретения линкерный компонент может состоять из «спейсерной» единицы, которая связывает антитело с молекулой препарата непосредственно или посредством «расширяющей единицы» и/или аминокислотной единицы. Спейсерная единица может быть «саможертвующей» или «не саможертвующей». «Не саможертвующая» спейсерная единица представляет собой единицу, которая полностью или частично остается связанной с молекулой препарата до момента ферментативного (например, протеолитического) расщепления КАП. Примеры «не саможертвующей» спейсерной единицы включают, но не ограничиваются, глициновую спейсерную единицу и глицин-глициновую спейсерную единицу. Также рассматриваются и другие комбинации пептидных спейсеров, восприимчивых к специфичному ферментативному расщеплению последовательности. Например, ферментативное расщепление КАП, содержащего глицин-глициновую спейсерную единицу, с помощью протеазы опухолевой клетки приведет к высвобождению молекулы глицин-глицин-препарат из оставшегося КАП. В одном подобном варианте воплощения изобретения молекула глицин-глицин-препарат затем подвергается отдельному этапу гидролиза в опухолевой клетке, который приводит к высвобождению спейсера глицин-глицин от молекулы препарата.

«Саможертвующая» спейсерная единица представляет собой единицу, которая позволяет молекуле препарата высвободиться без отдельного этапа гидролиза. В определенных вариантах воплощения изобретения спейсерная единица линкера состоит из р-аминобензиловой единицы. В одном таком варианте воплощения изобретения к аминокислотной единице присоединен р-аминобензиловый спирт посредством амидной связи, а между бензиловым спиртом и цитотоксическим агентом образуются карбамат, метилкарбамат или карбонат. См., например, Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103. В одном варианте воплощения изобретения спейсерная единица представлена р-аминобензилоксикарбонилем (РАВ). В определенных вариантах воплощения изобретения участок фенилена р-аминобензиловой единицы замещен Qm, при этом Q представлен -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, - нитро или -циано; и m представлен целым числом в пределах 0-4. Примеры саможертвующих спейсерных единиц дополнительно включают, но не ограничиваются, ароматические соединения, которые по своей электронной структуре подобны р-аминобензиловому спирту (см, например, US 2005/0256030 A1), такие как производные 2-аминоимидазол-

5-метанола (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), а также орто- или пара-аминобензилацетали. Могут использоваться спейсеры, которые при гидролизе амидной связи образуют кольцо, среди них замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); надлежащим образом замещенные бициклические системы [2.2.1] и [2.2.2] (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); а также амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). Элиминация аминоксодержащих препаратов, замещенных в положении α глицина (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447), также является примером саможертвующих спейсеров, используемых для КАП.

В одном варианте воплощения изобретения спейсерная единица представлена разветвленной единицей бис(гидроксиметил)стирена (BHMS) (см. ниже), и может использоваться для введения и высвобождения множественных препаратов.



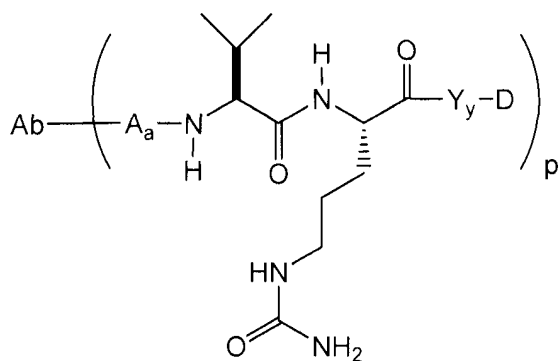
ферментативное
расщепление

2 препарата

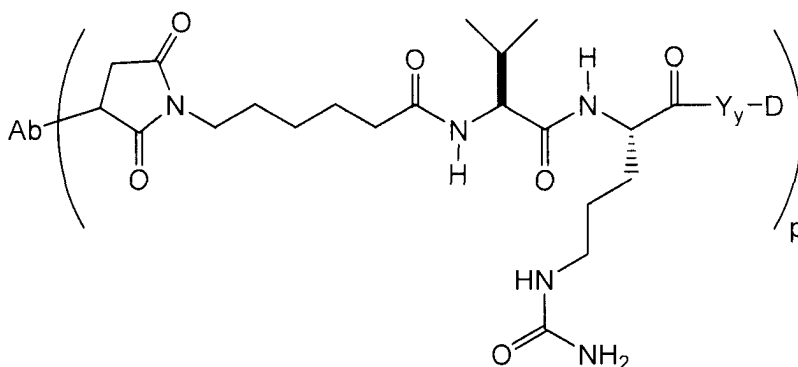
где Q является -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, -нитро или -циано; m является целым числом, варьирующим от 0 до 4; n составляет 0 или 1; и p варьирует от 1 до примерно 20.

В другом варианте воплощения изобретения линкер L может быть представлен линкером разветвленного типа для ковалентного присоединения более одной молекулы препарата посредством разветвленной, мультифункциональной линкерной молекулы с антителом (Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Разветвленные линкеры могут повышать молярное соотношение препарата к антителу, т.е. нагрузку, которая является одной из характеристик активности КАП. Таким образом, в то время как антитело с введенным в ходе рекомбинации цистеином может содержать только одну реакционноспособную тиоловую группу, посредством разветвленного линкера может быть присоединено множество молекул препарата.

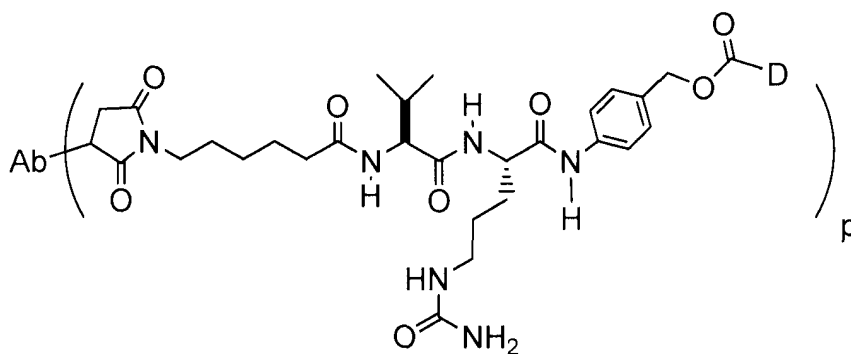
Типичные линкерные компоненты и их комбинации представлены ниже в контексте КАП по Формуле II:



Вал-цит или VC



МС-вал-цит



МС-вал-цит-РАВ

Линкерные компоненты, включая расширитель, спейсер и аминокислотные единицы, могут быть получены в ходе синтеза с использованием известных науке способов, например, описанных в US 2005-0238649 A1.

б. Молекулы типичных препаратов

(1) Майтансин и майтансиноиды

В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат состоит из антитела, конъюгированного с одной или несколькими молекулами майтансиноидов. Майтансиноиды являются ингибиторами митоза и действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтансин впервые был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США No. 3896111). Впоследствии было выявлено, что определенные микроорганизмы также вырабатывают майтансиноиды, например, майтансинол и С-3 эфиры майтансинола (патент США No.4 151 042). Синтетический майтансинол и его производные и аналоги описаны, например, в следующих патентах США No: 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; и 4371533.

Молекулы препаратов-майтансиноидов являются эффективными молекулами препарата в конъюгатах антитело-препарат по следующим причинам: (i) они

относительно доступны для получения путем ферментации или химической модификации или дериватизации продуктов ферментации; (ii) они легко поддаются дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации посредством образования дисульфидных и других связей с антителами; (iii) они устойчивы в плазме; и (iv) они являются эффективными относительно целого ряда опухолевых клеток.

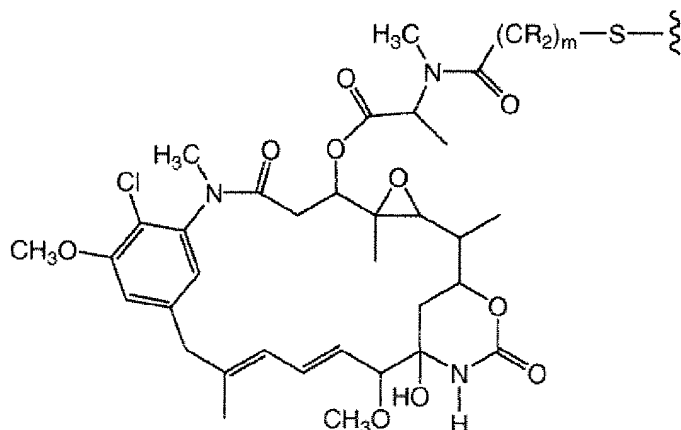
Подходящие для использования в качестве молекул препаратов майтансиноида соединения майтансина широко известны в науке и могут быть выделены из природных источников согласно известным способам или получены путем генной инженерии и способов ферментации (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). Майтансинол и аналоги майтансинола также могут быть получены в ходе синтеза с соблюдением известных способов.

Типичные молекулы препарата майтансиноида включают соединения с измененным ароматическим кольцом, такие как: C-19-дехлор (патент США No. 4256746) (получен путем восстановления ансатомицина P2 алюмогидридом лития); C-20-гидроксид (или C-20-деметил) +/-C-19-дехлор (патент США No. 4361650 и 4307016) (получен путем деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или отщеплением хлора с использованием LАН); и C-20-деметокси, C-20-ацилоксид (-OCOR), +/-дехлор (патент США No. 4294757) (получен путем ацилирования с использованием ацилхлоридов), а также соединения с модификациями в других положениях.

Типичные молекулы препарата майтансиноида также включают соединения со следующими модификациями: C-9-SH (патент США No. 4424219) (получен в ходе реакции майтансинола с H₂S или P₂S₅); C-14-алкоксиметил(деметокси/CH₂ OR)(US 4331598); C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США No. 4450254) (получен из *Nocardia*); C-15-гидроксид/ацилоксид (US 4364866) (получен в ходе преобразования майтансинола *Streptomyces*); C-15-метокси (патент США No. 4313946 и 4315929) (выделен из *Trewia nudiflora*); C-18-N-деметил (патент США No. 4362663 и 4322348) (получен путем деметилирования майтансинола *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (US 4371533) (получен путем восстановления майтансинола титания трихлоридом/ЛАН).

В соединениях майтансина известно много положений, которые могут использоваться для образования связи, в зависимости от типа связи. Например, для образования эфирной связи могут использоваться положение C-3 с гидроксильной группой, положение C-14 с гидроксиметилем, положение C-15 с гидроксильной группой и положение C-20 с гидроксильной группой (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

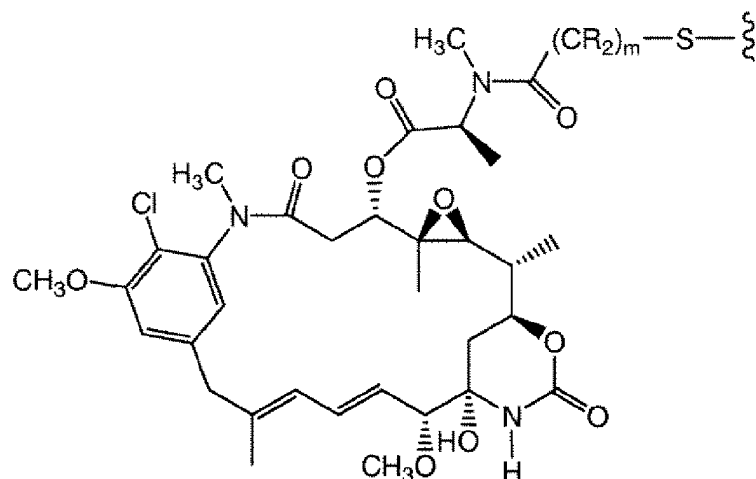
Молекулы препарата майтансиноида могут иметь следующую структуру:



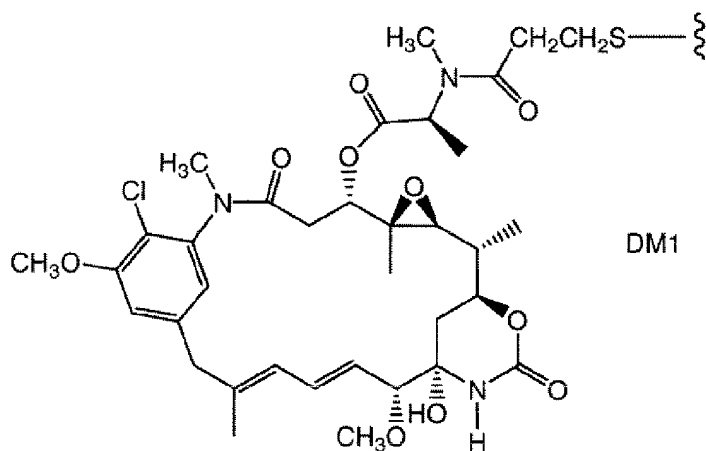
где волнистой линией указано ковалентное присоединение атома серы молекулы

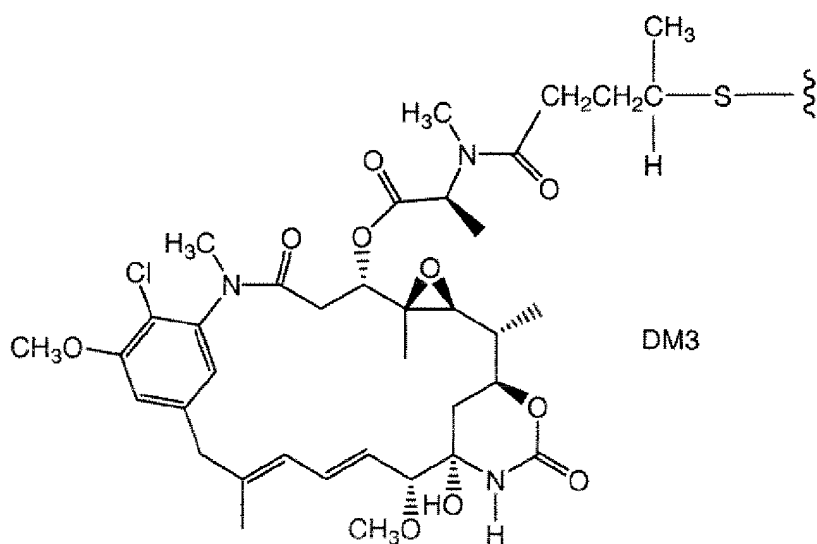
препарата майтансиноида с линкером КАТ. R может быть представлен независимым образом H или C₁-C₆ алкилом. Цепь алкилена, присоединяющая амидную группу к атому серы, может быть представлена метанилом, этанилом или пропилом, т.е. m составляет 1, 2 или 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al (1992) *Cancer Res.* 52:127-131; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. SciUSA* 93:8618-8623).

Все стереоизомеры молекулы препарата майтансиноида также включены в качестве соединений для данного изобретения, т.е. включены любые комбинации конфигураций R и S в положении хиральных атомов углерода D. В одном варианте воплощения изобретения молекула препарата майтансиноида будет иметь следующее стереохимическое строение:

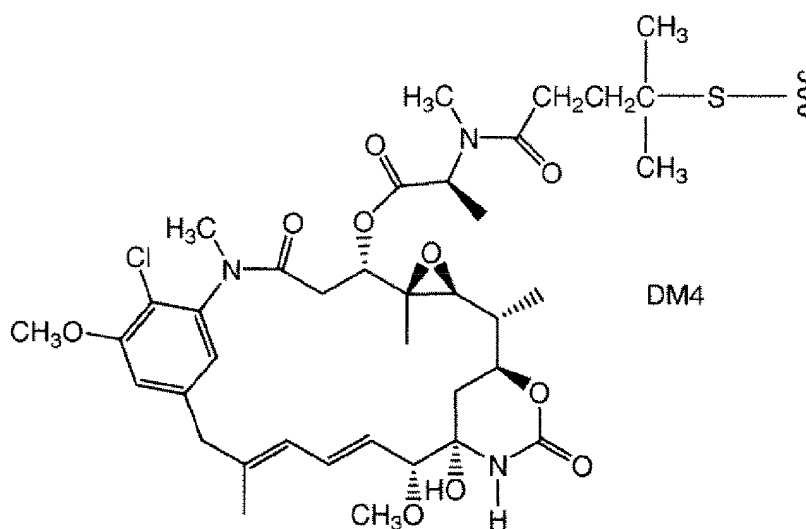


Типичные варианты воплощения изобретения с использованием молекул препарата майтансиноида включают DM1; DM3; и DM4 со следующей структурой:





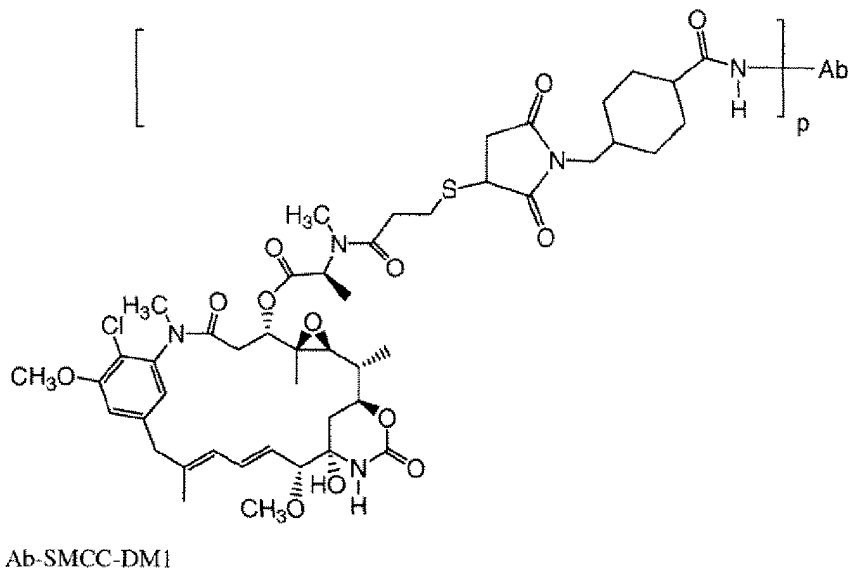
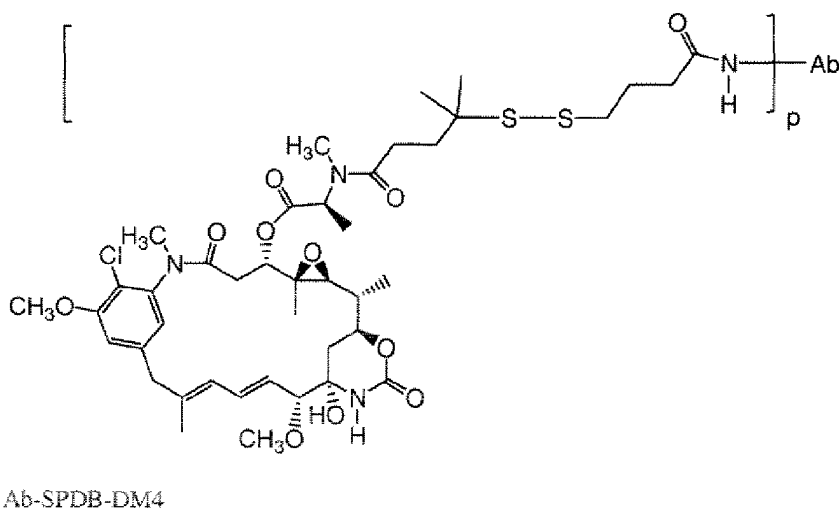
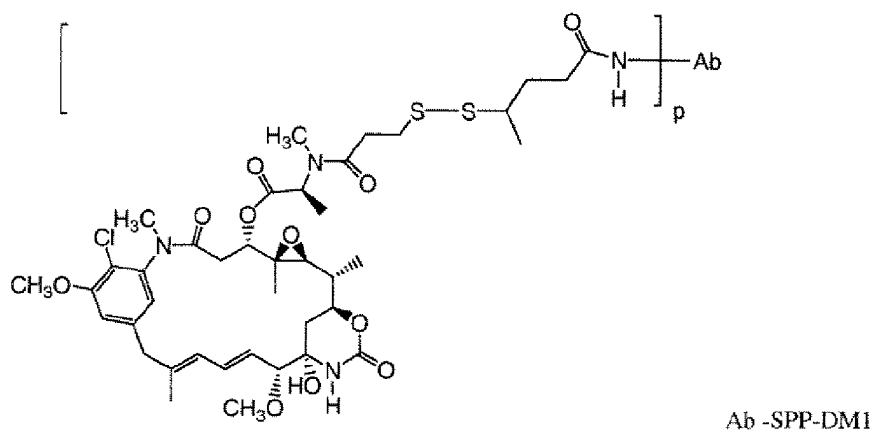
DM3



DM4

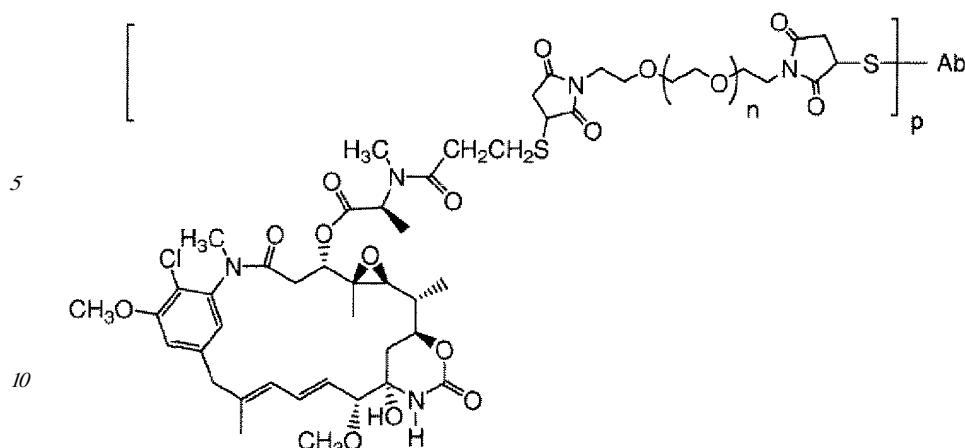
где волнистой линией указано ковалентное присоединение атома серы молекулы препарата мaitансиноида с линкером (L) конъюгата антитело-препарат. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

Другие типичные конъюгаты антитела-мaitансиноида имеют следующую структуру обозначение (где АТ - антитело, и r составляет от 1 до примерно 8):



В одном варианте воплощения изобретения образуется конъюгат антитело-препарат, в котором DM4 присоединен посредством линкера SPDB к тиоловой группе антитела (см. патент США No. 6913748 и 7276497 (включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки)).

Типичные конъюгаты антитело-препарат, в которых DM1 присоединен посредством линкера BMPEO к тиоловой группе антитела, имеют следующую структуру и обозначение:



где АТ - антитело, n равно 0, 1 или 2; и p равно 1, 2, 3 или 4.

Иммуноконъюгаты, содержащие майтансиноиды, способы их получения и их терапевтическое использование, описаны, например, в Erickson, et al (2006) *Cancer Res.* 66(8):4426-4433; патенте США No. 5208020, 5416064, US 2005/0276812 A1, и Европейском патенте EP 0425235 B1 (включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки).

Конъюгаты антитело-майтансиноид получают путем химической реакции антитела с молекулой майтансиноида без существенного уменьшения биологической активности антитела или молекулы майтансиноида. См., например, патент США No. 5208020 (включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки). Майтансиноиды могут быть синтезированы с использованием известных способов или выделены из естественных источников. Подходящие майтансиноиды описаны, например, в патенте США No. 5208020, а также в других патентных и непатентных публикациях, относящихся к упомянутым выше соединениям, такие как майтансинол и аналоги майтансиноида, модифицированные в части ароматического кольца или других положениях молекулы майтансинола, такие как различные эфиры майтансинола.

Науке известно множество групп сопряжения для получения конъюгатов антитело-майтансиноид, включая, например, группы, описанные в патенте США 5208020 или патенте EP 0 425 235 B1; Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992); и US 2005/016993 A1 (включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки). Конъюгаты антитело-майтансиноид, состоящие из линкерного компонента SMCC, могут быть получены в соответствии с процедурой, описанной в US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods." Линкер может состоять из дисульфидных групп, тиоэфирных групп, кислотонеустойчивых групп, фотонеустойчивых групп или эстераzoneустойчивых групп, как это описано в указанных выше патентах. Описание и примеры дополнительных линкеров приводятся в тексте данной заявки.

Конъюгаты антитела и майтансиноида получают с использованием целого ряда бифункциональных белоксвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителиол) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис-(p-азидобензойл) гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(p-дiazониябензойл)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В определенных вариантах воплощения изобретения связующий агент представлен N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителио) пропионатом (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:

723-737 (1978)) или N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноатом (SPP) для образования дисульфидной связи.

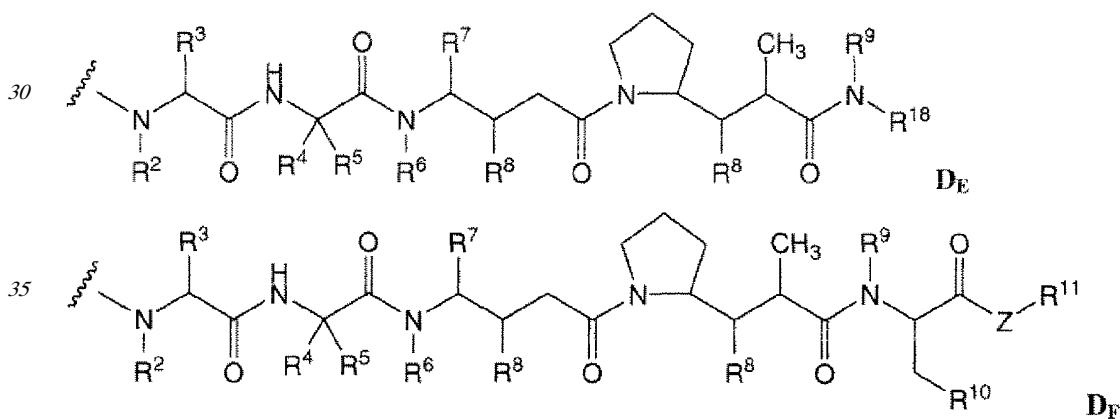
Линкер может быть присоединен к молекуле майтансиноида в различных положениях, в зависимости от типа связи. Например, в ходе реакции с гидроксильной группой с использованием стандартных способов связывания может быть образована эфирная связь. Реакция может произойти в положении С-3 с гидроксильной группой, положении С-14, модифицированном гидроксиметилом, положении С-15, модифицированном гидроксильной группой, и положении С-20 с гидроксильной группой. В одном варианте воплощения изобретения связь образована в положении С-3 майтансинола или аналога майтансиноида.

(2) Ауристатины и доластатины

В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат состоит из антитела, конъюгированного с доластатином или пептидным аналогом доластатина, или его производным, например, ауристатином (патент США No. 5635483; 5780588). Было показано, что доластатины и ауристатины влияют на динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ, а также деление клетки и ядра (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584), и обладают противораковой (патент США No.5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Молекула препарата доластатин или ауристатин может быть присоединена к антителу посредством N(амино)-конца или C(карбоксил)-конца пептидной молекулы препарата (WO 02/088172).

Типичные варианты воплощения изобретения, включающие использование ауристатина, включают присоединенные к N-концу молекулы монометилауристатина DE и DF (US 2005/0238649, представлено в Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Том 45, Абзац № 623, 28 марта 2004 г., включено в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки).

Пептидная молекула препарата может быть выбрана из Формул D_E и D_F ниже:



где волнистой линией D_E и D_F указан участок ковалентного присоединения к антителу или компоненту антитело-линкер, и независимым образом для каждого положения:

R² выбирается из H и C₁-C₈ алкила;

R³ выбирается из H, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла, арила, C₁-C₈ алкил-арила, C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ карбоцикла), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ гетероцикла);

R⁴ выбирается из H, C₁-C₈ алкила, C₃-C₈ карбоцикла, арила, C₁-C₈ алкил-арила, C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ карбоцикла), C₃-C₈ гетероцикла и C₁-C₈ алкил-(C₃-C₈ гетероцикла);

R^5 выбирается из H и метила;

или R^4 и R^5 вместе образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу $-(CR^aR^b)_n-$,

в которой R^a и R^b выбираются независимым образом из H, C_1 - C_8 алкила и C_3 - C_8 карбоцикла и n выбирается из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбирается из H и C_1 - C_8 алкила;

R^7 выбирается из H, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла, арила, C_1 - C_8 алкил-арила, C_1 - C_8 алкил-(C_3 - C_8 карбоцикла), C_3 - C_8 гетероцикла и C_1 - C_8 алкил-(C_3 - C_8 гетероцикла);

каждый R^8 выбирается независимым образом из H, OH, C_1 - C_8 алкила, C_3 - C_8 карбоцикла и O-(C_1 - C_8 алкила);

R^9 выбирается из H и C_1 - C_8 алкила;

R^{10} выбирается из арила или C_3 - C_8 гетероцикла;

Z представлен O, S, NH или NR^{12} , и R^{12} представлен C_1 - C_8 алкилом;

R^{11} выбирается из H, C_1 - C_{20} алкила, арила, C_3 - C_8 гетероцикла, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ или $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m является целым числом и варьирует от 1 до 1000;

R^{13} представлен C_2 - C_8 алкилом;

R^{14} представлен H или C_1 - C_8 алкилом;

каждый R^{15} представлен независимым образом H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ или $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ алкилом;

каждый R^{16} представлен независимым образом H, C_1 - C_8 алкилом или $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} выбирается из $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арила, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C_3 - C_8 гетероцикла) и $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C_3 - C_8 карбоцикла); и

n является целым числом и варьирует от 0 до 6.

В одном варианте воплощения изобретения R^3 , R^4 и R^7 представлены независимым образом изопропилом или вторичным бутилом, и R^5 представлен -H или метилом. В типичном варианте воплощения изобретения R^3 и R^4 представлены изопропилом, R^5 представлен -H, и R^7 представлен вторичным бутилом.

В еще одном варианте воплощения изобретения R^2 и R^6 представлены метилом и R^9 представлен -H.

В еще одном варианте воплощения изобретения каждый R^8 представлен $-OCH_3$.

В типичном варианте воплощения изобретения R^3 и R^4 представлены изопропилом, R^2 и R^6 представлены метилом, R^5 представлен -H, R^7 представлен вторичным бутилом, каждый R^8 представлен $-OCH_3$, и R^9 представлен -H.

В одном варианте воплощения изобретения Z представлен -O- или -NH-.

В одном варианте воплощения изобретения R^{10} представлен арилом.

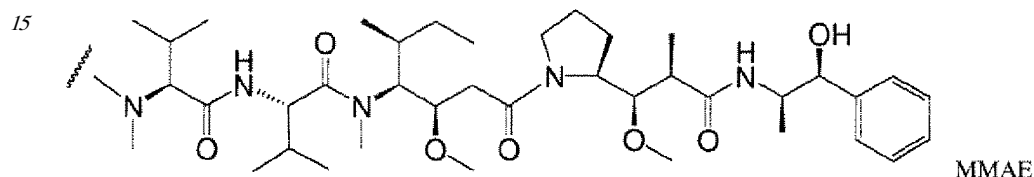
В типичном варианте воплощения изобретения R^{10} представлен фенилом.

В типичном варианте воплощения изобретения Z представлен -O-, R^{11} представлен -H, метилом или t-бутилом.

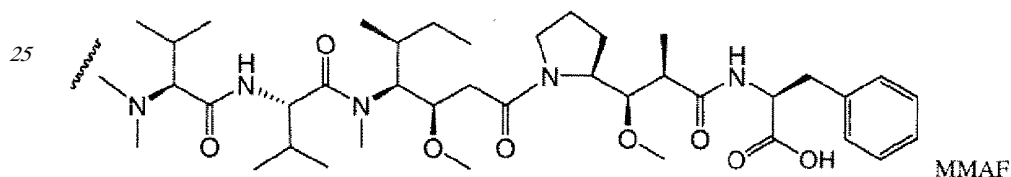
В одном варианте воплощения изобретения, где Z представлен -NH, R^{11} представлен -CH(R^{15})₂, R^{15} представлен -(CH₂)_n-N(R^{16})₂, и R^{16} представлен -C₁-C₈ алкилом или -(CH₂)_n-COOH.

В другом варианте воплощения изобретения, где Z представлен -NH, R^{11} представлен -CH(R^{15})₂, и R^{15} представлен -(CH₂)_n-SO₃H.

Типичный вариант воплощения изобретения, предусматривающий использованием ауристатина по формуле D_E, представлен MMAE, при этом волнистая линия указывает на ковалентную связь между линкером (L) и конъюгатом антитело-препарат:



Типичный вариант воплощения изобретения, предусматривающий использование ауристатина по формуле D_F, представлен MMAF, при этом волнистая линия указывает на ковалентную связь между линкером (L) и конъюгатом антитело-препарат (см. US 2005/0238649 и Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):

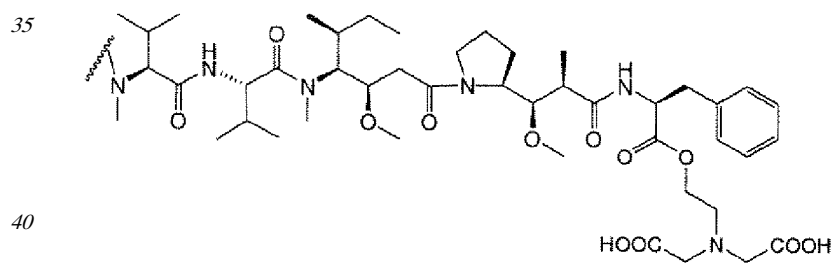
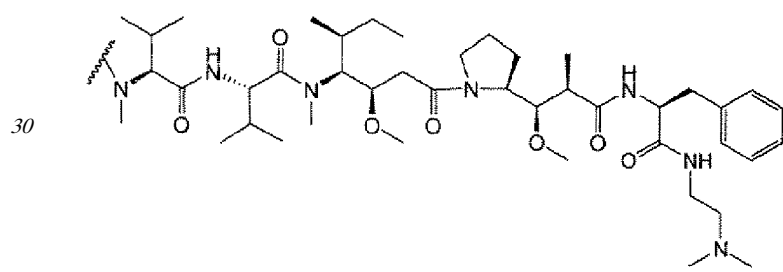
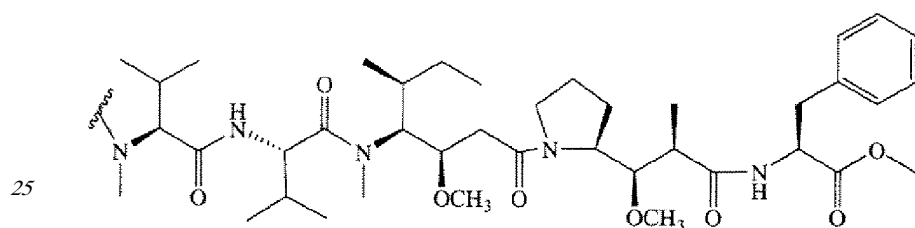
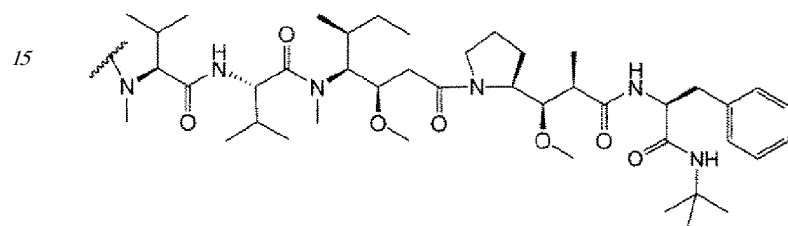
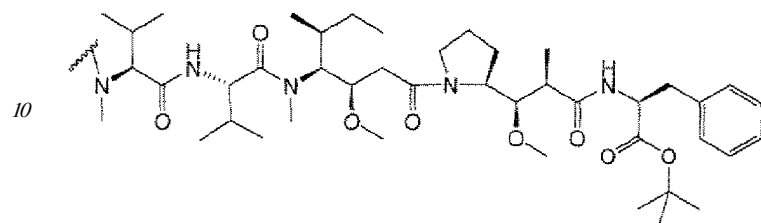
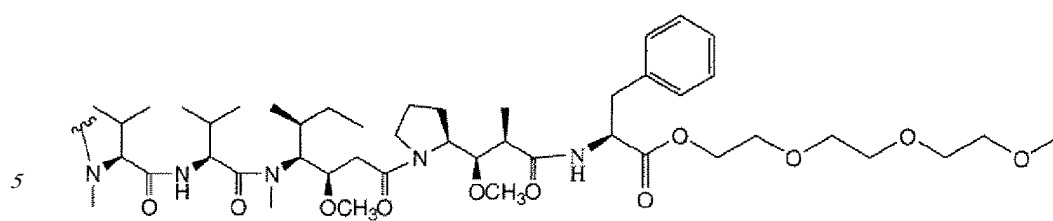


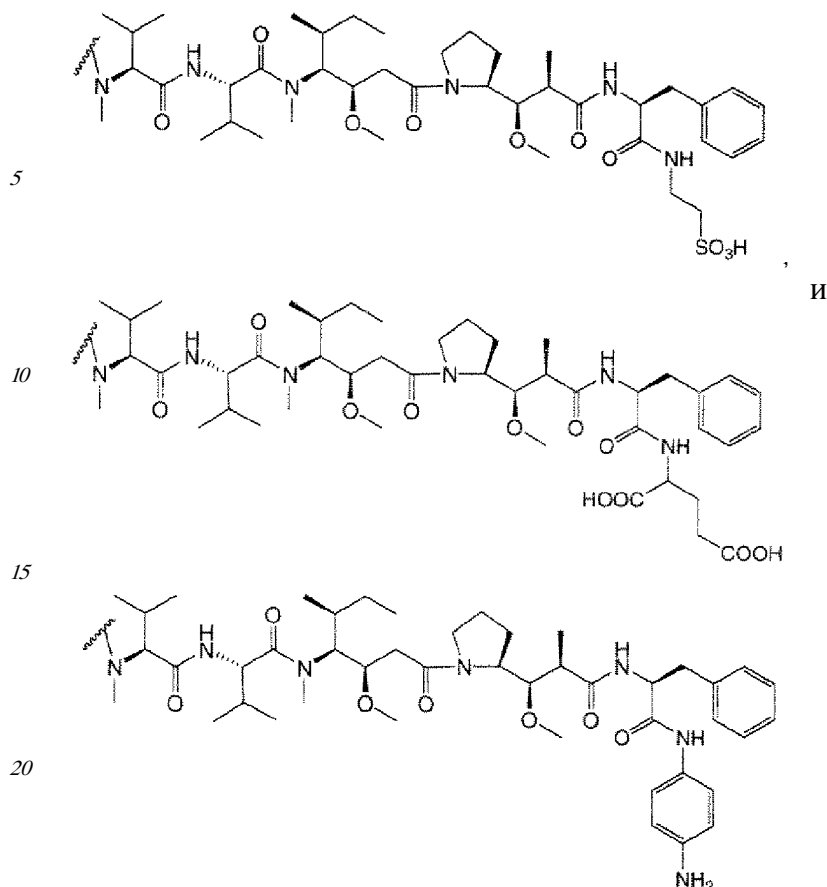
Другие типичные варианты воплощения изобретения включают соединения
 30 монометилвалина, которые имеют карбоксильные модификации фенилаланина на C-конце пентапептидной молекулы препарата ауристатин (WO 2007/008848), и соединения монометилвалина, которые имеют модификации боковой цепи фенилаланина на C-конце пентапептидной молекулы препарата ауристатин (WO 2007/008603).

Другие молекулы препаратов включают следующие производные MMAF, при этом
 35 волнистая линия указывает на ковалентную связь между линкером (L) и конъюгатом антитело-препарат:

40

45

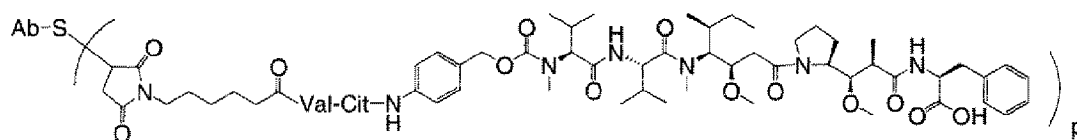




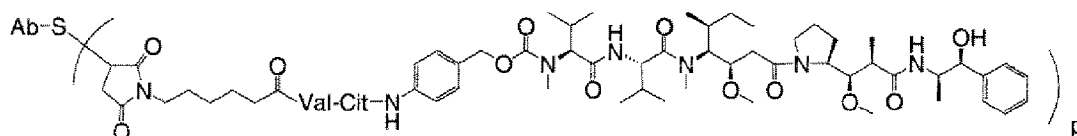
В одном аспекте изобретения, гидрофильные группы включают, но не
 25 ограничиваются, эфиры триэтиленгликоля (ТЭГ), как это показано выше, и такие группы могут быть присоединены к молекуле препарата в положении R¹¹. Не придерживаясь какой-либо отдельной теории, гидрофильные группы помогают в интернализации и отсутствии агрегации молекулы препарата.

Типичные варианты воплощения изобретения КАП по Формуле I, содержащие
 30 ауристатин/доластатин или его производное описаны в US 2005-0238649 и Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124 (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). Типичные варианты воплощения изобретения КАП по Формуле I, содержащие ауристатин ММАЕ или ММАF и различные линкерные компоненты, имеют следующую структуру и обозначение (при этом «АТ» обозначает
 35 антитело; р составляет от 1 до примерно 8; «Вал-Цит» или «vc» представляет дипептид валин-цитруллин; и «S» является атомом серы). Следует отметить, что в отдельных структурных описаниях сера присоединена к КАП, и такие антитела указываются как «АТ-S» просто для указания связи с серой, а не для указания того, что отдельный атом серы присоединен с несколькими молекулам линкер-препарат. Скобка слева на
 40 следующих структурах может быть также поставлена слева от атома серы, между АТ и S, что будет равнозначно описанию КАП по изобретению, описанному в тексте данной заявки.

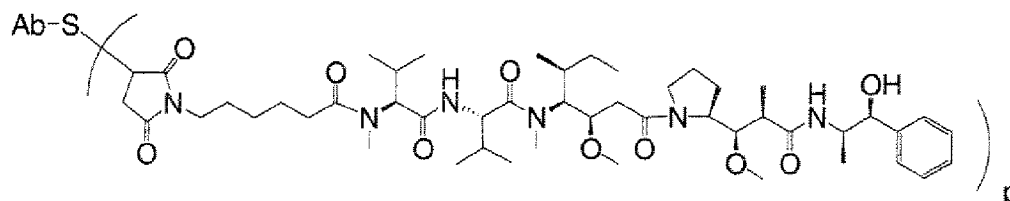
45



5 Ab-MC-vc-PAB-MMAF

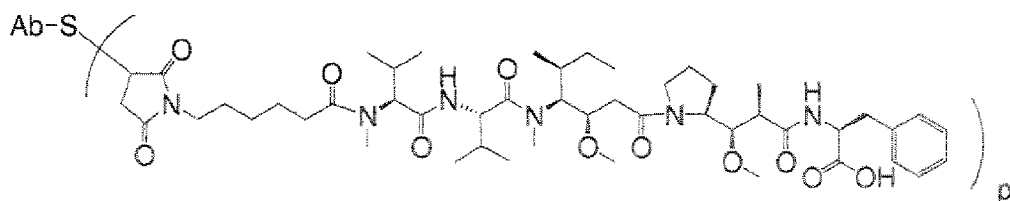


10 Ab-MC-vc-PAB-MMAE



15

Ab-MC-MMAE



20

25 Типичные варианты воплощения изобретения КАП по Формуле I, состоящие из MMAF и различные линкерные компоненты, дополнительно включают АТ-МС-РАВ-ММАF и АТ-РАВ-ММАF. Интересно, что иммуноконъюгаты, состоящие из MMAF, присоединенного к антителу с помощью линкера, не поддающегося протеолитическому расщеплению, обладают активностью, сопоставимой с иммуноконъюгатами, состоящими из MMAF, присоединенного к антителу с помощью расщепляемого в ходе протеолиза линкера. См. Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. В таких случаях
30 считается, что высвобождение препарата осуществляется путем распада антитела в клетке. *Id.*

Как правило, молекулы препарата, основанные на пептиде, могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, согласно способу синтеза в жидкой фазе (см. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Молекулы препарата ауристатин/доластатин могут быть получены с использованием способов, представленных в следующих источниках: US 2005-0238649 A1; патент США No.5635483; патент США No.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; и Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

В частности, молекулы препарата ауристатин/доластатин по формуле D_F, такие как MMAF и его производные, могут быть получены с использованием способов, описанных в US 2005-0238649 A1 и Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Молекулы препарата ауристатин/доластатин по формуле D_F, такие как MMAF и его производные, могут быть получены с использованием способов, описанных в Doronina et al. (2003)

Nat. Biotech. 21:778-784. Молекулы препарат-линкер MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAВ-MMAF и MC-vc-PAВ-MMAE могут быть синтезированы с использованием стандартных способов, описанных, например, в Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21: 778-784, и публикации заявки на патент No. US2005/0238649A1, а затем конъюгированы с интересующим антителом.

(3) Калихимицин

В других вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат состоит из антитела, конъюгированного с одной или несколькими молекулами калихимицина. Семейство антибиотиков калихимицина способно индуцировать разрыв двухнитевой ДНК в суб-пикомолярных концентрациях. Для получения конъюгатов с препаратами семейства калихимицина см. патенты США No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все компании American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихимицина, которые также могут использоваться, включают, но не ограничиваются, γ_1^1 , γ_2^1 , γ_3^1 , N-ацетил- γ_1^1 , PSAG и θ^1_1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993) и Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Другой противоопухолевый препарат, с которым может быть конъюгировано антитело, представлен QFA, который является антифолатом. Калихимицин и QFA имеют внутриклеточные участки действия и с трудом пересекают плазматическую мембрану. Таким образом, клеточный захват таких агентов посредством антитело-опосредованной интернализации, значительно повышает их цитотоксический эффект.

в. Другие цитотоксические агенты

Другие противоопухолевые препараты, которые могут быть конъюгированы с антителом, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство препаратов, известных в целом как комплекс LL-E33288, описанный в патентах США No. 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США No. 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться, включают А цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованный 28 октября 1993 г.

Данное изобретение дополнительно включает иммуноконъюгат, образованный между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеазой, ДНКазой).

В определенных вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат может состоять из высокорadioактивного атома. Для получения радиоconъюгированных антител имеется целый ряд радиоактивных изотопов. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Если иммуноконъюгат используется для определения, он может состоять из радиоактивного атома для сцинтиграфического анализа, например, tc^{99m} или I^{123} , или спин-метки для ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) визуализации (также известной как магнитно-резонансное томографирование (МРТ)), такой как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радио- или другие метки могут быть введены в иммуноконъюгат с использованием известных способов. Например, пептид может быть получен в ходе биосинтеза, или он

может быть синтезирован путем химического синтеза аминокислот с использованием подходящих предшественников аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Такие метки как ^{99m}Tc или ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re и ^{111}In могут быть присоединены посредством остатка цистеина в пептиде. Итрий-90 может быть присоединен посредством остатка лизина. Способ йодирования IODOGEN (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) может использоваться для введения йода-123. «Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy» (Chatal, CRC Press 1989) описывает подробно и другие способы.

В определенных вариантах воплощения изобретения иммуноконъюгат может состоять из антитела, конъюгированного с ферментом, активирующим пролекарство и преобразующим такое пролекарство (например, химиотерапевтический препарат пептидил, см. WO 81/01145) в активный препарат, например, противораковый препарат. Такие иммуноконъюгаты используются в антитело-зависимой терапии пролекарством, опосредуемой ферментом («ADEPT»). Ферменты, которые могут быть конъюгированы с антителом, включают, но не ограничиваются, следующие: щелочная фосфатаза для конвертации фосфат-содержащих пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; арилсульфатаза для конвертации сульфатсодержащих пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; цитозиндезаминаза для конвертации нетоксичного 5-фторцитозина в противораковый препарат, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза серратии, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), для конвертации пептид-содержащих пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; D-аланилкарбоксипептидазы для конвертации пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, для конвертации гликозилированных пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; β -лактамаза для конвертации препаратов, содержащих α -лактамы, в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; и пенициллинамидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, для конвертации препаратов, содержащих феноксиацетильные или фенилацетильные группы, присоединенные к аминному азоту, соответственно, в лекарственные вещества, не связанные с белками крови. Ферменты могут ковалентным образом присоединяться к антителам в ходе процедур рекомбинации ДНК, известных науке. См., например, Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984).

г. Введение препарата в носитель

Введение препарата в носитель осуществляется в соответствии с r , среднего числа молекул препарата на антитело в молекуле по Формуле I. Введение препарата может варьировать от 1 до 20 молекул препарата (D) на антитело. КАП по Формуле I включает коллекции антител, конъюгированных с целым диапазоном молекул препарата, от 1 до 20. Среднее число молекул препарата на антитело в композициях КАП после реакций конъюгации может быть охарактеризовано путем стандартных способов, таких как масс-спектроскопия, ИФА и ВЭЖХ. Количественное распределение КАП в пересчете на r также может быть определено. В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенного КАП, в котором r является определенным значением, от КАП с другим количеством введенного препарата, может быть осуществлено посредством ВЭЖХ с обращенными фазами или электрофорезом. Таким образом, фармацевтические композиции конъюгатов антитело-препарат по Формуле I могут быть представлены гетерогенной смесью таких конъюгатов, в которых антитела присоединены к 1, 2, 3, 4 или более молекулам препарата.

Для некоторых конъюгатов антитело-препарат значение p может быть ограничено числом участков присоединения на антителе. Например, в случае присоединения тиоловой группы цистеина, как в типичных вариантах воплощения изобретения, представленных выше, антитело может иметь только одну или несколько тиоловых групп цистеина, или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиоловых групп, к которым может быть присоединен линкер. В определенных вариантах воплощения изобретения более высокое количество введенного препарата, например, $p > 5$, может привести к агрегации, отсутствию растворимости, токсичности или потере способности проникать в клетки для определенных конъюгатов антитело-препарат. В определенных вариантах воплощения изобретения количество введенного препарата в КАП по изобретению варьирует от 1 до примерно 8; от примерно 2 до примерно 6; или от примерно 3 до примерно 5. Было показано, что для определенных КАП оптимальное соотношение молекул препарата на антитело может составлять менее 8, и может составлять от примерно 2 до примерно 5. См. US 2005-0238649 A1.

В определенных вариантах воплощения изобретения во время реакции конъюгации с антителом конъюгировано менее теоретического максимального количества молекул препарата. Антитело может включать, например, остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным веществом препарат-линкер или линкерным реагентом, как это обсуждается ниже. Как правило, антитело не содержит большое количество несвязанных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут быть связаны с молекулой препарата; наоборот, большинство тиоловых групп остатков цистеина в антителах существует в виде дисульфидных связей. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело может быть восстановлено с использованием восстановительного агента, такого как дитиотреитол (ДТТ) или трикарбонилэтилфосфина (ТСЕР), в условиях частичного или полного восстановления с получением реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В определенных вариантах воплощения антитело подвергается денатурации в определенных условиях для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, например, лизина или цистеина.

Нагрузка КАП (соотношение препарат/антитело) может контролироваться различными путями, например, следующими: (i) ограничение избытка молярности промежуточного вещества препарат-линкер или линкерного реагента относительно антитела; (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации; и (iii) частичные или ограничивающие восстановительные условия для модификации тиоловой группы цистеина.

Следует понимать, что в случае реакции более одной нуклеофильной группы с промежуточным веществом препарат-линкер или линкерным реагентом, а затем с препаратом, конечный продукт представляет собой смесь из соединений КАП, при этом к антителу присоединена одна или более молекул препарата. Среднее количество молекул препарата на антитело может быть рассчитано из смеси путем двойного анализа ИФА антитела, специфичного относительно антитела и специфичного относительно препарата. Отдельные молекулы КАП могут быть выявлены в смеси путем масс-спектропии и разделены ВЭЖХ, например, в ходе хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (см., например, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research,

2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). В определенных вариантах воплощения изобретения однородные КАП с одинаковым значением введенного препарата могут быть выделены из конъюгационной смеси путем электрофореза или хроматографии.

д. Определенные способы получения иммуноконъюгатов

КАП по Формуле I может быть получен несколькими способами, включающими реакции органической химии, условия и реагенты, известные специалисту в данной области и включающие следующее: (1) реакция нуклеофильной группы антитела с двухвалентным линкерным реагентом с образованием АТ-L посредством ковалентной связи с последующей реакцией с молекулой препарата D; (2) реакция нуклеофильной группы молекулы препарата с двухвалентным линкерным реагентом с образованием D-L посредством ковалентной связи с последующей реакцией с нуклеофильной группой антитела. Типичные способы получения КАП по Формуле I по второму способу описаны в US 2005-0238649 A1 (включено в настоящий документ посредством ссылки).

Нуклеофильные группы антител включают, но не ограничиваются, следующие: (i) N-концевые аминные группы; (ii) аминные группы боковой цепи, например, лизина; (iii) тиоловые группы боковой цепи, например, цистеина; и (iv) гидроксильные или аминогруппы сахаров, если антитело гликозилировано. Амино-, тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных молекул и линкерных реагентов, и включают следующие: (i) активные эфиры, такие как эфиры NHS, эфиры HOBT, галогенформилаты и галиды кислот; (ii) алкил- и бензилгалиды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Определенные антитела имеют восстанавливаемые дисульфидные мостики между цепями, например, между остатками цистеина. Антитела могут стать способными вступать в реакцию конъюгации с линкерными реагентами путем воздействия восстановителем, таким как DTT (дифиотреитол) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в результате чего антитело частично или полностью восстанавливается. Таким образом, теоретически, каждый цистеиновый мостик будет образован между двумя реакционноспособными тиоловыми нуклеофильными группами. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитело посредством модификации остатков лизина, например, в ходе реакции остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота), что приводит к преобразованию амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут быть введены в антитело посредством введения одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, путем получения вариантов антител, включающих не нативные остатки аминокислоты цистеина).

Конъюгаты антитело-препарат по изобретению также могут быть получены в ходе реакции между электрофильной группой антитела, например, альдегидной или кетонной карбонильной группой, с нуклеофильной группой линкерного реагента или препарата. Подходящие нуклеофильные группы на линкерном реагенте включают, но не ограничиваются, гидразид, оксим, аминогруппу, гидразин, тиосемикарбазон, гидразина карбоксилат и арилгидразид. В одном варианте воплощения изобретения антитело модифицировано введением электрофильных молекул, способных реагировать с нуклеофильными заместителями линкерного реагента или препарата. В другом варианте воплощения изобретения сахара гликозилированных антител могут быть окислены,

например, окислителями периодатами, с образованием альдегидных или кетонных групп, которые могут реагировать с аминной группой линкерных реагентов или молекул препаратов. Получаемые в результате иминные группы оснований шиффа могут образовывать устойчивую связь или могут быть окислены, например, реагентами борогидрида с образованием устойчивых аминных связей. В одном варианте воплощения изобретения реакция углеводного участка гликозилированного антитела с галактозидазой или натрия мета-периодатом может привести к образованию карбонильной (альдегидной или кетонной) группы антитела, реагирующей с соответствующими группами препарата (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). В другом варианте воплощения изобретения антитела, включающие N-концевые остатки серина или треонина, могут реагировать с натрия мета-периодатом с образованием альдегида в месте первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Такой альдегид может реагировать с молекулой препарата или нуклеофильной группой линкера.

Нуклеофильные группы на молекуле препарата включают, но не ограничиваются, следующие: amino-, тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных молекул и линкерных реагентов, и включая следующие: (i) активные эфиры, такие как эфиры NHS, эфиры HOBT, галогенформиаты и галиды кислот; (ii) алкил- и бензилгалиды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы.

Соединения по изобретению четким образом охватывают, но не ограничиваются, КАП, полученные с помощью следующих реагентов, способствующих образованию перекрестной связи: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон) бензоат), которые представлены на рынке (например, компанией Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; см. страницы 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Иммуноконъюгаты антитела и цитотоксического агента также могут быть получены с использованием целого ряда бифункциональных белоксвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис (p-азидобензойл) гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(p-дiazониябензойл)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен в соответствии с описанием, представленным в Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатным агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO94/11026.

С другой стороны, также может быть получен белок слияния, содержащий антитело и цитотоксический препарат, например, путем способов рекомбинации или белкового синтеза. Рекомбинантная молекула ДНК может включать участки, кодирующие антитело и цитотоксические участки конъюгата, присоединенные друг к другу или разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не уменьшает

необходимых свойств конъюгата.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (например, стрептавидином) для использования в предварительном нацеливании на опухоль, при этом конъюгат антитело-рецептор вводится пациенту с последующим удалением несвязанного конъюгата из кровеносной системы путем использования препарата для облегчения выведения, вслед за чем пациенту вводится «лиганд» (например, авидин), который конъюгирован с терапевтическим агентом (например, радионуклидом).

Типичные иммуноконъюгаты - конъюгаты антитело-препарат

а. Получение антител к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином

ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность варианта антител к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином и исходные антитела к FcRH5 по изобретению, получают с использованием различных способов, которые включают, но не ограничиваются, следующие: выделение из естественного источника (в случае вариантов аминокислотной последовательности, встречающихся в природе), сайт-специфический (или опосредованный олигонуклеотидами) мутагенез ((Carter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)), ПЦР-мутагенез ((Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; and Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)), и каскадный мутагенез ((Wells et al (1985) Gene 34:315-323)) ранней предварительно полученной ДНК, кодирующей полипептид. Протоколы мутагенеза, наборы и реагенты представлены на рынке, например, набор для мультисайт-специфического мутагенеза QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Отдельные мутации также получают путем сайт-специфического мутагенеза с использованием олигонуклеотидов и двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы на основе ПЦР-мутагенеза (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500). Варианты рекомбинантных антител могут также быть получены путем манипуляции с фрагментом рестрикции или путем расширения и перекрытия участка для ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов. Мутагенные праймеры кодируют замену кодона цистеина. Для получения ДНК, кодирующей такие мутантные антитела с введенным цистеином, могут использоваться стандартные способы мутагенеза (Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; and Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Для выработки человеческих антител к FcRH5 и фрагментов антител *in vitro* от переменного домена (V) иммуноглобулина генного репертуара от иммунизированных доноров, может использоваться способ фаговых дисплеев (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 [1990]). Согласно этому способу гены V домена антитела клонируют внутри рамки считывания большего или меньшего гена оболочечного белка нитевидного бактериофага, такого как M13 fd, и отображаются в виде фрагментов функционального антитела на поверхности фаговых частиц. Принимая во внимание, что нитчатые частицы содержат копию одноцепочечной ДНК генома фага, выбор, основанный на функциональных свойствах антитела, также приводит к отбору гена, кодирующего антитело, обладающее такими свойствами. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клетки (Johnson et al (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571;

Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al (1993) EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Антитела к FcRH5 могут быть синтезированы химически с помощью известных способов синтезов олигопептидов или могут быть получены и очищены с использованием способа рекомбинации. Соответствующая аминокислотная последовательность или ее участок могут быть получены путем непосредственного синтеза белка с использованием твердофазных способов (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* может осуществляться с использованием автоматизированных способов или вручную. Автоматизированный твердофазный синтез может сопровождаться, например, введением t-BOC или Fmoc защитных аминокислот и использованием синтезатора пептидов Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) с соблюдением инструкций производителя. Различные участки антитела к FcRH5 или полипептида FcRH5 могут быть синтезированы химически по-отдельности или в комбинации с использованием химических или ферментативных способов получения необходимого антитела к FcRH5 или полипептида FcRH5.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; and Brennan et al (1985) Science, 229:81) или непосредственным получением в рекомбинантных клетках-хозяевах. Фрагменты антител к FcRH5 Fab, Fv и ScFv также могут экспрессироваться и секретироваться в *E. coli*, что позволяет легко получить большие количества таких фрагментов. Фрагменты антитела могут быть выделены из библиотек фаговых дисплеев антител, как это описано в тексте данной заявки. С другой стороны, фрагменты Fab'-SH могут быть восстановлены непосредственным образом из *E. coli* и соединены в ходе химической реакции с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)), или выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Антитело к FcRH5 может быть представлено одноцепочечным фрагментом Fv (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). Фрагмент антитела к FcRH5 может быть также представлен «линейным антителом» (US 5641870). Такие фрагменты линейного антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Представленное ниже описание относится преимущественным образом к получению антител к FcRH5 путем культивации клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к FcRH5. ДНК, кодирующая антитела к FcRH5, может быть получена из библиотеки кДНК, полученной из ткани, которая, как считается, содержит мРНК антитела к FcRH5 и экспрессирует такие антитела в определяемой концентрации. В соответствии с этим, ДНК человеческих антител к FcRH5 или полипептида FcRH5 может быть удобным образом получена из библиотеки кДНК, полученной из ткани человека. Ген, кодирующий антитело к FcRH5, может быть также получен из геномной библиотеки или с использованием известных процедур синтеза (например, автоматического синтеза нуклеиновой кислоты).

Схема, выбор и способы получения по изобретению позволяют получить антитела к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином, которые вступают в реакцию с электрофильной функциональностью. Такие способы в дальнейшем обеспечивают образование соединений-конъюгатов антитела, таких как конъюгат антитело-препарат (КАП), соединений с молекулами препаратов в строго указанных, избирательных

местах. Реакционноспособные остатки цистеина на поверхности антитела обеспечивают специфическую конъюгацию молекулы препарата посредством реакционноспособной тиоловой группы, такой как малеимид или галогенацетил. Нуклеофильная реакционная способность функциональной тиоловой группы остатка Цис относительно группы малеимида примерно в 1000 раз выше в сравнении с функциональностью любой другой аминокислоты в белке, например, аминокислоты остатков лизина или аминокислоты на N-конце. Специфическая функциональность тиоловой группы в реагентах йодоацетила и малеимида может обуславливать реакцию с аминокислотами, однако для этого требуется более высокое значение pH (>9,0) и более длительное время реакции (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London). Количество несвязанного тиола в белке может быть оценено с использованием стандартного анализа Элмана. Иммуноглобулин М является примером присоединенного дисульфидной связью пентамера, в то время как иммуноглобулин G является примером белка с внутренними дисульфидными мостиками, связывающими друг с другом субъединицы. В подобных белках восстановление дисульфидной связи с помощью реагента, такого как дитиотреитол (DTT) или селенол (Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156), необходимо для получения реакционноспособного несвязанного тиола. Такой подход может привести к потере третичной структуры антитела и антигенсвязывающей специфичности.

Анализ PHESELECTOR (фаговый ИФА для селекции реакционноспособного тиола) позволяет определить реакционноспособные тиоловые группы в антителах в ходе фагового ИФА, что оказывает существенную помощь при получении антител с введенным в ходе рекомбинации цистеином (Junutula, J.R. et al. (2008) *J Immunol Methods* 332:41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). Антитело с введенным в ходе рекомбинации цистеином наносится на поверхность лунок с последующей инкубацией с фаговыми частицами, добавлением второго антитела, меченого HRP, и определением поглощения. Мутантные белки, отображаемые на фаге, могут быть подвергнуты скринингу быстрым, робастным и высокопродуктивным способом. Могут быть получены библиотеки антител с введенным в ходе рекомбинации цистеином, которые затем могут быть подвергнуты избирательному связыванию с использованием того же самого способа для выявления подходящих реакционных центров несвязанного введенного Цис из случайных образом выбранных белково-фаговых библиотек антител или других белков. Такой способ включает реакцию цистеина мутантных белков, отображаемых по фагу, с аффинным реагентом или группой репортера, которая представлена реакционноспособной тиоловой группой.

Анализ PHESELECTOR позволяет проводить скрининг реакционноспособных тиоловых групп в антителах. Типичной является идентификация варианта A121C данным способом. Вся молекула Fab может быть подвергнута эффективному поиску для выявления большего количества вариантов ТioFab с реакционноспособными тиоловыми группами. Для выявления и количественного определения доступа растворителя к аминокислотным остаткам в полипептиде был введен параметр частичного поверхностного доступа. Поверхностный доступ может быть выражен в виде площади поверхности ($\text{\AA}^2$), которая может контактировать с молекулой растворителя, например, водой. Занятое водой пространство аппроксимируется как $1,4 \text{ \AA}$ радиуса сферы. Программное обеспечение находится в свободном доступе или подлежит лицензированию (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Великобритания, Факс: (+44) 1925 603825, или по Интернету: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html), равно как и программы по кристаллографии CCP4 Suite, использующие

алгоритмы для расчета поверхностного доступа к каждой аминокислоте или белку с известными и полученными в ходе кристаллографической рентгенографии координатами ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763).

Два типичных модуля программного обеспечения, которые выполняют вычисления поверхностного доступа, представлены «AREAIMOL» и «SURFACE» и основаны на алгоритмах B.Lee и F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400. AREAIMOL определяет поверхностный доступ к белку для растворителя как locus центра сферического зонда (представляющего молекулу растворителя), т.е. он перекачивается вдоль ван-дер-ваальсовых поверхностей белка. AREAIMOL рассчитывает поверхностную доступную площадь для растворителя путем генерации поверхностных точек на расширенной сфере примерно на один атом (на расстоянии от центра атома, равного сумме радиусов атомов и датчика) с элиминацией тех атомов, которые находятся в эквивалентном сфере положении и связаны с соседними атомами. С помощью программы AREAIMOL можно вычислить доступную для растворителя площадь атомов в файле с координатами PDB, суммировать доступную площадь по остаткам, по цепи и для всей молекулы. Значения допустимых площадей (или разницы площадей) для отдельных атомов могут быть записаны в исходящий псевдо-файл PDB. Программа AREAIMOL предполагает значение отдельного радиуса для каждого элемента и распознает только ограниченное количество различных элементов.

Программы AREAIMOL и SURFACE сообщают абсолютные значения доступной поверхности, т.е. значения, выраженные в ангстремах (Å) в квадрате. Частичный поверхностный доступ рассчитывается относительно стандартного состояния, релевантного для аминокислоты в полипептиде. Стандартное состояние представлено трипептидом Гли-Х-Гли, где Х - интересующая аминокислота, и такое стандартное состояние должно иметь «расширенную конформацию», т.е. конформацию по типу бета-цепей. Расширенная конформация максимизирует доступ к Х. Рассчитанная доступная площадь делится на доступную площадь в эталонном состоянии трипептида Гли-Х-Гли, в результате чего выдается частное, представляющее собой частичный доступ. Процентный показатель доступа представлен частичным доступом, умноженным на 100. Другой типичный алгоритм для расчета поверхностного доступа основан на модуле SOLV программы xsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), который рассчитывает частичный доступ к аминокислотному остатку в водной сфере, основываясь на рентгеновских координатах полипептида. Частичный поверхностный доступ к каждой аминокислоте в антителе может быть рассчитан с использованием доступной информации о структуре кристалла (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995).

ДНК, кодирующая антитела с введенным в ходе рекомбинации цистеином, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Клетки гибридомы служат в качестве источника такой ДНК. После изоляции ДНК может быть включена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. Coli*, клетки линии COS обезьяны, клетки яичников китайского хомячка (CHO) или другие клетки млекопитающих, такие как клетки миеломы (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), которые в противном случае не вырабатывают белок иммуноглобулина, для организации синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

После разработки структуры и выбора, антитела с введенным в ходе рекомбинации

цистеином, например, ТiоFab, с введенными в ходе рекомбинации и чрезвычайно высоко реакционноспособными несвязанными остатками Цис («несвязанные аминокислоты цистеин») могут быть получены путем: (i) экспрессии в бактериальной системе, например, системе *E. coli* (Skerra et al (1993) *Curr. Opin. in Immunol.* 5:256-262; Pluckthun (1992)

5 *Immunol. Revs.* 130:151-188) или системе культуры клеток млекопитающих (WO 01/00245), например, клетках яичника китайского хомячка (CHO); и (ii) очистки с использованием стандартных способов очистки белка (Lowman et al (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988).

Введенные в ходе рекомбинации тиоловые группы Цис реагируют с электрофильными
10 линкерными реагентами и промежуточными соединениями препарат-линкер с образованием конъюгатов препарата и антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином или других меченых рекомбинантных антител с добавленным цистеином. Остатки Цис, присутствующие в рекомбинантных антителах с добавленным цистеином, в исходных антителах, соединенных с образованием внутрицепочечных и межцепочечных
15 дисульфидных мостиков, не имеют каких-либо реакционноспособных тиоловых групп (если они не были подвергнуты действию восстановителя) и не реагируют с электрофильными линкерными реагентами или промежуточными соединениями препарат-линкер. Остаток Цис, введенный в ходе рекомбинации, может оставаться неспаренным и способным реагировать, т.е. конъюгировать, с электрофильным
20 линкерным реагентом или промежуточными соединениями препарат-линкер, таким как препарат-малеимид. Типичные промежуточные соединения препарат-линкер включают следующие: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE и MC-vc-PAB-MMAF. Структурное положение введенных остатков Цис тяжелой и легкой цепей нумеруется в соответствии с последовательной системой нумерации. Такая система

25 последовательной нумерации коррелирует с системой нумерации по Kabat (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), начинаясь с N-конца, но отличается от схемы нумерации по Kabat (нижний ряд) по вставкам, обозначаемым как a, b, c. С использованием системы нумерации по Kabat фактическая линейная последовательность аминокислот может
30 содержать меньше или больше аминокислот, что соответствует укорочению или вставке в КУ или CDR варибельного домена. Вариантные сайты тяжелой цепи с добавленным цистеином идентифицируют по последовательной нумерации и схеме нумерации Kabat.

В одном варианте воплощения изобретения антитело к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином получают в ходе процесса, состоящего из следующих этапов:

35 (а) замещение одного или нескольких аминокислотных остатков исходного антитела к FcRH5 цистеином; и

(б) определение реакционноспособности тиола цистеина, введенного в антитело к FcRH5 в ходе рекомбинации, путем реакции антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с тиоловым реагентом.

40 Антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином могут быть более реакционноспособными, чем исходное антитело, при реакции с тиоловым реагентом.

Несвязанные остатки аминокислоты цистеин могут располагаться в легких или тяжелых цепях, или в константных или варибельных доменах. Фрагменты антитела, например, Fab, также могут быть подвергнуты рекомбинации путем замены одной или
45 нескольких аминокислот цистеин с образованием фрагментов антитела с добавленным цистеином.

Другой вариант воплощения изобретения описывает способ получения антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином, состоящий из следующих этапов:

(а) введение одной или нескольких аминокислот цистеин в исходное антитело к FcRH5 для получения антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

(б) определение реакционной способности тиоловой группы антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с использованием тиолового реагента;

5 при этом антитело с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может быть более реакционноспособным, чем исходное антитело при реакции с тиоловым реагентом.

Этап (а) способа получения антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может включать следующее:

10 (i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело с добавленным в ходе рекомбинации цистеином;

(ii) экспрессия антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

(iii) выделение и очистка антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином.

Этап (б) способа получения антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может включать экспрессию антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином 15 вирусной частицей, выбранной из ряда фагов или фагмид.

Этап (б) способа получения антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином также может включать следующее:

20 (i) реакция антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с аффинным тиоловым реагентом с получением аффинного меченого антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

(ii) измерение аффинности связывания меченого антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином относительно специфического носителя.

Другой вариант воплощения изобретения представлен способом скрининга антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с высокореакционноспособными 25 неспаренными аминокислотами цистеин на предмет реакционной способности тиоловых групп, и такой способ состоит из следующего:

(а) введение одной или нескольких аминокислот цистеин в исходное антитело для получения антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

30 (б) реакция антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с аффинным тиоловым реагентом с получением аффинного меченого антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

(в) измерение аффинности связывания меченого антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином относительно специфического носителя;

35 (г) определение реакционной способности тиоловой группы антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с использованием тиолового реагента.

Этап (а) способа скрининга антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может включать следующее:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело с добавленным в ходе рекомбинации цистеином;

40 (ii) экспрессия антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином; и

(iii) выделение и очистка антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином.

Этап (б) способа скрининга антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может включать экспрессию антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином вирусной частицей, выбранной из ряда фагов или фагмид.

45 Этап (б) способа скрининга антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином может также включать следующее:

(i) реакция антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с аффинным тиоловым реагентом с получением аффинного меченого антитела с добавленным в

ходе рекомбинации цистеином; и

(ii) измерение аффинности связывания меченого антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином относительно специфического носителя.

6. Варианты антитела класса IgG к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином

Цистеин был добавлен в положение 118 тяжелой цепи (нумерация EU) (эквивалентно положению 118 тяжелой цепи, последовательная нумерация) химерных исходных моноклональных антител к FcRH5 полной длины или в положение 205 легкой цепи (нумерация по Kabat) (эквивалентно положению 209 легкой цепи, последовательная нумерация) химерных исходных моноклональных антител к FcRH5 полной длины посредством описанных здесь способов введения цистеина.

Антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином в положении 118 тяжелой цепи (нумерация EU) характеризовались следующим: (a) thio-hu10A8 v1-HC(A118C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 42) и последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 41), Фигура 12.

Антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином в положении 205 легкой цепи (нумерация по Kabat) характеризовались следующим: (a) thio-hu10A8 v1-LC9(V205C) с последовательностью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 44) и последовательностью легкой цепи (SEQ ID NO: 43), Фигура 13.

Такие моноклональные антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином экспрессировались в клетках CHO (яичников китайского хомячка) путем временной ферментации в среде, содержащей 1 mM цистеина.

в. Меченые антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином

Антитела по изобретению к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином могут быть сайт-специфическими и могут быть эффективно соединены с тиол-реактивным (тиоловым) реагентом. Тиоловый реагент может быть представлен многофункциональным линкерным реагентом, лизисным, т.е. аффинным, реагентом, реагентом для мечения (например, реагентом биотин-линкер), определяемой меткой (например, реагентом-флуорофором), твердофазным реагентом для иммобилизации (например, СЕФАРОЗА™, полистиролом или стеклом) или промежуточным веществом препарат-линкер. Одним из примеров тиолового реагента является N-этил малеимид (NEM). В типичном варианте воплощения изобретения реакция ТиоFab с биотин-линкерным реагентом приводит к образованию биотинилированного ТиоFab, по присутствию и реакционной способности которого может быть измерен и определен остаток введенного в ходе рекомбинации цистеина. Реакция ТиоFab с многофункциональным линкерным реагентом предоставляет ТиоFab функциональный линкер, который в дальнейшем может реагировать с молекулой препарата или другой меткой. Реакция ТиоFab с промежуточным веществом препарат-линкер приводит к образованию конъюгата препарата и ТиоFab.

Описанные здесь типичные способы могут применяться в целом для идентификации и получения антител, и, еще более в целом, для других белков посредством применения описанной здесь схемы и этапов.

Такой подход может применяться относительно конъюгации других тиоловых реакционноспособных соединений, в которых реакционная группа представлена, например, малеимидом, йодацетамидом, пиридил дисульфидом или другим тиоловым активным партнером для конъюгации (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press,

London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). Активный тиоловый реагент может быть представлен молекулой препарата, флуорофором, таким как флуоресцирующий краситель (например, флуоресцеин или родамин), хелатным агентом для визуализации или радиотерапевтическим металлом, пептидиловым или другим тэгом или препаратом, модифицирующим клиренс, таким как различные изомеры полиэтиленгликоля, пептидом, который связывается с третьим компонентом, или другим углеводом или липофильным веществом.

г. Применение антител к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином

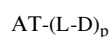
Антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином и их конъюгаты могут использоваться в качестве терапевтических и/или диагностических агентов. Данное изобретение дополнительно описывает способы предотвращения, ведения, лечения или улучшения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с В-клеточным нарушением. В частности, данное изобретение описывает способы предотвращения, ведения, лечения или улучшения одного или нескольких симптомов, связанных со следующими нарушениями пролиферации клеток: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны. Кроме того, данное изобретение также описывает способы диагностики расстройства, обусловленного FcRH5, или предрасположенности к возникновению такого расстройства, а также способы идентификации антител и антигенсвязывающих фрагментов антител, которые преимущественным образом связываются с полипептидами FcRH5 В-клеток.

Другой вариант воплощения изобретения направлен на использование антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином для получения препарата, подходящего для лечения состояния, ответственного за В-клеточное расстройство.

д. Рекомбинантные конъюгаты антитело-препарат к (конъюгаты тию-антитело-препарат)

Другой аспект изобретения представлен конъюгатом антитело-препарат, состоящим из антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином (АТ) и молекулы препарата ауристатин (D), при этом антитело с добавленным в ходе рекомбинации цистеином присоединено через одну или несколько несвязанных аминокислот цистеин посредством линкерной молекулы (L) к D; соединение представлено следующей

Формулой I:



I

где p составляет 1, 2, 3 или 4; при этом антитело с добавленным в ходе рекомбинации цистеином получают в ходе процесса, включающего замену одного или нескольких остатков аминокислот исходного антитела к FcRH5 одним или несколькими несвязанными остатками аминокислоты цистеин.

Другой аспект изобретения представляет композицию, состоящую из смеси соединений антител-препаратов по Формуле I, при этом средний показатель нагрузки препарата на антитело составляет от примерно 2 до примерно 5 или от примерно 3 до примерно 4.

Потенциальные преимущества конъюгатов препарата и антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином включают повышенную безопасность (большее значение терапевтического индекса), улучшенные ФК параметры, сохранение

межцепочечных дисульфидных мостиков в антителе, что позволит стабилизировать конъюгат и сохранить его конформацию для активного связывания, установленные сайты для конъюгации с препаратом, а также получение конъюгатов препарата и антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином в результате конъюгации антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с реагентами препарат-линкер, что приводит к образованию более однородного продукта.

Линкеры

«Линкер», «линкерная единица» или «линкерное соединение» обозначает химическую молекулу, состоящую из ковалентной связи или цепи атомов, которые ковалентным образом присоединяют антитело к молекуле препарата. В различных вариантах воплощения изобретения линкер обозначается L. «Линкер» (L) является бифункциональной или многофункциональной молекулой, которая может использоваться для соединения одной или нескольких молекул препарата (D) с единицей антитела (AT) с образованием конъюгатов антитело-препарат (КАП) по Формуле I. Конъюгаты антитело-препарат (КАП) могут быть получены с использованием линкера, обладающего функциональной реакционной способностью относительно связывания препарата с антителом. Тиоловая группа цистеина в антителе с добавленным в ходе рекомбинации цистеином (AT) может образовывать связь с электрофильной функциональной группой линкерного реагента, молекулой препарата или промежуточным веществом препарат-линкер.

В одном аспекте изобретения линкер состоит из реакционного центра, который содержит электрофильную группу, являющуюся реакционноспособной относительно нуклеофильного цистеина, присутствующего в антителе. Тиоловая группа цистеина антитела реагирует с электрофильной группой линкера и образует ковалентную связь с линкером. Такие электрофильные группы включают, но не ограничиваются, группы малеимида и галогенацетамида.

Линкеры включают двухвалентный радикал, например, алкилдиил, арилен, гетероарииден, такие молекулы, как $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, повторяющиеся единицы алкилокси (например, полиэтиленокси, ПЭГ, полиметиленокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, Jeffamine™); а также двухкислотные эфиры и амиды, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолат, малонат и капроамид.

Антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином реагируют с линкерными реагентами или промежуточными веществами препарат-линкер, с электрофильными функциональными группами, такими как малеимид или α -галогенкарбонил согласно способу конъюгации, представленном на странице 766 Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

Линкер может состоять из одного или нескольких линкерных компонентов. Типичные линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил («МС»), малеимидопропаноил («МР»), валин-цитруллин («вал-цит» или «vc»), аланин-фенилаланин («ала-фен» или «af»), p-аминобензилоксикарбонил («РАВ»), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио) пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1 карбоксилат («SMCC»), N-сукцинимидил (4-йодо-ацетил) аминобензоат («SIAB»), этиленокси $-CH_2CH_2O-$ в качестве одной или нескольких повторяющихся единиц («ЕО» или «РЕО»). Дополнительные линкерные компоненты также известны науке, и некоторые из них описаны в данной заявке.

В одном варианте воплощения изобретения линкер L в КАП имеет следующую формулу:



где:

-А- является расширяющей единицей (расширителем), которая ковалентным образом присоединяется к тиоловой группе цистеина антитела (АТ);

а составляет 0 или 1;

каждый -W- представлен независимым образом аминокислотной единицей;

w представлен независимым образом целым числом и варьирует от 0 до 12;

-Y- является спейсерной единицей, которая ковалентным образом присоединяется к молекуле препарата; и

y составляет 0, 1 или 2.

Расширитель

Расширитель (-А-), в случае его присутствия, способен связывать единицу антитела с единицей аминокислоты (-W-). В этом отношении антитело (АТ) содержит функциональную группу, которая может образовывать связь с функциональной группой расширителя. Такие группы, которые могут присутствовать в антителе (естественным образом или введенные путем химических манипуляций) включают, но не

ограничиваются, сульфгидрил (-SH), amino-, гидроксильную, карбоксильную или аномерную гидроксильную группы углерода, а также карбоксил. В одном аспекте

функциональные группы антитела представлены сульфгидрилом или аминогруппой.

Сульфгидрильные группы могут быть получены путем восстановления

внутримолекулярной дисульфидной связи антитела. С другой стороны, сульфгидрильные группы могут быть образованы в ходе реакции аминогруппы лизина антитела с 2-

иминотиолоном (реагентом Трота) или другим реагентом, приводящим к образованию

сульфгидрила. В одном варианте воплощения изобретения антитело (АТ) содержит несвязанную тиоловую группу цистеина, которая может образовывать связь с

функциональной группой расширителя. Типичные расширители для конъюгатов по Формуле I обозначены Формулами II и III, где Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y соответствуют

представленным выше обозначениям, R¹⁷ является двухвалентным радикалом,

выбираемым из следующей группы: (CH₂)_г, C₃-C₈ карбоциклил, O-(CH₂)_г, арилен, (CH₂)_г

-арилен, -арилен-(CH₂)_г, (CH₂)_г-(C₃-C₈ карбоциклил), (C₃-C₈ карбоциклил)-(CH₂)_г, C₃

-C₈ гетероциклил, (CH₂)_г-(C₃-C₈ гетероциклил), -(C₃-C₈ гетероциклил)-(CH₂)_г, -(CH₂)_гC

(O)NR^b(CH₂)_г, -(CH₂CH₂O)_г, -(CH₂CH₂O)_г-CH₂-, -(CH₂)_гC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_г, -(CH₂)_гC

(O)NR^b(CH₂CH₂O)_г-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_гC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_г, -(CH₂CH₂O)_гC(O)NR^b(CH₂

CH₂O)_г-CH₂- и -(CH₂CH₂O)_гC(O)NR^b(CH₂)_г; R^b представлен H, C₁-C₆ алкилом, фенилом

или бензилом; и г представлено целым числом, варьирующим от 1 до 10.

Арилены включают двухвалентные радикалы ароматического углеводорода из 6-

20 атомов углерода, полученных путем удаления атомов водорода из системы

ароматического кольца. Типичные группы ариленов включают, но не ограничиваются, радикалы, полученные из бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и т.п.

Гетероциклические группы включают систему кольца, в которой один или несколько атомов в кольце представлен гетероатомом, например, атомом азота, кислорода или

серы. Гетероциклические радикалы состоят из 1 до 20 атомов углерода и 1 до 3

гетероатомов, выбираемых из N, O, P и S. Гетероцикл может быть представлен

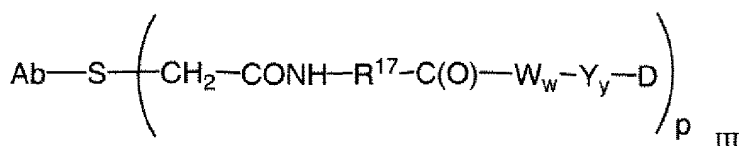
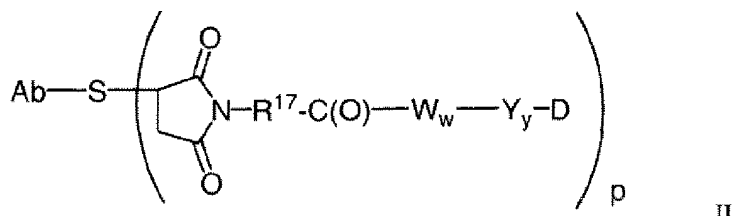
моноциклом, состоящим из 3-7-членного кольца (2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатомов,

выбираемых из N, O, P и S), или двойным кольцом, состоящим из 7-10-членного кольца (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбираемых из N, O, P и S), например: система из двойного кольца [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6]. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 - наше время), в частности, в Томах 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

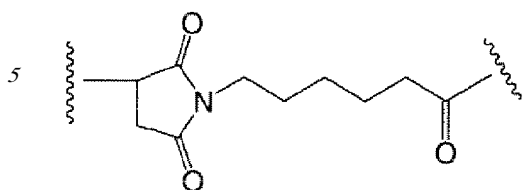
Примеры гетероциклов включают, не ограничиваясь, следующие: пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, тетрагидротиофенил, окисленный серой тетрагидротиофенил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиазолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафтеленил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазилил, 6Н-1,2,5-тиодиазилил, 2Н,6Н-1,5,2-дитиазилил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксатинил, 2Н-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиазинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3Н-индолил, 1Н-индазолил, пуринил, 4Н-хинолизинил, фталазинил, нафтиридилил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4Ан-карбазолил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиазолидинил, пиазолинил, пиперазинил, индолинил, изонидолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизооксазолил, оксииндолил, бензоксазолинил и изатиноил.

Карбоциклические группы включают насыщенное или ненасыщенное кольцо из 3-7 атомов углерода в виде моноцикла или 7-12 атомов углерода в виде двойного цикла. Моноциклические карбоциклы имеют 3-6-членное кольцо, но чаще всего 5-6-членное кольцо. Двущиклические карбоциклы имеют 7-12-членное кольцо, т.е. составляют систему из двойных колец [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6], или 9-10-членное кольцо в виде системы из двойных колец [5,6] или [6,6]. Примеры моноциклических карбоциклов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогептил и циклооктил.

Из всех типичных вариантов воплощения изобретения КАП по Формуле I, такие соединения имеют Формулу II-VI, и следует понимать, что даже при отсутствии четкого указания, к антители присоединено от 1 до 4 молекул препарата (p=1-4), в зависимости от числа добавленных остатков цистеина.

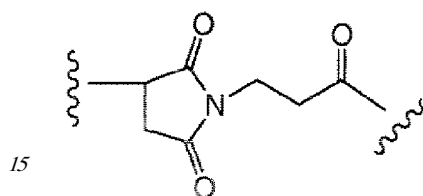


Иллюстративный расширитель по Формуле II получен из малеимидо-капроила (МС), где R^{17} представлен $-(CH_2)_5-$:



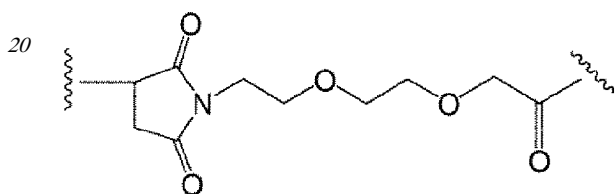
МС

Иллюстративный расширитель по Формуле II получен из малеимидо-пропаноила (МР), где R^{17} представлен $-(CH_2)_2-$:

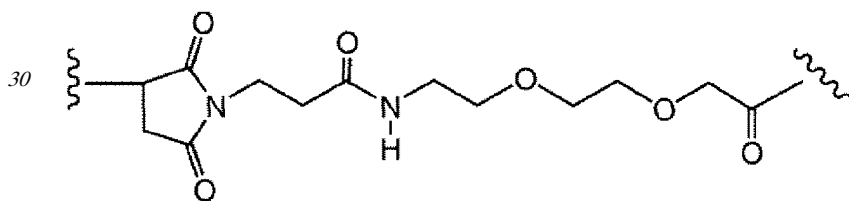


МР

Другой иллюстративный расширитель имеет структуру по Формуле II, где R^{17} представлен $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ и r представлен 2:

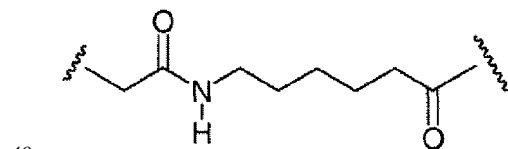


Другой иллюстративный расширитель имеет структуру по Формуле II, где R^{17} представлен $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, при этом R^b представлен Н и каждый r представлен 2:

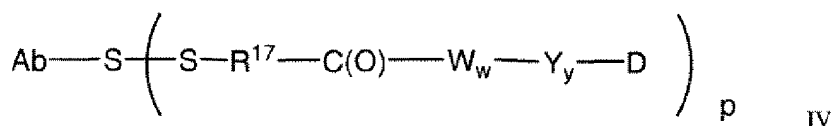


МРЕГ

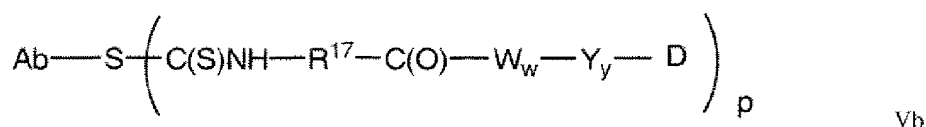
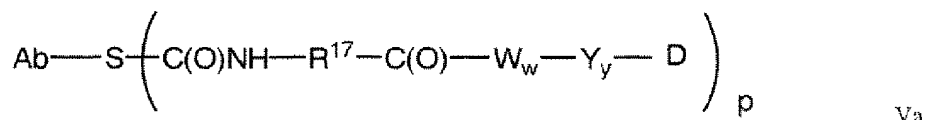
Иллюстративный расширитель имеет структуру по Формуле III, где R^{17} представлен $-(CH_2)_5-$:



В другом варианте воплощения изобретения расширитель присоединен к антителу к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином посредством дисульфидной связи между атомом серы введенного цистеина и атомом серы единицы расширителя. Репрезентативная единица расширителя по данному варианту воплощения изобретения имеет структуру по Формуле IV, где R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют указанные выше значения.



В еще одном варианте воплощения изобретения реакционная группа расширителя состоит из тиоловой реакционноспособной функциональной группы, которая может образовывать связь с несвязанной тиоловой группой цистеина в антителе. Примеры тиоловых реакционноспособных функциональных групп включают, но не ограничиваются, малеимид, α -галогенацетил, активированные эфиры, такие как эфиры сукцинимиды, 4-нитрофениловые эфиры, пentaфторфениловые эфиры, тетрафторфениловые эфиры, ангидриды, хлорангидриды, сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные единицы расширителя по данному варианту воплощения изобретения имеют структуру по Формулам Va и Vb, где R¹⁷, Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют указанные выше значения.

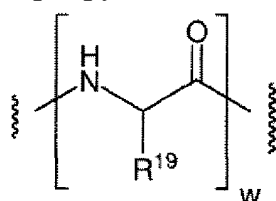


В другом варианте воплощения изобретения линкер может быть представлен линкером разветвленного типа для ковалентного присоединения более одной молекулы препараты посредством разветвленной, мультифункциональной линкерной молекулы с антителом (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43: 1987-1990). Разветвленные линкеры могут повышать молярное соотношение препарата к антителу, т.е. нагрузку, которая является одной из характеристик активности КАП. Таким образом, в то время как антитело с введенным в ходе рекомбинации цистеином может содержать только одну реакционноспособную тиоловую группу, посредством разветвленного линкера может быть присоединено множество молекул препарата.

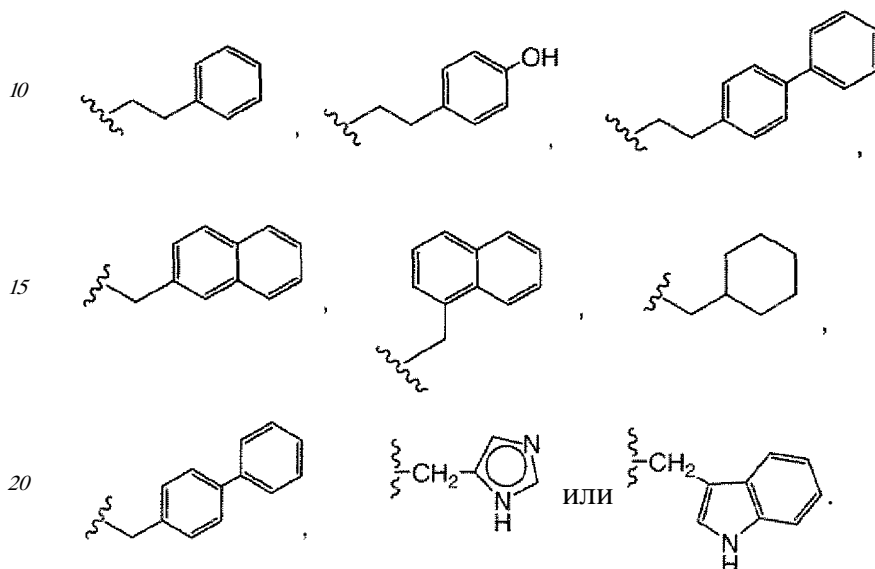
Аминокислотная единица

Линкер может состоять из остатков аминокислот. Аминокислотная единица (-W_w-), если присутствует, соединяет антитело (АТ) с молекулой препарата (D) конъюгата препарата и антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином (КАП).

-W_w- является дипептидной, трипептидной, тетрапептидной, пентапептидной, гексапептидной, гептапептидной, октапептидной, нонапептидной, декапептидной, ундекапептидной или додекапептидной единицей. Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотную единицу, включают встречающиеся в природе аминокислоты, а также редкие аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислотные аналоги, например, цитруллин. Каждая единица -W- независимым образом имеет формулу, указанную ниже в квадратных скобках, при этом w является целым числом, варьирующим от 0 до 12:



где R^{19} представлен водородом, метилом, изопропилом, изобутилом, вторичным
 бутилом, бензилом, p-гидроксibenзилом, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2$
 CONH_2 , $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 5 , $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$
 , $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-
 пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенилом, циклогексиллом,



При этом R^{19} не является водородом, а атом углерода, к которому присоединяется
 R^{19} , является хиральным. Каждый атом углерода, к которому присоединяется R^{19} ,
 25 присутствует независимым образом в конфигурации (S) или (R), или рацематной смеси.
 Таким образом, аминокислотные единицы могут не содержать энантиомеров, быть
 рацематными или диастереоизомерными.

Типичные аминокислотные единицы $-\text{W}_w-$ включают дипептид, трипептид,

30 тетрапептид или пентапептид. Типичные дипептиды представлены следующими: валин-
 цитруллин (vc или вал-цит), аланин-фенилаланин (af или ала-фен). Типичные трипептиды
 включают следующие: глицин-валин-цитруллин (гли-вал-цит) и глицин-глицин-глицин
 (гли-гли-гли). Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотный компонент
 линкера, включают встречающиеся в природе аминокислоты, а также редкие
 35 аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислотные аналоги, например,
 цитруллин.

Аминокислотная единица может подвергаться ферментативному расщеплению одним
 или несколькими ферментами, включая опухолеассоциированную протеазу, с
 освобождением молекулы препарата ($-\text{D}$), которая в одном варианте воплощения
 40 изобретения протонирована *in vivo* при высвобождении препарата (D). Аминокислотные
 линкерные компоненты могут быть получены и оптимизированы в своей
 избирательности на предмет ферментативного расщепления отдельным ферментом,
 например, опухолеассоциированной протеазой, катепсином В, С и D или плазмином.

Спейсерная единица

45 Спейсерная единица ($-\text{Y}_y-$), если присутствует ($y = 1$ или 2), соединяет аминокислотную
 единицу ($-\text{W}_w-$) с молекулой препарата (D), если присутствует аминокислотная единица
 ($w = 1-12$). В других случаях, спейсерная единица соединяет расширитель с молекулой
 препарата в отсутствие аминокислотной единицы. Спейсерная единица также соединяет

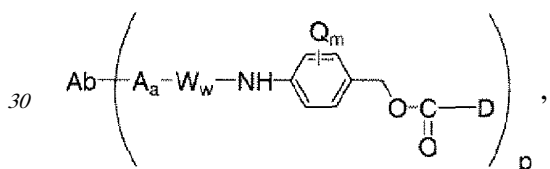
молекулу препарата с антителом в случае отсутствия аминокислотной единицы и расширителя ($w, y = 0$). Спейсерные единицы бывают двух разных видов: саможертвующими или несаможертвующими. Несаможертвующая спейсерная единица представлена единицей, которая частично или полностью остается связанной с молекулой препарата после расщепления, в частности, ферментативного, аминокислотной единицы конъюгата антитело-препарат или линкера препарата. Когда КАП-содержащая глицин-глициновая спейсерная единица или глициновая спейсерная единица подвергается ферментативному расщеплению опухолеассоциированной протеазой, протеазой раковых клеток или протеазой лимфоцитов, от АТ-А_a-Ww-отщепляется молекула глицин-глицин-препарата или глицин-препарат. В одном варианте воплощения изобретения в клетке-мишени происходит независимая реакция гидролиза, которая расщепляет связь молекулы глицин-препарат и высвобождает препарат.

В другом варианте воплощения изобретения -Y_y- представлен аминокислотой (PAB), в котором участок фенилена p-аминобензильной единицы замещен Q_m, при этом Q представлен -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, - нитро или -циано; и m представлен целым числом в пределах 0-4.

Типичные варианты воплощения изобретения несаможертвующей спейсерной единицы (-Y-) представлены следующими: -Гли-Гли-; -Гли-; -Ала-Фен-; -Вал-Цит-.

В одном варианте воплощения изобретения молекула препарата-линкера или КАП подобраны таким образом, что спейсерная единица отсутствует ($y=0$), или представлена фармацевтически приемлемой солью или его сольватом.

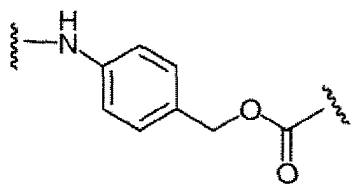
С другой стороны, содержащаяся в КАП саможертвующая спейсерная единица может высвобождать -D. В одном варианте воплощения изобретения -Y- представлен группой PAB, которая присоединяется к -W_w- посредством атома азота аминогруппы PAB, и непосредственно присоединяется к -D посредством группы карбоната, карбамата или другой группы, при этом КАП имеет следующую типичную структуру:



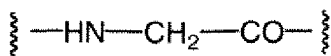
где Q представлен -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, -нитро или -циано; m является целым числом, варьирующим от 0 до 4; и p варьирует от 1 до 4.

Другие примеры саможертвующих спейсерных единиц включают, но не ограничиваются, ароматические соединения, которые по своей электронной структуре подобны p-аминобензиловому спирту (см, например, US 2005/0256030 A1), такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2237), гетероциклические аналоги PAB (US 2005/0256030), бета-глюкуронид (WO 2007/011968), а также орто- или пара-аминобензилацетали. Могут использоваться спейсеры, которые при гидролизе амидной связи образуют кольцо, среди них замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2: 223), надлежащим образом замещенные бициклические системы [2.2.1] и [2.2.2] (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94:5815), а также амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55:5867). Элиминация аминокислотных препаратов, замещенных в положении глицина (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27: 1447), также является примером саможертвующих спейсеров, используемых для КАП.

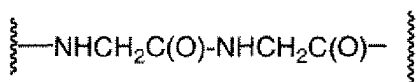
Типичные спейсерные единицы (-Y_y-) представлены Формулами X-XII:



X



XI

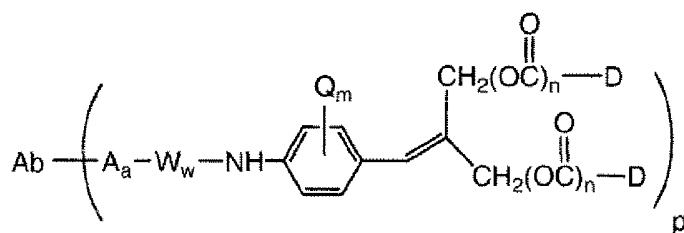


XII

Разветвленные линкеры

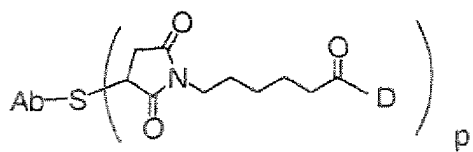
В другом варианте воплощения изобретения линкер L может быть представлен линкером разветвленного типа для ковалентного присоединения более одной молекулы препарата посредством разветвленной, мультифункциональной линкерной молекулы с антителом (Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Разветвленные линкеры могут повышать молярное соотношение препарата к антителу, т.е. нагрузку, которая является одной из характеристик активности КАП. Таким образом, в то время как антитело с введенным в ходе рекомбинации цистеином может содержать только одну реакционноспособную тиоловую группу, посредством разветвленного линкера может быть присоединено множество молекул препарата. Типичные варианты воплощения изобретения предусматривают использование разветвленных линкеров, которые включают 2,6-бис(гидроксиметил)-р-крезол и 2,4,6-трис(гидроксиметил)-фенол (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689; Shamis et al (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731; Amir et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499).

В одном варианте воплощения изобретения спейсерная единица представлена разветвленной единицей бис(гидроксиметил)стирена (BHMS) и может использоваться для введения и высвобождения множественных препаратов; структура такого спейсера следующая:

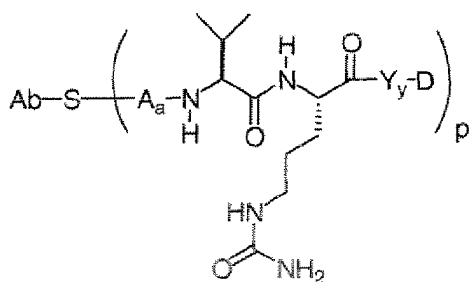


Спейсер состоит из дендримера 2-(4-аминобензилиден)пропан-1,3-диола (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494), где Q представлен -C₁-C₈ алкилом, -O-(C₁-C₈ алкилом), -галогеном, -нитро или -циано; m является целым числом, варьирующим от 0 до 4; n равно 0 или 1; и p варьирует от 1 до 4

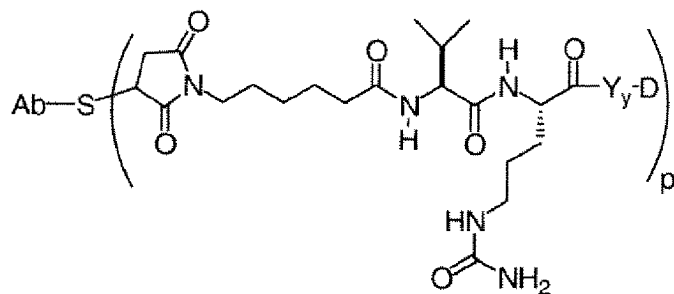
Типичные варианты воплощения изобретения описывают соединения-конъюгаты антитело-препарат по Формуле I, включая XIIIa (MC), XIIIb (вал-цит), XIIIc (MC-вал-цит) и XIId (MC-вал-цит-PAВ):



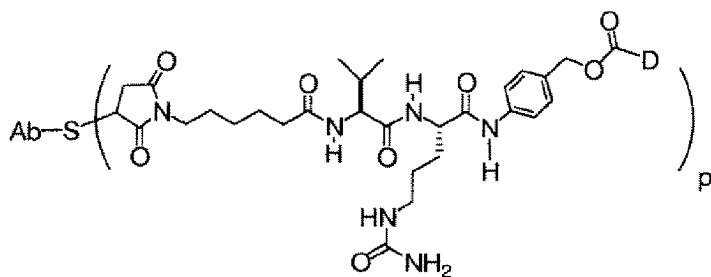
XIIIa



XIIIb

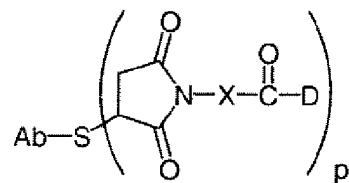


XIIIc

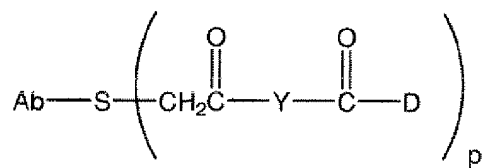


XIII d

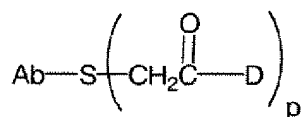
Другие типичные варианты воплощения изобретения описывают соединения-конъюгаты антитело-препарат по Формуле I, включая XIVa-e:



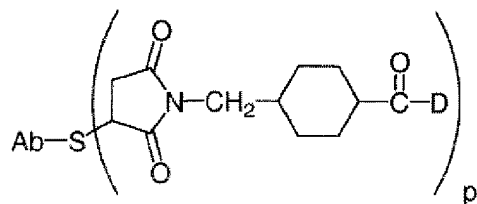
XIVa



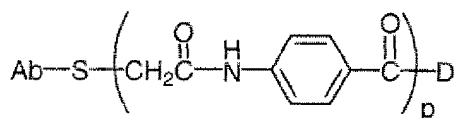
XIVb



XIVc

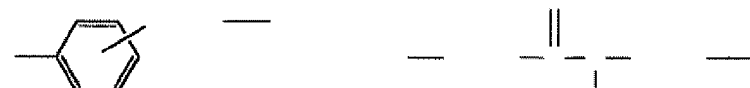


XIVd

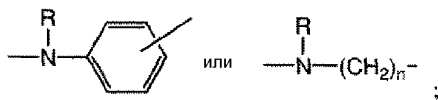


XIVe

где X представлен следующим:



Y представлен следующим:



и R представлен независимым образом H или C₁-C₆ алкилом; n составляет от 1 до 12.

В другом варианте воплощения изобретения линкер включает реакционноспособную функциональную группу, которая содержит нуклеофильную группу, связывающуюся с электрофильной группой антитела. Электрофильные группы антитела включают, но не ограничиваются, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы линкера может реагировать с электрофильной группой антитела с образованием ковалентной связи с антителом. Подходящие нуклеофильные группы линкера включают, но не ограничиваются, гидразид, оксим, аминогруппу, гидразин, тиосемикарбазон, гидразина карбоксилат и арилгидразид. Электрофильная группа антитела обеспечивает подходящее место связывания с линкером.

Как правило, линкеры пептидного типа могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, согласно способу синтеза в жидкой фазе (E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Промежуточные вещества линкера могут быть собраны в ходе любой комбинации или последовательности реакций, включая спейсер, расширитель и аминокислотные единицы. Спейсер, расширитель и аминокислотные единицы могут включать реакционноспособные функциональные группы, являющиеся электрофильными,

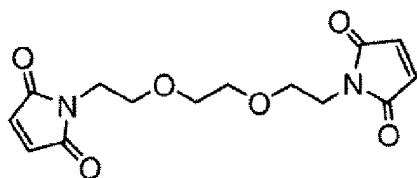
нуклеофильными или свободными радикалами. Реакционноспособные функциональные группы включают, но не ограничиваются, карбоксилы, гидроксилы, паранитрофенилкарбонат, изотиоцианат, а также замещаемые группы, такие как О-мезил, О-тозил, -Cl, -Br, -I или малеимид.

Например, заряженная замещающая группа, такая как сульфат ($-\text{SO}_3^-$) или аммоний, может повысить растворимость реагента в воде и облегчить реакцию связывания линкерного реагента с антителом или молекулой препарата, или облегчить реакцию связывания АТ-Л (промежуточное вещество антитело-линкер) с D, или D-L (промежуточное вещество препарат-линкер) с АТ, в зависимости от способа синтеза, используемого для получения КАП.

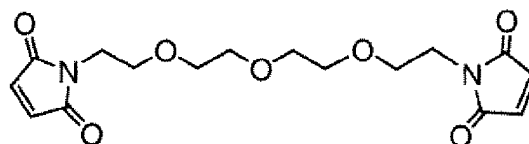
Линкерные реагенты

Конъюгаты антитела и ауристатина получают с использованием целого ряда бифункциональных линкерных реагентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис(р-азидобензойл) гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(р-дiazониябензойл)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Конъюгаты антитело-препарат также могут быть получены с использованием следующих линкерных реагентов: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), а также включая бис-малеимидные реагенты: DTME, BMB, BMDV, BMH, BMOE, 1,8-бис-малеимидодиэтиленгликоль ($\text{BM}(\text{PEO})_2$) и 1,11-бис-малеимидотриэтиленгликоль ($\text{BM}(\text{PEO})_3$), которые представлены на рынке компанией Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL и другими поставщиками. Бис-малеимидные реагенты позволяют тиоловой группе цистеина в антителе с добавленным в ходе рекомбинации цистеином присоединяться к молекуле препарата, контактирующей с тиоловой группой, метке или промежуточному веществу линкера последовательным или конкурентным образом. Другие функциональные группы, кроме малеимида, обладающие реакционной способностью относительно тиоловой группы антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином, молекулы препарата, метки или промежуточного вещества линкера, включают йодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.



$\text{BM}(\text{PEO})_2$

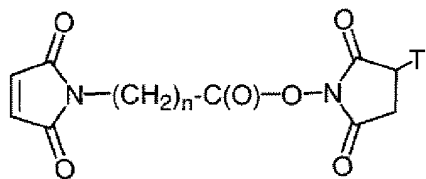


$\text{BM}(\text{PEO})_3$

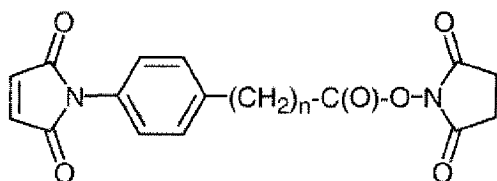
Подходящие линкерные реагенты также могут быть получены из коммерческих источников, например, от компании Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), или синтезированы в соответствии с процедурами, описанными в Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996)

Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; и WO 04/032828.

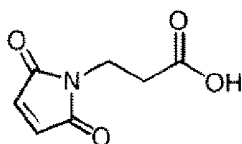
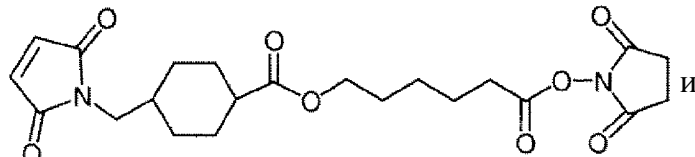
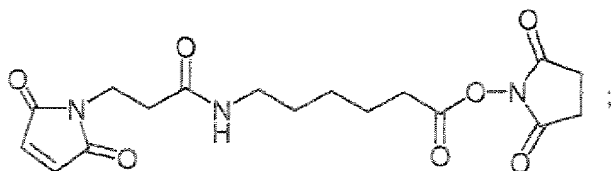
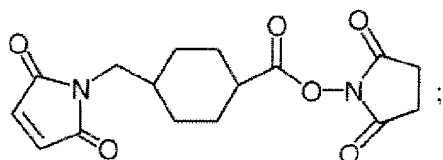
Расширители по Формуле (IIIa) могут быть введены в линкер в ходе реакции следующих линкерных реагентов с N-концевой аминокислотой:



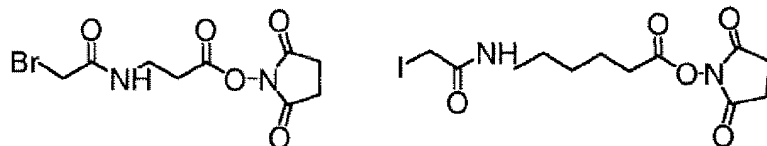
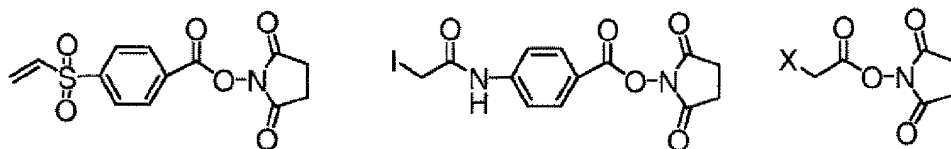
10 где n является целым числом, варьирующим от 1 до 10 и T представлен -H или -SO₃Na;



где n является целым числом и варьирует от 0 до 3;

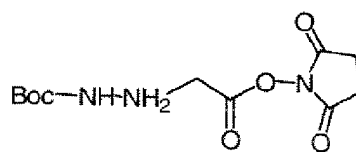
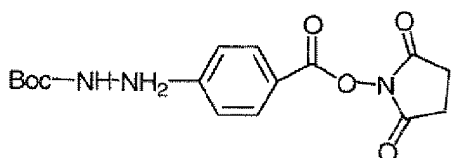
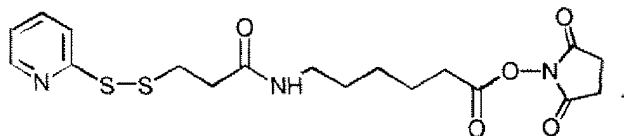
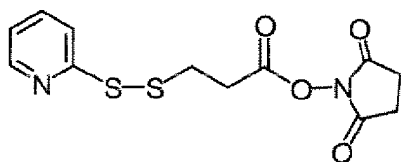


Расширители могут быть введены в линкер в ходе реакции следующих бифункциональных реагентов с N-концевой аминокислотой:

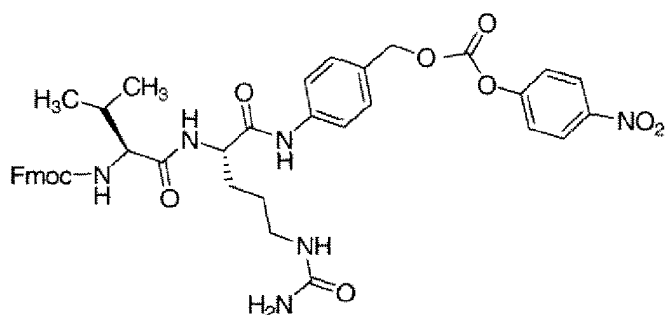


где X представлен Br или I.

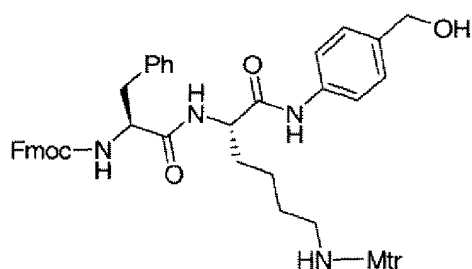
Расширители по формуле также могут быть введены в линкер в ходе реакции следующих бифункциональных реагентов с N-концевой аминокислотой:



Типичный дипептидный линкерный реагент валин-цитруллин (вал-цит или вс), включающий расширитель малеимид и саможертвующий спейсер пара-аминобензилкарбамоил (РАВ), имеет следующую структуру:



Типичный дипептидный линкерный реагент фен-лизин (Mtr, моно-4-метокситритил), включающий расширитель малеимид и саможертвующий спейсер РАВ, может быть получен согласно Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, и имеет следующую структуру:



Получение конъюгатов препарата и антитела к FcRH5c добавленным в ходе рекомбинации цистеином

КАП по Формуле I может быть получен несколькими способами, включающими реакции органической химии, условия и реагенты, известные специалисту в данной области и включающие следующее: (1) реакция группы цистеина антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения антитело-линкер АТ-L посредством ковалентной связи с последующей реакцией с активированной молекулой препарата D; (2) реакция нуклеофильной группы молекулы препарата с линкерным реагентом с образованием промежуточного вещества препарат-линкер D-L посредством ковалентной связи с последующей реакцией с группой цистеина антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином. Способы конъюгации (1) и (2) могут использоваться с различными

антителами с добавленным в ходе рекомбинации цистеином, молекулами препаратов и линкерами для получения конъюгатов антитело-препарат по Формуле I.

Тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных реагентов и промежуточных соединений препарат-линкер, включая следующие вещества: (i) активные эфиры, такие как эфиры NHS, эфиры HOBT, галогенформиаты и галиды кислот; (ii) алкил- и бензилгалиды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегиды, кетоны, карбоксильные и малеимидные группы. Нуклеофильные группы молекулы препарата включают, но не ограничиваются, следующие: амины, тиол, гидроксил, гидразид, оксим, гидразин, тиосемикарбазин, гидразина карбоксилат и арилгидразид, и такие группы способны вступать в реакцию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных молекул и линкерных реагентов.

Антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином могут стать реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами под воздействием восстановителей, таких как DTT (реактив Келланда, дитиотреитол) или TCEP (трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), с последующим повторным окислением для возобновления внутри- и межцепочечных дисульфидных связей (Пример 5). Например, моноклональные антитела полной длины с добавленным в ходе рекомбинации цистеином (ТеоМАТ), экспрессируемые в клетках CHO, восстанавливают с использованием примерно 50-кратного молярного превышения TCEP в течение 3 часов при температуре 37°C для восстановления дисульфидных связей в цистеиновых аддуктах, которые могут образоваться между нововведенными цистеиновыми остатками и цистеином, присутствующим в среде культивирования. Восстановленное ТеоМАТ разводят и загружают в колонку HiTrap S в присутствии 10 mM натрия ацетата, pH 5, и элюируют в присутствии ФСБ, содержащего 0,3M натрия хлорида. Дисульфидные связи между цистеиновыми остатками, присутствующими в исходном МАТ, были восстановлены с использованием разведенного водного сульфата меди CuSO₄ (200 nM) при комнатной температуре в течение ночи. С другой стороны, дегидроаскорбиновая кислота (DHA) является эффективным окислителем для восстановления внутрицепочечных дисульфидных групп антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином после восстановительного отщепления аддуктов цистеина. Могут использоваться и другие окислители, т.е. окисляющие вещества, и условия окисления, известные науке. Также эффективно окисление воздухом окружающей среды. Такой мягкий этап с частичным повторным окислением приводит к образованию внутрицепочечных дисульфидных связей эффективным образом с высокой степенью соответствия, и позволяет сохранить тиоловые группы нововведенных остатков цистеина. Промежуточное вещество препарат-линкер, например, MC-vc-PAB-MMAE, в количестве, превышающем примерно в 10 раз, было добавлено, перемешано и отставлено примерно на 1 час при комнатной температуре для осуществления эффективной конъюгации и образования конъюгата антитело к FcRH5-препарат. Конъюгационная смесь была подвергнута гель-фильтрации и загружена и элюирована через колонку HiTrap S для удаления избыточного количества промежуточного вещества препарат-линкер и других примесей.

Общий процесс для получения антитела с добавленным в ходе рекомбинации цистеином с последующей экспрессией культурой клеток для конъюгации представлен следующим. При содержании в культуре клеток цистеина, между нововведенным цистеином и цистеином среды могут образовываться дисульфидные аддукты. Такие

дисульфидные аддукты, обозначаемые как кружок на типичном обозначении ТиоМАТ, должны быть подвергнуты восстановлению для получения антител с добавленным в ходе рекомбинации цистеином, обладающим реакционной способностью для конъюгации. Цистеиновые аддукты, предположительно вместе с различными

- 5 межцепочечными дисульфидными связями, подвергаются восстановительному расщеплению с получением восстановленной формы антитела с использованием таких восстановителей, как ТСЕР. Межцепочечные дисульфидные связи между спаренными цистеиновыми остатками реформируют в условиях частичного окисления с сульфатом меди, ДНАА, или под воздействием кислорода воздуха окружающей среды.
- 10 Нововведенные, добавленные в ходе рекомбинации и неспаренные остатки цистеина остаются доступными для реакции с линкерными реагентами или промежуточными веществами препарат-линкер для образования конъюгатов антитела по изобретению. ТиоМАТ, экспрессируемые в линиях клеток млекопитающих, имеют наружно конъюгированные аддукты Цис с добавленным в ходе рекомбинации Цис посредством
- 15 образования связи -S-S-. Следовательно, очищенные ТиоМАТ подвергаются восстановлению и процедуре повторного окисления для получения реакционноспособных ТиоМАТ. Такие ТиоМАТ используются для конъюгации с малеимидом, содержащим цитотоксические препараты, флуорофоры и другие метки.

10. Иммунолипосомы

- 20 Описанные здесь антитела к FcRH5 также могут быть представлены в виде иммунолипосом. «Липосома» представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или сурфактанта, и может использоваться для доставки препарата в организме млекопитающего. Компоненты липосомы обычно размещаются в виде двух слоев, подобно размещению липидов в биологической
- 25 мембране. Липосомы, содержащие антитела по изобретению, получают с использованием способов, известных науке и описанных, например, в Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); и патентах США No. 4485045 и 4544545; и WO97/38731, опубликованного 23 октября 1997 г. Липосомы с увеличенным временем циркулирования описаны в патенте США
- 30 No. 5013556.

Отдельные подходящие липосомы могут быть получены путем обращенно-фазового выпаривания липидной композиции, включающей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-производное фосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ФЭ). Липосомы экстрадируются через фильтры с определенным размером пор с получением липосом необходимого

35 диаметра. Fab' фрагменты антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как это описано Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982), посредством реакции обмена с участием дисульфида. В липосоме в некоторых случаях может содержаться химиотерапевтический препарат. См. Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

40 Б. Определенные способы получения антител

1. Скрининг антител к FcRH5 с требуемыми свойствами

Выше были описаны способы получения антител, связывающихся с полипептидами FcRH5. В дальнейшем это позволит выбрать антитела с определенными биологическими характеристиками.

- 45 Влияние на ингибирование роста антителом к FcRH5 по изобретению может быть оценено с использованием известных науке способов, например, с использованием клеток, экспрессирующих полипептид FcRH5 эндогенным образом или с последующей трансфекцией геном FcRH5. Например, подходящие линии опухолевых клеток и клетки,

трансфицированные FcRH5, могут быть подвергнуты воздействию моноклональным антителом к FcRH5 в различных концентрациях в течение нескольких дней (например, 2,7 дней) с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым или МТТ или анализом с использованием другого колориметрического анализа. Другой способ

измерения пролиферации будет состоять из сравнения захвата ^3H -тимидина клетками, подвергнутыми и не подвергнутыми воздействию антитела к FcRH5. После обработки, клетки были собраны, и с помощью сцинтиллятора было подсчитано количество радиоактивного элемента, введенного в ДНК. Соответствующий положительный контроль подразумевает воздействие на выбранную линию клеток антителом, ингибирующим рост, которое, как известно, должно активировать рост таких клеток. Ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo* может быть определено различными известными науке способами. Опухолевая клетка может избыточно экспрессировать полипептид FcRH5. Антитело к FcRH5 будет ингибировать *in vitro* или *in vivo* клеточную пролиферацию опухолевой клетки, экспрессирующей FcRH5, примерно на 25-100% в сравнении с не подвергнутой воздействию опухолевой клеткой, наиболее предпочтительно, примерно на 30-100%, и даже более предпочтительно примерно на 50-100% или 70-100% в одном варианте воплощения изобретения при концентрации антитела от примерно 0,5 до 30 мкг/мл. Ингибирование роста может быть измерено при концентрации антитела от примерно 0,5 до 30 мкг/мл или от примерно 0,5 нМ до 200 нМ в клеточной культуре, при этом ингибирование роста определяется спустя 1-10 дней после воздействия антителом на опухолевые клетки. Антитело ингибирует рост в условиях *in vivo*, если введение антитела к FcRH5 в концентрации примерно 1 мкг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела приводит к снижению размера опухоли или пролиферации опухолевых клеток в течение периода от примерно 5 дней до 3 месяцев с момента первого введения антитела, преимущественно в течение примерно 5-30 дней.

Для выбора антитела к FcRH5, которое индуцирует гибель клетки, для сравнения с контролем может оцениваться потеря целостности мембраны, о чем свидетельствует, например, поглощение пропидиума йодида (ПИ), трипанового синего или 7AAD. Анализ поглощения ПИ может проводиться в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток. Опухолевые клетки, экспрессирующие полипептид FcRH5, инкубируют в среде без примесей или среде, содержащей подходящее количество антитела к FcRH5 (т.е. примерно 10 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение периода 3 дней. После каждой обработки, клетки промывают, затем отбирают аликвоты в пробирки 35 мм 12×75 с пробками (1 мл в каждую пробирку, 3 пробирки на каждую группу обработки) для удаления сгустков клеток. Затем в пробирки вносят ПИ (10 мкг/мл). Образцы могут быть подвергнуты анализу с использованием проточного цитометра FACSCAN® и программного обеспечения FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Антитела к FcRH5, которые индуцируют гибель клеток со статистически значимым показателем, как это определяется по поглощению ПИ, могут быть отобраны в качестве антител к FcRH5, которые индуцируют гибель клеток.

Для скрининга антител, связывающихся с антигенной детерминантой полипептида FcRH5, связанного с интересующим антителом, может проводиться стандартный анализ перекрестного конкурентного связывания, описанный в Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Такой анализ может использоваться для определения связывания исследуемого антитела с одним и тем же сайтом или антигенной детерминантой, что и для антитела к FcRH5. С другой стороны или кроме того, картографирование антигенных детерминант может проводиться с использованием известных науке способов. Например, последовательность антитела

может быть подвергнута мутации, например, сканирующему аланином мутагенезу, для выявления контактирующих остатков. Мутантное антитело изначально подлежит тестированию на предмет связывания с поликлональным антителом для обеспечения надлежащей складчатости. В другом способе в анализе конкурентного связывания с исследуемыми антителами или исследуемым антителом и антителом с известной антигенной детерминантой могут использоваться FcRH5, соответствующие различным участкам полипептида FcRH5.

2. Способы скрининга в отдельных библиотеках

Антитела к FcRH5 могут быть получены с использованием комбинаторных библиотек для скрининга антител с необходимой активностью. Например, в науке известен целый ряд способов для получения библиотек фаговых дисплеев и скрининга таких библиотек на предмет антител, обладающих необходимыми характеристиками связывания. Такие способы описаны в целом в Hoogenboom et al. (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), в определенных вариантах воплощения изобретения, а также в Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

В принципе, клоны синтетических антител выбираются путем скрининга фаговых библиотек, содержащих фаг, отображающий различные фрагменты вариабельного участка антитела (Fv), слитого с белковой оболочкой фага. Такие фаговые библиотеки подвергаются тестированию с использованием аффинной хроматографии относительно необходимого антитела. Клоны, экспрессирующие фрагменты Fv, способны связываться с требуемым антигеном и адсорбироваться на антигене, вследствие чего они могут быть сепарированы от несвязывающих клонов в библиотеке. Затем связывающие клоны элюируют от антигена, и такие клоны могут быть в дальнейшем обогащены дополнительными циклами абсорбции на антигене/элюирования. Любое антитело к FcRH5 по изобретению может быть получено путем разработки подходящей процедуры скрининга антигена для выбора интересующего фагового клона с последующим конструированием клона антитела к FcRH5 полной длины с использованием последовательностей Fv из интересующего фагового клона и подходящих последовательностей константного участка (Fc), описанных в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

В определенных вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающий домен антитела образуется из двух вариабельных (V) участков из примерно 110 аминокислот, каждый из которых получен из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей; оба таких участка вместе образуют три гипервариабельных петли (HVR) или гипервариабельных участка (CDR). Вариабельные домены на фаге могут отображаться функциональным образом в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), в которых VH и VL соединены ковалентным образом посредством короткого, гибкого пептида, или в виде фрагментов Fab, каждый из которых слит с константным доменом и взаимодействует нековалентным образом, как это описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). В контексте данного изобретения фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, собирательным образом обозначают как «фаговые клоны Fv» или «Fv клоны».

Репертуар генов VH и VL может быть клонирован отдельным образом в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинирован случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем подвергаются поиску на предмет наличия антигенсвязывающих клонов, как это описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногенам без необходимости в конструкции гибридом.

С другой стороны, нативный репертуар может быть клонирован для обеспечения одного источника человеческих антител к широкому ряду собственных и других антигенов без какой-либо иммунизации, как это описано в Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Наконец, нативные библиотеки также могут быть получены

5 искусственным образом путем клонирования непрерывных сегментов гена V из стволовых клеток, а также с использованием праймеров ПЦР, содержащих случайную последовательность для кодирования высоковариабельных участков CDR3 и обеспечения перестановки *in vitro*, как это описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

10 В определенных вариантах воплощения изобретения для отображения фрагментов антител путем слияния с небольшим белком оболочки рШ используется нитчатый бактериофаг. Фрагменты антитела могут быть отображены в виде одноцепочечных фрагментов Fv, в которых домены VH и VL соединены в одну и ту же полипептидную цепь гибким полипептидным спейсером, например, как это описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или в виде фрагментов Fab, в которых одна цепь слита с рШ, а другая цепь секретирована в периплазму бактериальной клетки-хозяина, в которой происходит сборка оболочечного Fab-белка, структура которого отображается на поверхности фага замещением одного из оболочечных белков дикого типа, например, как это описано в Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

20 В целом, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты гена антитела, получают из иммунных клеток человека или животных. Если библиотека оценивается относительно клонов антител к FcRH5, субъект иммунизируется FcRH5 для получения ответа в виде образования антител, затем восстанавливают клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки и другие лимфоциты периферической крови (ЛПК) для построения библиотеки.

25 В преимущественном варианте воплощения изобретения библиотека фрагментов генов человеческого антитела оценивается относительно клонов антитела к FcRH5, и такую библиотеку получают путем генерации выработки антитела к FcRH5 у трансгенных мышей, несущих функциональную генетическую информацию о человеческом иммуноглобулине (при недостаточной эндогенной выработке функциональных антител),

30 т.е. иммунизация FcRH5 приводит к повышению выработки В-клетками человеческих антител к FcRH5. Получение трансгенных мышей, вырабатывающих человеческое антитело, описано ниже.

Дополнительное обогащение популяций реактивных клеток антителом к FcRH5 может быть осуществлено путем использования подходящей процедуры скрининга для

35 изоляции В-клеток, экспрессирующих антитело к FcRH5, специфическим образом связывающегося с мембраной, например, путем разделения клеток с использованием аффинной хроматографии или абсорбции клеток меченого флуорохромом FcRH5 путем анализа флуоресцентной сортировки клеток (FACS).

С другой стороны, использование клеток селезенки и/или В-клеток, или других ЛПК

40 от неиммунизированного донора обеспечивает лучшее воспроизведение возможного репертуара антител, а также позволяет осуществить конструирование библиотеки антитела с использованием любого вида животного (человека или животного), для которых FcRH5 не является антигеном. Для библиотек, предусматривающих конструирование гена антитела в условиях *in vitro*, стволовые клетки отбирают у

45 субъекта с целью обеспечения наличия нуклеиновых кислот, кодирующих неизменные сегменты генов антител. Интересующие иммунные клетки могут быть получены у целого ряда видов животных, например, человека, мыши, крысы, зайцеобразных, волчьих, собачьих, кошачьих, свиней, крупного рогатого скота, лошадей и птиц.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельные сегменты гена антитела (включая сегменты VH и VL), восстанавливают из интересующих клеток и подвергают амплификации. В случае измененных генных библиотек VH и VL, необходимая ДНК может быть получена путем изоляции геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами, соответствующими 5'- и 3'-концам измененных генов VH и VL, как это описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), таким образом, для экспрессии получают разные репертуары гена V. Гены V могут быть амплифицированы из кДНК и геномной ДНК с обратными праймерами на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямыми праймерами в пределах J-сегмента, как это описано в Orlandi et al. (1989) и в Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Однако, для амплификации из кДНК, обратные праймеры также могут быть основаны на лидерном экзоне, как это описано в Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), а прямые праймеры - на константном участке, как это описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для максимального увеличения комплементарности, праймеры могут быть подвергнуты дегенерации, как это описано в Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). В определенных вариантах воплощения изобретения разнообразие библиотеки повышается максимальным образом путем использования праймеров ПЦР, направленных на каждое семейство V-гена, для амплификации всех доступных размещений VH и VL, присутствующих в образце нуклеиновой кислоты иммунной клетки, например, как это описано в способе Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или как это описано в способе Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в векторы экспрессии, в праймер ПЦР могут быть введены редкие сайты рестрикции в качестве тэга на одном конце, как это описано в Orlandi et al. (1989), или путем дальнейшей амплификации ПЦР с содержащим тэг праймером, как это описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Репертуар синтетическим образом измененных V генов может быть получен *in vitro* из сегментов V гена. Большая часть сегментов VH-гена человека была клонирована, секвенирована (сообщено в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), и картографирована (сообщено в Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); такие клонированные сегменты (включая все основные конформации петли H1 и H2) могут использоваться для генерации различных репертуаров гена VH с праймерами ПЦР, кодирующими петли H3 различной последовательности и длины, как это описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Репертуары VH также могут быть получены со всем разнообразием последовательности, сфокусированной в длинной петле H3 одинаковой длины, как это описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Сегменты V_K и V_L человека были клонированы и секвенированы (сообщено в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)), и могут использоваться для получения репертуаров синтетическим образом полученной легкой петли. Репертуары синтетическим образом полученного V гена, основанные на диапазоне скручивания VH и VL, и длине L3 и H3, будут кодировать антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации V гена, кодирующего ДНК, сегменты V гена зародышевого центра могут быть модифицированы *in vitro* согласно способам, описанным в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Репертуары фрагментов антитела могут быть сконструированы путем комбинирования репертуаров гена VH и VL вместе различными способами. Каждый репертуар может быть создан в разных векторах, и векторы могут быть рекомбинированы *in vitro*, например, как это описано в Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126

(1993), или *in vivo* с использованием комбинаторной инфекции, например, системы loxP, описанной в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). *In vivo* рекомбинационный подход подразумевает использование двухцепочечных фрагментов Fab для преодоления лимита по размеру библиотеки, обусловленного эффективностью трансформации *E. coli*. Нативные репертуары VH и VL клонируют отдельным образом: один в одну фагмиду, другой - в другой фаговый вектор. Затем две библиотеки комбинируют с использованием фаговой инфекции содержащих фагмиду бактерий, таким образом, каждая клетка содержит различную комбинацию, а размер библиотеки ограничен только числом присутствующих клеток (примерно 10^{12} клонов). Оба вектора содержат *in vivo* рекомбинационные сигналы, таким образом, гены VH и VL рекомбинируют в один репликон и совместно включают в фаговые вирионы. Такие большие библиотеки обеспечивают большое количество различных антител с хорошим показателем аффинности (K_d^{-1} примерно 10^8 М).

С другой стороны, репертуары могут быть клонированы последовательно в один и тот же самый вектор, например, как это описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), или собраны вместе в ходе ПЦР и затем клонированы, например, как это описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Сборка в ходе ПЦР также может использоваться для соединения ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей спейсер (гибкий пептид) с образованием репертуаров одноцепочечных Fv (scFv). В еще одном способе «сборка в ходе ПЦР в клетке» используется для соединения генов VH и VL в лимфоцитах путем ПЦР с последующим клонированием репертуаров соединенных генов, как это описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Антитела, полученные с помощью нативных библиотек (естественных или синтетических) могут иметь умеренную аффинность (K_d^{-1} примерно от 10^6 до 10^7 М⁻¹), но аффинная зрелость также может быть сымитирована *in vitro* путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек, как это описано в Winter et al. (1994). Например, может быть введена мутация в случайном порядке *in vitro* путем использования склонной к ошибкам полимеразы (сообщенной в Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) в способе Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) или способа Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Кроме того, аффинная зрелость может быть достигнута путем случайной мутации одного или нескольких CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, несущими случайную последовательность, охватывающую интересующий CDR, в выбранных отдельных клонах Fv и скринингом клонов с высокой аффинностью. В WO 9607754 (опубликовано 14 марта 1996 г.) приводится описание способа индуцирования мутагенеза в гипервариабельном участке легкой цепи иммуноглобулина для создания библиотеки генов легкой цепи. Другой эффективный способ состоит в рекомбинации доменов VH или VL, выбранных с помощью фагового дисплея, с репертуарами встречающихся в природе вариантов V доменов, полученных у иммунизированных доноров, с последующим скринингом на предмет высокой аффинности при неоднократной перестановки цепи, как это описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Такой способ позволяет получить антитела и фрагменты антител с аффинностью примерно 10^9 М или менее.

Скрининг библиотек может сопровождаться различными известными науке способами. Например, для покрытия лунок абсорбционных планшетов может использоваться FcRH5, экспрессируемый на клетках-хозяевах, фиксированных на адсорбционных планшетах или используемых в сортировке клеток, или

конъюгированных с биотином для захвата покрытых стрептавидином гранул, или может использоваться любой другой способ с использованием библиотек фаговых дисплеев.

Образцы фаговых дисплеев контактируют с иммобилизованным FcRH5 в условиях, 5 подходящих для связывания, по меньшей мере, части фаговых частиц с адсорбентом. Как правило, условия, включая pH, ионную силу, температуру и т.п., выбирают для имитации физиологических условий. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают и затем элюируют кислотой, например, как это описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), или щелочью, например, как это описано в Marks et al., J. 10 Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или путем конкуренции с антигеном FcRH5, например, в ходе процедуры, подобной конкурентному связыванию антигена, описанному в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Фаги могут быть 20-1000-кратно обогащены в ходе одного цикла отбора. Кроме того, обогащенные фаги могут расти в культуре бактерий и быть подвергнуты дальнейшей селекции.

Эффективность селекции зависит от многих факторов, включая кинетику диссоциации 15 во время промывания, а также возможности множественных фрагментов антител на одном фаге одновременно взаимодействовать с антигеном. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и слабой аффинностью связывания) могут быть удержаны при использовании короткого промывания, мультивалентного фагового дисплея и высокой 20 плотности покрытия антигеном твердой поверхности. Большая плотность не только стабилизирует фаг посредством мультивалентных взаимодействий, но также способствует повторному образованию структуры диссоциированного фага. Селекция антител с медленной кинетикой диссоциации (и хорошей аффинностью связывания) может поддерживаться путем использования длительного промывания и 25 моновалентного фагового дисплея, как это описано в Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) и в WO 92/09690, а также небольшой плотностью покрытия антигена, как это описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Возможна селекция между фаговыми антителами с разной аффинностью относительно FcRH5, даже если такая аффинность отличается незначительно. Однако вполне вероятно, 30 что случайная мутация выбранного антитела (например, как это практикуется в нескольких способах по созреванию аффинности) может дать начало многим мутантам, в большинстве своем относительно связывания с антигеном, и лишь несколько из таких мутантов будут иметь более высокую аффинность. При ограниченном количестве FcRH5 можно исключить редкие фаги с высокой аффинностью. Для сохранения всех 35 мутантов с высокой аффинностью, фаги могут быть инкубированы с избыточным количеством биотинилированного FcRH5 при концентрации FcRH5 с более низким показателем молярности, чем установленная константа молярной аффинности для FcRH5. Фаги с высокой аффинностью связывания затем могут быть захвачены парамагнитными гранулами, покрытыми стрептавидином. Подобный «равновесный 40 захват» позволяет выбрать антитела в соответствии с их аффинностью связывания с чувствительностью, позволяющей изолировать мутантные клоны с аффинностью, превышающей низкую аффинность фагов, всего лишь в 2 раза. Условия, используемые при промывании фагов, связанных с твердой поверхностью, также могут быть изменены для введения различий на основе кинетики диссоциации.

Клоны антител к FcRH5 могут выбираться на основе их активности. В определенных вариантах воплощения изобретение описывает антитела к FcRH5, которые связываются с живыми клетками, которые в естественных условиях экспрессируют FcRH5. В одном 45 варианте воплощения изобретение описывает антитела к FcRH5, которые блокируют

связывание между лигандом FcRH5 и FcRH5, но не блокируют связывание между лигандом FcRH5 и другим белком. Клоны Fv, соответствующие таким антителам к FcRH5, могут быть выбраны путем (1) выделения клонов антител к FcRH5 из фаговой библиотеки, как это описано выше, и, в некоторых случаях, амплификации выделенной популяции фаговых клонов путем выращивания популяции в подходящей бактериальной клетке-хозяине; (2) селекции FcRH5 и другого белка относительно блокирующей и не блокирующей активности, соответственно (при необходимости); (3) поглощения фаговых клонов антител к FcRH5 иммобилизованным FcRH5; (4) использования избыточного количества другого белка для элюирования любых нежелательных клонов, распознающих FcRH5-связывающие детерминанты, перекрывающие или общие для детерминант связывания другого белка; и (5) элюирования клонов, которые остаются адсорбированными после этапа (4). В некоторых случаях клоны с необходимыми свойствами блокирования/отсутствия блокирования могут быть в дальнейшем обогащены путем повтора процедур селекции, описанных здесь, один или более раз.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, полученные из гибридомы, или клоны Fv фагового дисплея по изобретению, может быть легко изолирована и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для специфической амплификации кодирующих участков тяжелой и легкой цепей из матричной ДНК гибридомы или фага). После изоляции ДНК может быть включена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. Coli*, клетки линии COS обезьяны, клетки яичников китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в противном случае не вырабатывают белок иммуноглобулина, для организации синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзор статей о рекомбинантной экспрессии бактериями ДНК, кодирующей антитело, представлен в Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

ДНК, кодирующая клоны Fv по изобретению, может быть скомбинирована с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные участки тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК могут быть получены из Kabat et al. (см. выше) с образованием клонов, кодирующих частичные или полные тяжелые и/или легкие цепи). Следует иметь в виду, что для данной цели могут использоваться константные участки любого изотипа, включая константные участки IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и такие константные участки могут быть получены от любого вида животного или человека. Клон Fv, полученный из ДНК переменного домена одного животного (например, человека) и затем слитый с ДНК константного участка животного другого вида, для образования кодирующей последовательности (ей) «гибридной», тяжелой цепи полной длины и/или легкой цепи, включен в определение «химерного» и «гибридного» антитела в контексте данного изобретения. В определенных вариантах воплощения изобретения клон Fv, полученный из ДНК переменного участка человека, слит с ДНК константного участка человека с образованием кодирующей последовательности(ей) для тяжелых и/или легких цепей человека частичной или полной длины.

ДНК, кодирующая антитело к FcRH5 и полученная из гибридомы, также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепи человека гомологичными мышинными последовательностями, полученными из клона гибридомы (например, как это описано в способе Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК,

кодирующая антитело или фрагмент, полученные из клона Fv или гибридомы, может быть в дальнейшем модифицирована путем ковалентного присоединения к кодирующей иммуноглобулин последовательности всей или части кодирующей последовательности полипептида, не являющегося иммуноглобулином. Таким образом, получают
 5 «химерные» или «гибридные» антитела, обладающие специфичностью связывания антител по изобретению, полученных из клона Fv или гибридомы.

В. Антитело-зависимая терапии пролекарством, опосредуемая ферментом (ADEPT)

Антитела по данному изобретению также могут использоваться в ADEPT путем конъюгации антитела с активирующим пролекарство ферментом, что приводит к
 10 преобразованию пролекарства (*например*, химиотерапевтическое вещество пептидил, см. W081/01145) в активный противораковый препарат. См, например, WO 88/07378 и патент США No. 4975278.

Ферментный компонент иммуноконъюгата, который может использоваться для ADEPT, включает любой фермент, который способен активировать пролекарство таким
 15 образом, чтобы преобразовывать его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые могут использоваться в способе данного изобретения, включают, но не ограничиваются, следующие: щелочная фосфатаза для конвертации фосфат-содержащих пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; арилсульфатаза для конвертации сульфатсодержащих пролекарств в лекарственные
 20 вещества, не связанные с белками крови; цитозиндезаминаза для конвертации нетоксичного 5-фторцитозина в противораковый препарат, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза серратии, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), для конвертации пептид-содержащих пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; D-аланилкарбоксипептидазы
 25 для конвертации пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, для конвертации гликозилированных пролекарств в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; β -лактамаза для конвертации препаратов, содержащих α -лактамы, в лекарственные вещества, не связанные с белками крови; и пенициллинамидазы, такие
 30 как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, для конвертации препаратов, содержащих феноксиацетильные или фенилацетильные группы, присоединенные к аминному азоту, соответственно, в лекарственные вещества, не связанные с белками крови. С другой стороны, антитела с ферментативной активностью, также известные в науке как «абзимы», также могут использоваться для конвертации пролекарств в
 35 активные лекарственные вещества, не связанные с белками крови (см., например, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены в соответствии с представленным здесь описанием для поставки абзима к популяции опухолевых клеток.

Ферменты по данному изобретению могут быть ковалентно связаны с антителами
 40 к FcRH5 с использованием известных науке способов, например, с использованием описанных выше гетеробифункциональных реагентов, обеспечивающих перекрестное связывание. С другой стороны, белки слияния, включающие как минимум антигенсвязывающий участок антитела по изобретению, связанного как минимум с функционально активным участком фермента, могут быть получены с использованием
 45 способов рекомбинантной ДНК, хорошо известных науке (*см, например, Neuberger et al., Nature*, 312:604-608 (1984)).

Г. Антитела к FcRH5

Кроме описанных здесь антител к FcRH5, также предусматривается получение и

использование вариантов антител к FcRH5. Варианты антител к FcRH5 могут быть получены путем введения соответствующих изменений в нуклеотиды кодирующей ДНК и/или путем синтеза требуемого антитела или полипептида. Специалисту в данной области будет понятно, что изменения в аминокислотах могут привести к изменениям в пост-трансляционных процессах антитела к FcRH5, таких как изменение количества или положения участков гликозилирования или изменение характеристик связывания с мембраной.

Описанные здесь варианты антител к FcRH5 могут быть получены, например, с использованием любого способа и руководств для мутаций консервативных и неконсервативных аминокислот, описанных, например, в патенте США No. 5364934. Вариации могут заключаться в замене, делеции или вставке одного или нескольких кодонов, кодирующих антитело или полипептид, что приводит к изменению аминокислотной последовательности в сравнении с нативной последовательностью антитела или полипептида. В некоторых случаях вариация представлена замещением по меньшей мере одной аминокислоты другой аминокислотой в одном или нескольких доменах антитела к FcRH5. Руководства по определению аминокислотного остатка, который может быть вставлен, замещен или удален без отрицательного воздействия на необходимую активность, могут быть получены путем сравнения последовательности антитела к FcRH5 с последовательностью известных гомологичных белковых молекул и сведения к минимуму количества изменений в аминокислотной последовательности в участках с высокой степенью гомологичности. Замены аминокислот могут быть результатом замещения одной аминокислоты другой аминокислотой с подобными структурными и/или химическими свойствами, например, замещение лейцина серином, т.е. замещение консервативной аминокислотой. Вставки или делеции могут выполняться в пределах от примерно 1 до 5 аминокислот. Допустимое изменение может быть определено по систематическому введению вставок, делеций или замен аминокислот в последовательности и тестированию получаемых вариантов на предмет активности, проявляемой зрелой нативной последовательностью или последовательностью с полной длиной.

Изобретение описывает и фрагменты антитела к FcRH5. Такие фрагменты могут быть усечены на N-конце или C-конце, или могут не включать внутренние остатки, например, при сравнении с нативным антителом полной длины или белком. Определенные фрагменты не содержат остатки аминокислот, не играющих важную роль в требуемой биологической активности антитела к FcRH5.

Фрагменты антитела к FcRH5 могут быть получены с использованием любого из целого ряда имеющихся способов. Необходимые пептидные фрагменты могут быть синтезированы химическим путем. Альтернативный способ включает получение фрагментов полипептида или антитела в ходе ферментативного расщепления, например, путем обработки белка ферментом, который, как известно, расщепляет белки в участках, определенных отдельными аминокислотными остатками, или путем расщепления ДНК подходящими рестриктазами и выделения необходимого фрагмента. Еще один подходящий способ включает изоляцию и амплификацию фрагмента ДНК, кодирующей необходимое антитело или фрагмент полипептида, в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Олигонуклеотиды, определяющие необходимые концы фрагмента ДНК, используют на праймерах 5' и 3' в ходе ПЦР. Преимущественным образом, фрагменты антитела к FcRH5 обладают, по меньшей мере, одной биологической и/или иммунологической активностью нативного и описанного здесь антитела к FcRH5.

В отдельных вариантах воплощения изобретения замены консервативных

аминокислот представлены в Таблице 8 под заголовком «Предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, чем более существенные изменения, указанные в Таблице 8 как «Типичные замены», или в соответствии с описанными ниже классами аминокислот, такие замены вводятся, а продукты подвергаются скринингу.

Таблица 8		
Оригинальный остаток	Типичные	Предпочтительные замены
Ала (A)	Вал; Лей; Иле	Вал
Арг (R)	Лиз; Гли; Асп	Лиз
Асп (N)	Гли; Гис; Лиз; Арг	Гли
Асп (D)	Глу	Глу
Цис (C)	Сер	Сер
Гли (Q)	Асп	Асп
Глу (E)	Асп	Асп
Гли (G)	Про; Ала	Ала
Гис (H)	Асп; Гли; Лиз; Арг	Арг
Иле (I)	Лей; Вал; Мет; Ала; Фен; Норлейцин	Лей
Лей (L)	норлейцин; Иле; Вал; Мет; Ала; Фен	Иле
Лиз (K)	Арг; Гли; Асп	Арг
Мет (M)	Лей; Фен; Иле	Лей
Фен (F)	Лей; Вал; Иле; Ала; Тир	Лей
Про (P)	Ала	Ала
Сер (S)	Тре	Тре
Тре (T)	Сер	Сер
Три (W)	Тир; Фен	Тир
Тир (Y)	Три; Фен; Тре; Сер	Фен
Вал (V)	Иле; Лей; Мет; Фен; Ала; норлейцин	Лей

Существенные изменения в функции или иммунологической эффективности антитела к FcRH5 сопровождаются избирательными заменами, которые существенно различаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замещения, например, в виде складчатой или спиральной конформации; (б) заряда или гидрофобности молекулы в указанном месте; или (в) общей боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на следующие группы на основе общих свойств боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Мет, Ала, Вал, Лей, Иле;
- (2) нейтральные гидрофильные: Цис, Сер, Тре;
- (3) кислые: Асп, Глу;
- (4) основные: Асп, Гли, Гис, Лиз, Арг;

(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Гли, Про; и

(6) ароматические: Трп, Тир, Фен.

Замены неконсервативных аминокислот будут включать замену члена одного из таких классов членом из другого класса. Такие замещенные остатки также могут быть
 5 введены в места нахождения консервативных аминокислот или, преимущественно, в оставшиеся места нахождения неконсервативных аминокислот.

Вариации могут быть получены с использованием известных науке способов, таких как сайт-специфический (или опосредованный олигонуклеотидами) мутагенез, сканирующий аланином мутагенез и ПЦР-мутагенез. Сайт-специфический мутагенез
 10 [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], кассетный мутагенез [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], рестрикционный избирательный мутагенез [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] или другие известные способы могут использоваться на клонированной ДНК для получения варианта ДНК антитела к FcRH5.

Сканирующий аминокислотный анализ также может проводиться для выявления одной или нескольких аминокислот непрерывной последовательности. Сканирование предпочтительно осуществляется по относительно небольшим, нейтральным аминокислотам. Такие аминокислоты включают аланин, глицин, серин и цистеин. Аланин обычно является преимущественной подвергаемой сканированию
 15 аминокислотой среди данной группы, поскольку он элиминирует боковую цепь после бета-атома углерода и с меньшей вероятностью влияет на конформацию основной цепи варианта [Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. Кроме того, аланин предпочитается потому, что является наиболее встречаемой аминокислотой. Кроме того, он часто встречается в погруженных и открытых положениях [Creighton, *The*
 20 *Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Если замещение аланина не привело к получению адекватного количества варианта, может использоваться изомер аминокислоты.

Любой остаток цистеина, не задействованный в поддержании надлежащей конформации антитела к FcRH5, также может быть замещен, обычно серином, для
 30 улучшения устойчивости к окислению молекулы и предотвращению аберрантного образования перекрестных связей. С другой стороны, в антитело к FcRH5 могут быть добавлены цистеиновые связи для улучшения устойчивости антитела (в частности, если антитело представлено фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

В частности, преимущественный тип варианта с замещением подразумевает замещение
 35 одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, получаемый вариант (ты), выбранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства относительно исходного антитела, из которого он был получен. Удобный способ получения таких замещенных вариантов включает применение способа аффинной
 40 зрелости с использованием фаговых дисплеев. В нескольких словах это можно описать следующим образом: несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для получения всех возможных замен аминокислот в каждом сайте. Варианты антитела, полученные таким образом, отображаются моновалентно из структур нитевидных фагов как слияния продукта гена III M13, соединенного с каждой частицей. Затем варианты фаговых дисплеев подвергаются скринингу на предмет своей биологической активности (например, аффинности связывания), как это описано в тексте данной заявки. В целях идентификации кандидатных сайтов гипервариабельного участка для модификации, может быть

проведен сканирующий аланином мутагенез для идентификации остатков гипервариабельного участка, которые существенным образом способствуют связыванию с антигеном. С другой стороны или кроме того, преимущественным может служить анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и полипептидом FcRH5. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии с используемыми здесь способами. Как только такие варианты будут получены, панель вариантов подвергается скринингу в соответствии с представленным здесь описанием, и антитела с превосходящими свойствами по результатам одного или нескольких релевантных анализов могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела к FcRH5, получают с использованием целого ряда известных в науке способов. Такие способы включают, но не ограничиваются, следующие: выделение из природного источника (в случае вариантных последовательностей аминокислот, встречающихся в природе) или получение путем сайт-специфического (или опосредованного олигонуклеотидами) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученных ранее вариантной или невариантной версии антитела к FcRH5.

Д. Модификации антител к FcRH5

Ковалентные модификации антитела к FcRH5 включены в область применения данного изобретения. Один из типов ковалентной модификации включает реакцию определенных аминокислотных остатков антитела к FcRH5 с органическим веществом, используемым для получения производных соединений и способным реагировать с выбранными боковыми цепями или остатками на N- или C-конце антитела к FcRH5.

Дериватизация с использованием бифункциональных агентов может использоваться, например, для образования перекрестных связей антитела к FcRH5 с нерастворимой в воде опорной матрицей или поверхностью для использования в способе очистки антител к FcRH5 и наоборот. Используемые обычно вещества для образования перекрестных связей включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные эфиры, например, эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая эфиры дисукцинимидила, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат), бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и соединения, такие как метил-3-[(p-азидофенил)дителио]пропиоимидат.

Другие модификации включают дезамидирование остатков глутаминил и аспарагинил в соответствующие остатки глутамил и аспартил, гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации антитела к FcRH5, предусмотренный данным изобретением, состоит из изменения нативной схемы гликозилирования антитела или полипептида. «Изменение нативной схемы гликозилирования антитела» в контексте данного изобретения подразумевает удаление одной или нескольких молекул углеводов, присутствующих в нативной последовательности антитела к FcRH5 (путем удаления присутствующего участка гликозилирования или удаления гликозилирования в ходе химических и/или ферментативных реакций), и/или добавление одного или нескольких

участков гликозилирования, которые отсутствуют в нативной последовательности антитела к FcRH5. Кроме того, фраза подразумевает качественные изменения в гликозилировании нативных белков, включая изменение в природе и соотношениях различных присутствующих молекул углеводов.

5 Гликозилирование антител и других полипептидов обычно представлено N-гликозилированием или O-гликозилированием. N-гликозилирование относится к присоединению молекулы углевода к боковой цепи по остатку аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, де Х
10 представлен аминокислотой, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения молекулы углевода к аспарагину боковой цепи. Таким образом, присутствие одной из таких трех трипептидных последовательностей создает потенциальный участок гликозилирования. O-гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто
15 представленной серином или треонином, однако могут использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление участков гликозилирования к антителу к FcRH5 удобным образом сопровождается изменением аминокислотной последовательности таким образом, что она включает одну или несколько представленных выше трипептидных
20 последовательностей (для участков N-гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замещения одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности оригинального антитела к FcRH5 (для участков O-гликозилирования). Аминокислотная последовательность антитела к FcRH5 в некоторых случаях может быть изменена посредством изменений на уровне ДНК, в
25 частности, введением мутаций в ДНК, кодирующую антитело к FcRH5, в определенные ранее основания с образованием кодонов, транслирующих необходимые аминокислоты.

Другой способ повышения количества молекул углеводов в антителе к FcRH5 представляет собой химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду. Эти способы описаны в науке, например, в WO 87/05330, опубликованном
30 11 сентября 1987 г., а также в Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Удаление молекул углеводов, присутствующих в антителе к FcRH5, может сопровождаться химической или ферментативной реакцией или мутационной заменой кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, служащие в качестве мишеней для
35 гликозилирования. Способы химического дегликозилирования известны науке и описаны, например, Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) и Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Ферментативное расщепление молекул углеводов, присоединенных к полипептидам, может достигаться путем использования различных эндо- и экzogликозидаз, как это описано Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

40 Другой тип ковалентной модификации антитела к FcRH5 заключается в связывании антитела с одним из целого ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем или полиоксисилкисленами, согласно описанию, представленному в патентах США No. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Антитело также может быть заключено в микрокапсулы, например, путем
45 коацервации или межфазной полимеризации, например, с помощью гидроксиметилцеллюлозы, микрокапсулы из желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата, соответственно, представленных в виде коллоидных систем доставки препарата (например, в липосомах, белковых микросферах, микроэмульсиях,

нано-частицах и нано-капсулах) или в виде макроэмульсий. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Антитело к FcRH5 по данному изобретению также может быть модифицировано путем образования химерных молекул, состоящих из антитела к FcRH5, слитого с другим, гетерологичным полипептидом или последовательностью аминокислот.

В одном варианте воплощения изобретения такая химерная молекула состоит из антитела к FcRH5, слитого с полипептидом-тэгом, который обеспечивает антигенную детерминанту, с которой избирательным образом связывается антитело к тэгу. Такая антигенная детерминанта-тэг обычно располагается на амино- или карбоксильном конце антитела к FcRH5. Присутствие подобных форм антигенная детерминанта-тэг антитела к FcRH5 может быть определено с использованием антитела к полипептиду-тэгу. Кроме того, наличие антигенной детерминанты-тэга позволяет производить легкую очистку антитела к FcRH5 с использованием аффинных способов очистки, антитела к тэгу или аффинной матрицы другого типа, которая связывается с антигенной детерминантой-тэгом. В науке известны различные полипептиды-тэги и их соответствующие антитела. Примеры включают тэги полигистидина (полигис) или полигистидин-глицина (полигис-гли); полипептидный тэг flu HA и антитело к нему 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; тэг с-мус и антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; а также тэг гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса и антитела к нему [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Другие полипептиды-тэги включают Flag-пептид [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; антигенную детерминанту пептида КТЗ [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; антигенную детерминанту пептида α -тубулина [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; пептидный тэг гена T7 белка 10 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

В альтернативном варианте воплощения изобретения химерная молекула может состоять из антитела к FcRH5, слитого с иммуноглобулином или отдельным участком иммуноглобулина. Для двухвалентной формы химерной молекулы (также обозначаемой как «иммуноадгезин»), такое слияние может быть выполнено с участком Fc молекулы IgG. Слияние Ig преимущественным образом включает замену растворимой формы (трансмембранный домен удален или инактивирован) антитела к FcRH5 в месте по меньшей мере одного переменного участка в молекуле Ig. В отдельном предпочитаемом варианте воплощения изобретения иммуноглобулин слияния состоит из каркасного участка, CH₂ и CH₃, или каркасного участка, участков CH₁, CH₂ и CH₃ молекулы IgG1. Информация по получению иммуноглобулинов для слияния представлена также в патенте США 5428130 от 27 июня 1995 г.

Е. Получение антител к FcRH5

Представленное ниже описание относится преимущественным образом к получению антител к FcRH5 путем культивации клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к FcRH5. Предполагается, что для получения антител к FcRH5 могут использоваться альтернативные способы, известные в науке. Например, соответствующая аминокислотная последовательность или ее участок могут быть получены путем непосредственного синтеза белка с использованием твердофазных способов (см., например, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* может осуществляться с использованием автоматизированных способов или вручную. Автоматизированный синтез может сопровождаться, например,

использованием пептидного синтезатора Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) с соблюдением инструкции производителя. Различные участки антитела к FcRH5 могут быть синтезированы химически по-отдельности или в комбинации с использованием химических или ферментативных способов получения необходимого антитела к FcRH5.

1. Выделение ДНК, кодирующей антитело к FcRH5

ДНК, кодирующая антитела к FcRH5, может быть получена из библиотеки кДНК, полученной из ткани, которая, как считается, содержит мРНК антитела к FcRH5 и экспрессирует такие антитела в определяемой концентрации. В соответствии с этим, ДНК человеческих антител к FcRH5 может быть удобным образом получена из библиотеки кДНК, полученной из ткани человека. Ген, кодирующий антитело к FcRH5, может быть также получен из геномной библиотеки или с использованием известных процедур синтеза (например, автоматического синтеза нуклеиновой кислоты).

Библиотеки могут быть подвергнуты скринингу с зондами (такими как олигонуклеотиды с, по меньшей мере, примерно 20-80 основаниями), разработанными для идентификации интересующего гена или белка, кодируемых ДНК. Скрининг кДНК или геномной библиотеки с выбранным зондом может проводиться с использованием стандартных процедур, например, таких, как это описано в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Альтернативным способом для выделения гена, кодирующего антитело к FcRH5, является использование ПЦР [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Способы скрининга библиотеки кДНК хорошо известны науке. Последовательности олигонуклеотидов, выбранные в качестве зондов, должны иметь достаточную длину и быть достаточно однозначными для сведения к минимуму ложноположительных результатов. Олигонуклеотид подлежит преимущественно мечению, чтобы его можно было определить при гибридизации в ДНК в подвергнутой скринингу библиотеке. Способы мечения хорошо известны в науке и включают использование таких

радиометок, как меченый ^{32}P АТФ, биотинилирование или мечение фермента. Условия гибридизации, включая умеренно строгие и очень строгие условия, описаны в Sambrook et al., (см. выше).

Последовательности, идентифицированные в ходе таких способов скрининга библиотек, могут быть сопоставлены и выровнены относительно других известных последовательностей, размещенных и доступных в таких базах данных для общественного доступа, как GenBank, или других частных базах данных последовательностей. Идентичность последовательностей (на уровне аминокислот или нуклеотидов) в пределах определенных участков молекулы или вдоль всей длины последовательности может быть определена с использованием известных науке способов и способов, описанных в данной заявке.

Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую белок, может быть получена путем скрининга выбранной кДНК или геномных библиотек с использованием прогнозируемой аминокислотной последовательности, описанной здесь впервые, и, при необходимости, с использованием стандартных процедур расширения праймера, как это описано в Sambrook et al. (см. выше), для определения предшественников и промежуточных продуктов процессинга мРНК, которая могла быть также обратно транскрибирована в кДНК.

2. Селекция и трансформация клеток-хозяев

Клетки-хозяева трансфицируют или трансформируют описанными здесь векторами

экспрессии или клонирования для получения антител к FcRH5, и культивируют в подходящей питательной среде, модифицированной соответствующим образом для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Условия среды, такие как сама среда, ее температура, pH и т.п. могут быть выбраны специалистом в данной области без неоправданных экспериментов. В целом, принципы, протоколы и практические способы для максимального повышения производительности клеточных культур описаны в Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) и Sambrook et al. (см. выше).

Способы трансфицирования эукариотических клеток и трансформации прокариотических клеток, которые подразумевают введение ДНК в хозяина для возможности репликации такой ДНК в виде экстрахромосомального или хромосомального интеграта, известны специалисту в данной области и включают, например, CaCl_2 , CaPO_4 , липосомально-опосредованная, полиэтиленгликоль/ДМСО и электропорация. В зависимости от используемой клетки-хозяина, трансформация выполняется с использованием стандартных способов, применимых к такой клетке. Воздействие кальция хлоридом предполагает использование кальция хлорида, как это описано в Sambrook et al. (см. выше); для прокариотов обычно используется электропорация. Инфекция *Agrobacterium tumefaciens* используется для трансформации определенных клеток растений, как это описано в Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) и WO 89/05859, опубликованного 29 июня 1989 г. Для клеток млекопитающих без такой клеточной стенки может применяться способ преципитации кальция фосфата по Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Общие аспекты трансфекции клеток-хозяев млекопитающих были описаны в патенте США No. 4399216. Трансформации в клетки дрожжей обычно осуществляются в соответствии со способом Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) и Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Однако могут использоваться и другие способы внедрения ДНК в клетки, например, микроинъекции в ядро, электропорация, слияние протоплазмы бактерий с интактными клетками, или использование поликатионов, например, полибрена, полимиотина.

Информация о различных способах трансформации клеток млекопитающих представлена в Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) и Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах включают прокариотов, дрожжи или клетки высших эукариотов.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Подходящие прокариоты включают, но не ограничиваются, архебактерии и зубактерии, такие как граммотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *E. coli*. Представлены различные штаммы *E. coli*, такие как штамм *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31 446); штамм *E. coli* X1776 (ATCC 31 537); штамм *E. coli* W3110 (ATCC 27 325) и K5 772 (ATCC 53 635). Другие подходящие прокариотические клетки-хозяева включают *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli* такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанный в DD 266710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* и *Streptomyces*. Такие примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Штамм W3110 является одним из преимущественных хозяев или исходным хозяином, поскольку он является штаммом-хозяином, используемым наиболее

часто в ферментации продукции рекомбинации ДНК. Как правило, клетка-хозяин секретирует минимальные количества протеолитических ферментов. Например, штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC No. 27 325) может быть модифицирован для проявления генетической мутации в генах, кодирующих белки эндогенным образом в хозяине, например, *E. coli* W3110 штамм 1A2, имеющий полный генотип *tonA*; *E. coli* W3110 штамм 9E4, имеющий полный генотип *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 штамм 27C7 (ATCC 55 244), имеющий полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) l69 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 37D6, имеющий полный генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) l69 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 штамм 40B4, являющийся штаммом 37D6 с неустойчивой к канамицину мутацией-делецией *degP*; *E. coli* W3110 штамм 33D3 с генотипом W3110 *ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP4l kan^R* (патент США No. 5639635) и *E. coli* штамм с мутантной периплазматической протеазой, описанной в патенте США No. 4946783 от 7 августа 1990 г. Другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31 446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31 537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31 608), также могут использоваться. Такие примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Способы получения производных любого из указанных выше видов бактерий с определенным генотипом известны науке и описаны, например, в Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). В целом необходимо выбрать соответствующий вид бактерий с учетом реплицируемости репликона в клетках бактерий. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* могут использоваться в качестве хозяина при использовании широко известных плазмид pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410 для поставки репликона. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, а в культуру клеток могут быть по желанию введены дополнительные ингибиторы протеазы. С другой стороны, подходят способы клонирования *in vitro*, например, ПЦР или другие полимеразные реакции нуклеиновых кислот.

В бактериях могут быть получены антитела полной длины, фрагменты антител и белки слияния антител, в частности, при отсутствии необходимости в гликозилировании и эффекторной функции Fc, например, когда терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом (например, токсином), и сам по себе иммуноконъюгат оказывается эффективным в деструкции опухолевой клетки. Антитела полной длины имеют более длительный период полужизни в кровотоке. Выработка в *E. coli* является более быстрым и экономичным способом. Информация об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях представлена, например, в патентах США No.5648237 (Carter *et. al.*), 5789199 (Joly *et al.*), и 5840523 (Simmons *et al.*), которые описывают область инициации трансляции (ОИТ) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции (патенты включены в данный документ посредством ссылки). После экспрессии, антитело изолируют из клеточной суспензии *E. coli* в растворимую фракцию, оно может быть очищено с использованием, например, колонки с А или G белком, в зависимости от изоформа. Окончательная очистка может проводиться подобно процессу очистки экспрессируемого антитела, например, в клетках СНО.

6. Эукариотические клетки-хозяева

Кроме прокариот, такие эукариотические микроорганизмы, как гифомицеты или дрожжи, подходят для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело к FcRH5. *Saccharomyces cerevisiae* является наиболее часто используемым низшим

эукариотическим микроорганизмом. Другие микроорганизмы включают *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139383, опубликованный 2 мая 1985 г.); клетки-хозяева *Kluyveromyces* hosts (патент США No. 4943529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)), такие как, например, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24 178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilae* (ATCC 36 906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, опубликованный 31 октября 1990 г.); и гифомицеты, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, опубликованный 10 января 1991 г.), и *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) и *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Метилотрофные дрожжи также подходят для использования и включают, но не ограничиваются, дрожжи, способные расти на метаноле и являющиеся представителями следующих родов: *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Rhodotorula*. Список специфических видов, типичных для данного класса дрожжей, представлен в С. Anthony, The Biochemistry of Methylophils, 269 (1982).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела к FcRH5, получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых, таких как *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*, а также клетки растений, таких как культура клеток хлопка, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, томатов и табака. Были идентифицированы многочисленные штаммы бакуловируса, его варианты и соответствующие подходящие клетки-хозяева насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступен целый ряд вирусных штаммов для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут использоваться в данном изобретении, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Однако интерес к клеткам позвоночных возрастает, и использование клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) становится обычной процедурой. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих представлены следующими: линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональной почки человека (293 клеток субклонированы для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); почки детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и клетки линии гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными здесь векторами экспрессии или

клонирования для получения антител к FcRH5, и культивируют в подходящей питательной среде, модифицированной соответствующим образом для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

3. Селекция и использование реплицируемого вектора

Для рекомбинантного получения антитела по изобретению, нуклеиновую кислоту (например, кДНК или геномную ДНК), кодирующую антитело, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. ДНК, кодирующая антитело, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Представлен целый ряд векторов. Выбор вектора зависит, в частности, от используемой клетки-хозяина. Как правило, предпочтительным является использование клеток прокариотов или эукариотов (обычно млекопитающих).

Вектор может быть представлен, например, в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Подходящая последовательность нуклеиновых кислот может быть вставлена в вектор в ходе различных процедур. В целом, ДНК встраивают в соответствующий сайт(-ты) рестриктазы с использованием известных науке способов.

Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются, одну или несколько сигнальных последовательностей, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансер, промотор и последовательность прекращения транскрипции.

Конструирование подходящих векторов, состоящих из одного или нескольких таких компонентов предусматривает использование стандартных процедур лигирования,

которые известны специалисту в данной области.

FcRH5 может быть получен рекомбинантным образом не только в такой форме, но также и в виде белка слияния с гетерологичным полипептидом, который может быть представлен сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специфический участок рестрикции на N-конце зрелого белка или полипептида. В целом, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или частью ДНК, кодирующей антитело к FcRH5, которую встраивают в вектор. Сигнальная последовательность может быть представлена сигнальной последовательностью прокариотов, выбираемой, например, из группы, включающей щелочную фосфатазу, пенициллиназу, Ipp или лидерную последовательность термостабильного энтеротоксина

II. Для секреции в дрожжах сигнальная последовательность может быть представлена, например, лидерной последовательностью инвертазы дрожжей, лидерной последовательностью фактора альфа (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, последняя из которых описана в патенте США No. 5010182), или лидерной последовательностью щелочной фосфатазы, лидерной

последовательностью глюкоамилазы *C. albicans* (EP 362179, опубликован 4 апреля 1990 г.), или сигнальной последовательностью, описанной в WO 90/13646, опубликованном 15 ноября 1990 г. При экспрессии в клетках млекопитающих, сигнальные последовательности млекопитающих могут использоваться для непосредственной секреции белка, например, сигнальные последовательности из секретируемых полипептидов одного и того же или родственных видов; также могут использоваться секреторные лидерные последовательности вирусов.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты

антитела по изобретению, могут быть получены с использованием стандартных способов рекомбинации. Необходимые полинуклеотидные последовательности могут быть выделены и секвенированы из клеток, вырабатывающих антитело, таких как клетки гибридомы. С другой стороны, полинуклеотиды могут быть синтезированы с

использованием синтезатора нуклеотидов или ПЦР. После получения, последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в вектор рекомбинации, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в клетках прокариотов. Для использования в целях данного изобретения представлен целый ряд векторов, известных науке. Выбор подходящего вектора будет зависеть

преимущественно от размера нуклеиновых кислот, которые необходимо встроить в вектор, и отдельной клетки-хозяина, которая будет трансформирована вектором. Каждый вектор состоит из различных компонентов, в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида, или обе функции) и совместимости с отдельной клеткой-хозяином, в которой он будет располагаться.

В целом, в таких клетках-хозяевах используют плазмидные векторы, состоящие из репликона и контрольных последовательностей, и которые получены от видов, совместимых с клеткой-хозяином. Векторы экспрессии и клонирования состоят из последовательности нуклеиновой кислоты, позволяющей клетке реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах, а также маркерной

последовательности, способной обеспечить фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Такие последовательности присутствуют в целом ряде бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации, полученная из плазмиды pBR322 и содержащая гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), что обеспечивает легкую идентификацию трансформированных

клеток, подходит для большинства грамотрицательных бактерий; точка начала репликации, полученная из плазмиды 2μ, подходит для дрожжей, а точка начала репликации, полученная из различных вирусов (SV40, вирус полиомы, аденовирус, вирус бычьей папилломы или вирус папилломы крупного рогатого скота), подходит для векторов клонирования в клетках млекопитающих. pBR322, ее производные или другие плазмиды микроорганизмов или бактериофагов также могут состоять или быть модифицированными для включения промоторов, которые могут использоваться микроорганизмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии в отдельных антителах, описаны подробно в Carter et al., патенте США No. 5648237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольную последовательность, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут использоваться в качестве трансформирующих векторов в таких хозяевах. Например, такой бактериофаг, как λGEM.TM.-11, может использоваться в получении рекомбинантного вектора, который может применяться для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Вектор экспрессии по изобретению может состоять из двух или более пар промотор-цистрон, каждая из которых кодирует компоненты полипептида. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') по отношению к цистрону и модулирующую экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делят на два класса: индуцируемые и конститутивные. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона под контролем промотора в ответ на изменения условий культуры, например, присутствие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры.

Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых целым рядом потенциальных клеток-хозяев. Выбранный промотор может функционально связываться с цистроном ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестриктазой и введением изолированной последовательности промотора в вектор по изобретению. Для непосредственной амплификации и/или экспрессии определенных генов могут использоваться нативная последовательность промотора и много гетерологичных промоторов. В некоторых вариантах воплощения изобретения используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают большую транскрипцию и более высокий выход экспрессируемого отдельного гена в сравнении с полипептидным промотором с нативной последовательностью.

Хорошо известны промоторы, распознаваемые целым рядом потенциальных клеток-хозяев. Промоторы, подходящие для использования в прокариотических клетках-хозяевах, включают промотор *PhoA*, системы промоторов β -галактамазы и лактозы [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], щелочной фосфатазы, систему промотора триптофана (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776] и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)] или промотор *trc*. Промоторы для использования в бактериальных системах, также будут состоять из последовательности Shine-Dalgarno (S.D.), которая функционально связана с ДНК, кодирующей антитело к FcRH5. Однако подходят и другие промоторы, обладающие функциональностью в клетках бактерий (например, другие известные промоторы фагов или бактерий). Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет специалисту в данной области функционально лигировать их с цистроном, кодирующим определенные легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) с использованием линкеров или адаптеров для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

В одном аспекте изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе состоит из компонента сигнальной последовательности, которая направляет транслокацию экспрессируемых полипептидов вдоль мембраны. В целом, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или частью ДНК отдельного полипептида, которую встраивают в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная в целях данного изобретения, должна быть представлена последовательностью, которая распознается и подвергается процессингу (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не подвергают процессингу сигнальную последовательность, нативную в сравнении с гетерологичными полипептидами, сигнальную последовательность заменяют выбранной прокариотической сигнальной последовательностью, например, из группы, включающей щелочную фосфатазу, пенициллиназу, *Irr* или лидерные последовательности термоустойчивого энтеротоксина II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MBP*. В одном варианте воплощения изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, представлены сигнальными последовательностями STII или их вариантами.

В другом аспекте изобретения получение иммуноглобулинов по изобретению может осуществляться в цитоплазме клеток-хозяев, и, следовательно, не требует присутствия сигнальных последовательностей для секреции в каждом цистроне. В этом отношении в цитоплазме экспрессируются тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, которые затем скручиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов. Определенные клетки-хозяева (например, штаммы *E. coli* *trxB*) характеризуются

определенными условиями цитоплазмы, которые благоприятны для образования дисульфидной связи, что обеспечивает надлежащее скручивание и сборку экспрессируемых белковых субъединиц. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Данное изобретение описывает систему экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессируемых компонентов полипептидов может быть модулировано для максимального повышения выхода секретируемых и собранных надлежащим образом антител по изобретению. Такая модуляция сопровождается, по меньшей мере, частично, одновременной модуляцией силы трансляции компонентов полипептида.

Один из способов для модулирования силы трансляции описан в Simmons et al. и патенте США No. 5840523. Он предполагает использование вариантов области инициации трансляции (ОИТ) в цистроне. Для отдельной ОИТ может быть создана серия последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот с диапазоном значений силы трансляции, что является удобным для коррекции такого фактора относительно желаемого уровня экспрессии отдельной цепи. Варианты ОИТ могут быть созданы с использованием стандартных процедур мутагенеза, которые приводят к изменениям в кодоне с последующим изменением в аминокислотной последовательности, однако предпочтительнее вводить в нуклеотидную последовательность «молчащие» изменения. Изменения в ОИТ могут включать, например, изменения в количестве или расстоянии между последовательностями Шайн-Далгарно (Shine-Dalgarno) наряду с изменениями в сигнальной последовательности. Один из способов для получения мутантной сигнальной последовательности состоит в генерации «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, который не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (т.е. изменения являются «молчащими»). Это может сопровождаться изменениями в позиции третьего нуклеотида в каждом кодоне; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых позиций, что может усложнить генерацию банка. Такой способ мутагенеза подробно описан в Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Предпочтительно, что набор векторов получают в определенном диапазоне значений силы ОИТ для каждого цистрона. Такое ограничение обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход необходимого антитела при различных комбинациях значений силы ОИТ. Значения силы ОИТ могут быть определены путем количественного анализа уровня экспрессии гена-репортера, как это подробно описано в Simmons et al. и патенте США No. 5840523. Основываясь на сравнении значения силы трансляции, для комбинации в векторе экспрессии по изобретению используются необходимые отдельные ОИТ.

6. Эукариотические клетки-хозяева

Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются, одну или несколько сигнальных последовательностей, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансер, промотор и последовательность прекращения транскрипции.

(1) Компонент сигнальная последовательность

Вектор для использования в эукариотических клетках-хозяевах может также состоять из сигнальной последовательности или другого полипептида, имеющего специфический участок рестрикции на N-конце отдельного зрелого белка или полипептида. Выбираемая преимущественным образом гетерологичная сигнальная последовательность представляет собой последовательность, которая распознается и подвергается процессингу (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии в клетке млекопитающего представлены сигнальные последовательности

млекопитающего и секреторные лидерные последовательности вируса, например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса.

ДНК для такого участка предшественника лигируется в рамке считывания к ДНК, кодирующей антитело.

5 (2) Точка начала репликации

Как правило, компонент точки начала репликации для векторов экспрессии у млекопитающих не является необходимым. Например, точка начала репликации происхождения SV40 может обычно использоваться только потому, что она содержит ранний промотор.

10 (3) Компонент селективируемый ген

Векторы экспрессии и клонирования будут в большинстве своем состоять из селективируемого гена, также обозначаемого как селективируемый маркер. Обычные селективируемые гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или
15 тетрациклину; (б) обуславливают дефицит ауксотрофных штаммов; или (в) поставляют критически важные питательные вещества, которые недоступны в сложной среде, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы селекции используется препарат, препятствующий росту клетки-хозяина. Клетки, подвергающиеся успешной трансформации с помощью
20 гетерологичного гена, вырабатывают белок, придающий устойчивость к препарату, что позволяет клеткам выжить. Примеры такой доминантной селекции подразумевают использование препаратов неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин.

Пример подходящего селективируемого маркера для клеток млекопитающих представлен маркером, позволяющим идентифицировать клетки, способные захватывать
25 нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к FcRH5, например, дигидрофолатредуктаза или тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, преимущественно гены металлотионеина животных, аденозиндезамина, орнитиндекарбоксилаза и т.д. Подходящая клетка-хозяин при использовании дигидрофолатредуктазы дикого типа представлена линией клеток СНО с недостаточным количеством
30 дигидрофолатредуктазы (например, ATCC CRL-9096), полученных и размноженных в соответствии с описанием, представленным в Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980). Например, клетки, трансформированные селективируемым геном дигидрофолатредуктазы, впервые были выявлены путем культивации всех трансформантов в питательной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный
35 антагонист дигидрофолатредуктазы. С другой стороны, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, содержащие эндогенную дигидрофолатредуктазу), трансформированные или ко-трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок дигидрофолатредуктазу дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансферазу (APH), могут
40 подвергаться селекции по клеточному росту в среде, содержащей селективируемый агент, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США No. 4965199.

Подходящий селективируемый ген для использования у дрожжей представлен геном *trp1*, присутствующим в плазмиде дрожжей YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979);
45 Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. Ген *trp1* обеспечивает селективируемый маркер для мутантного штамма дрожжей с недостаточной способностью роста в присутствии триптофана, например, ATCC No. 44076 или PER4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

(4) Компонент промотор

Векторы экспрессии и клонирования обычно могут состоять из промотора, который функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к FcRH5 для непосредственного синтеза мРНК. Хорошо известны промоторы, распознаваемые целым рядом потенциальных клеток-хозяев.

Фактически, все гены эукариотов имеют обогащенный АТ-участок, расположенный примерно на 25-30 оснований выше от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность находится на расстоянии от 70 до 80 оснований выше от начала сайта инициации транскрипции многих генов и представлена участком CNCAAT, где N может быть представлен любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства генов эукариот находится последовательность AATAAA, которая может служить сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности вставлены соответствующим образом в векторы экспрессии эукариотов.

Примеры подходящих последовательностей промотора для использования в дрожжевых клетках-хозяинах включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] или другие гликолитические ферменты [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], такие как энлаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триосефосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Другие промоторы дрожжей, являющиеся индуцируемыми промоторами и имеющими дополнительное преимущество в транскрипции, контролируемое условиями роста, представлены участками промотора для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, деструктивных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлоионеинов, глицеральдегида-3-фосфатдегидрогеназы, и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования при экспрессии дрожжей подробно описаны в EP 73 657.

Транскрипция антитела к FcRH5 с использованием векторов в клетках-хозяинах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур (UK 2211504, опубликованный 5 июля 1989 г.), аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), гетерологичными промоторами млекопитающих, например, актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, а также промоторами теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

□ Ранние и поздние промоторы вируса SV40 получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека получают с использованием рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в клетках млекопитающих с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США No. 4419446. Модификация такой системы описана в патенте США No. 4601978. Информация об экспрессии кДНК β-интерферона человека в клетках мыши при контроле промотором тимидинкиназой из вируса простого герпеса представлена также в Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982). С другой стороны, в качестве промотора может использоваться длинный концевой повтор

вируса саркомы Рауса.

(5) Компонент энхансер

Транскрипция ДНК, кодирующей антитело к FcRH5 у высших эукариот, может быть увеличена путем включения последовательности энхансера в вектор. Энхансеры являются цис-активными элементами ДНК, обычно от примерно 10 до 300 пар оснований, которые действуют на промотор для усиления его транскрипции. В настоящее время известно много последовательностей энхансеров из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Как правило, используется энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 в конце точки начала репликации (100-270 пар азотистых оснований), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы в конце точки начала репликации, а также энхансеры аденовируса. Сведения об энхансерах для активации промоторов эукариотов также представлены в Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982). Энхансер может быть сращен с вектором в положении 5' или 3' последовательности, кодирующей антитело к FcRH5, но преимущественно располагается на 5'-конце промотора.

(6) Компонент терминации транскрипции

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или содержащих ядра клеток других многоклеточных организмов), будут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно представлены в виде нетранслируемых участков на 5'- и, в некоторых случаях, 3'-конце ДНК или кДНК эукариотов или вирусов. Такие участки содержат сегменты нуклеотидов, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в участок мРНК, кодирующей антитело к FcRH5. Одним из подходящих компонентов терминации транскрипции служит участок полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. WO94/11026 и представленное здесь описание вектора экспрессии.

Дополнительные способы, векторы и клетки-хозяева, подходящие для адаптации к синтезу антитела к FcRH5 в культуре рекомбинантных клеток млекопитающих описаны, в Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117060; и EP 117058.

4. Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для получения антитела к FcRH5 по данному изобретению, могут быть культивированы на разных средах.

а. Прокариотические клетки-хозяева

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по изобретению, выращивают на средах, известных в науке и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящей среды включают бульон Лурия (БЛ) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах воплощения изобретения среда также содержит селекционный агент, выбираемый на основе конструкции вектора экспрессии, для избирательного роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину, добавляют ампициллин.

Также могут быть внесены любые необходимые дополнительные компоненты, кроме углерода, азота и неорганического фосфата, в соответствующих концентрациях, которые могут вводиться как поодиночке, так и в смеси с другой добавкой или средой, например, сложным источником азота. В некоторых случаях питательная среда может содержать одну или несколько восстановителей, выбираемых из группы, включающей глутатион, цистеин, цистамин, тиогликолат, дитиозэритроитол и дитиотреитол.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящей температуре. Например, для роста *E. coli* предпочтительная температура варьирует от примерно 20°C до примерно 39°C, в частности, от примерно 25°C до примерно 37°C, и даже более специфично, при примерно 30°C. pH среды может иметь любое значение, варьирующее от примерно 5 до примерно 9, в зависимости, преимущественно, от клетки-хозяина. Для *E. coli* значение pH варьирует преимущественно от примерно 6,8 до примерно 7,4, в частности, примерно 7,0.

При использовании в векторе экспрессии индуцируемого промотора, экспрессия белка индуцируется при условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте изобретения для контроля транскрипции полипептидов используются промоторы PhoA. Согласно этому, трансформированные клетки-хозяева культивируют в фосфат-ограниченной среде для индукции. Преимущественно, что фосфат-ограниченная среда представлена средой C.R.A.P (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Может использоваться целый ряд других индукторов в соответствии с используемой моделью вектора, как это известно науке.

В одном варианте воплощения изобретения экспрессируемые полипептиды по данному изобретению секретируются и восстанавливаются из периплазмы клетки-хозяина. Восстановление белка обычно подразумевает разрушение микроорганизма, как правило, посредством осмотического шока, ультразвука или лизиса. После разрушения клеток, клеточные остатки или целые клетки могут быть удалены путем центрифугирования или фильтрации. Белки в дальнейшем могут быть очищены, например, в ходе аффинной хроматографии со смолами. С другой стороны, белки могут быть транспортированы в питательную среду и выделены из нее. Клетки могут быть выделены из культуры, и супернатант культуры может быть подвергнут фильтрации и концентрации для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть в дальнейшем выделены и идентифицированы с использованием известных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг.

В одном аспекте изобретения выработка антитела производится в большом количестве в ходе процесса ферментации. Для получения рекомбинантных белков представлены различные процедуры подпитываемой ферментации в промышленных масштабах. Мощность такой ферментации в промышленном масштабе составляет, по меньшей мере, 1000 литров, преимущественно от примерно 10000 до 100000 литров. Такие ферментаторы содержат мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, в частности, глюкозы (преимущественный источник углерода/энергии). Ферментация в более низких масштабах относится обычно к ферментации в ферментаторе объемной мощностью не более чем примерно 100 литров, которая может варьировать от примерно 1 литра до примерно 100 литров.

В ходе процесса ферментации индукция экспрессии белка обычно инициируется после роста клеток в соответствующих условиях до необходимой плотности клеток, например, клеток OD₅₅₀ до количества примерно 180-220, и на данной стадии клетки находятся в ранней фазе стационарного роста. Может использоваться целый ряд других индукторов в соответствии с используемой моделью вектора, как это известно науке и описано выше. Перед индукцией, клетки могут расти в течение более коротких периодов. Обычно клетки индуцируют в течение примерно 12-50 часов, но могут использоваться и более короткие или более длинные периоды индукции.

Для повышения выработки и количества полипептидов по изобретению, различные условия ферментации могут быть модифицированы. Например, для улучшения

надлежащей сборки и скручивания секретируемых полипептидов антитела, для ко-трансформации прокариотических клеток-хозяев могут использоваться дополнительные векторы, избыточно экспрессирующие белки теплового шока, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил цис, транс-изомеразы с активностью шаперона). Было показано, что белки теплового шока облегчают
 5 надлежащее скручивание и растворимость гетерологичных белков, вырабатываемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США No. 6083715; Georgiou et al., патент США No. 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.*
 10 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Для сведения к минимуму протеолиза экспрессируемых гетерологичных белков (особенно белков, обладающих протеолитической чувствительностью), в данном изобретении могут использоваться определенные штаммы хозяев с недостаточным содержанием протеолитических ферментов. Например, клетки-хозяева могут быть
 15 модифицированы с образованием генной мутации (-й) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеазу III, OmpT, DegP, Tsp, протеазу I, протеазу Mi, протеазу V, протеазу VI и их комбинации. Некоторые штаммы *E. coli*, не содержащие протеазу, получены и описаны, например, в Joly et al. (1998) (см. выше); Georgiou et al., патенте США No. 5264365; Georgiou et al., патенте США No. 5508192; Hara et al., *Microbial*
 20 *Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

В одном варианте воплощения изобретения штаммы *E. coli* с недостаточным содержанием протеолитических ферментов и трансформированные плазмидами, избыточно экспрессирующими один или несколько белков теплового шока, используется в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по изобретению.

25 **б. Эукариотические клетки-хозяева**

Для культивации клеток-хозяев подходят представленные на рынке среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве питательной среды для клеток-хозяев может использоваться любая среда, описанная в Ham et al.,
 30 *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США No. 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США Re. 30985. В любую из таких сред могут быть добавлены, при необходимости, гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как натрия хлорид, кальций, магний и
 35 фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как ГЕНТАМИЦИН™), микроэлементы (определенные как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Также могут быть внесены любые другие необходимые добавки в соответствующих
 40 концентрациях, которые должны быть известны специалисту в данной области. Условия культуры, такие как температура, pH и т.п., такие же, как и условия, используемые для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и должны быть очевидны для специалиста в данной области.

5. Определение амплификации/экспрессии гена

45 Амплификация и/или экспрессия гена может быть определена в образце непосредственным образом, например, путем использования стандартного саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для количественного определения транскрипции мРНК [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализа ДНК),

или путем *in situ* гибридизации с использованием меченого соответствующим образом зонда, основываясь на представленных последовательностях. С другой стороны, могут использоваться антитела, которые распознают специфические дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК, а также гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. В свою очередь, антитела могут быть помечены, а анализ может проводиться при связывании дуплекса с поверхностью, т.е. после образования дуплекса на поверхности может быть определено присутствие антитела, связанного с дуплексом.

С другой стороны, экспрессия гена может быть измерена в ходе иммунологических способов, таких как иммуногистохимическое окрашивание клеток или тканей и анализ клеточной культуры или жидкостей организма для непосредственного количественного определения экспрессии генного продукта. Антитела, которые могут использоваться для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа образцов жидкостей, могут быть моноклональными или поликлональными и полученными у любого животного. В соответствии с этим, могут быть представлены антитела к полипептиду FcRH5 с нативной последовательностью и синтетическому пептиду на основе описанных здесь последовательностей ДНК или к экзогенной последовательности, слитой с ДНК FcRH5 и кодирующей специфическую антигенную детерминанту для антитела.

6. Очистка антител к FcRH5

Формы антитела к FcRH5 могут быть восстановлены из питательной среды или лизатов клеток-хозяев. В случае связывания с мембраной, антитело может быть получено с использованием подходящего раствора детергента (например, Тритон-X 100) или путем ферментативного расщепления. Клетки, задействованные в экспрессии антитела к FcRH5, могут быть разрушены путем различных химических и физических способов, таких как циклы замораживания-оттаивания, воздействие ультразвуком, механическое разрушение или использование препаратов для лизиса клеток.

В некоторых случаях необходима очистка антитела к FcRH5 от рекомбинантных белков или полипептидов клетки. Типичные подходящие процедуры очистки представлены следующими: фракционирование на ионообменной колонке; преципитация в этаноле; ВЭЖХ с обращенными фазами; хроматография на кремниевой колонке или катион-обменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусировка; электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; преципитация в присутствии сульфата аммония; гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75; колонки Sepharose с белком А для удаления примесей, таких как IgG; колонки с хелатообразованием с использованием металлов для связывания форм тэгов антигенной детерминанты антитела к FcRH5. Могут использоваться различные способы очистки белка, и такие способы известны науке и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Выбранные этапы очистки будут зависеть, например, от природы процесса получения антитела, в частности, получения антитела к FcRH5.

При использовании рекомбинантных способов, антитело может быть получено внутри клетки, периплазматическом пространстве или непосредственно в среде. Если антитело получают внутри клетки, в качестве первого этапа удаляются частицы распада клеток-хозяев или лизированных фрагментов, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) описали процедуру изоляции антител, секретированных в периплазматическое пространство *E. coli*. Она состоит в следующем: клеточная суспензия подвергается оттаиванию в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) в течение

примерно 30 минут. Остатки клеток могут быть удалены центрифугированием. При секретиции антитела в среду производят концентрацию супернатанта из таких систем экспрессии с использованием представленного на рынке концентрационного фильтра для белков, например, единицы ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. В любой из последующих этапов для ингибирования протеолиза может быть включен ингибитор протеазы, например, ФМСФ, а для предотвращения роста случайных минорных компонентов могут использоваться антибиотики.

Композиции антитела, полученные из клеток, могут быть очищены с использованием, например, хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является преимущественным способом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от видов и изотипа любого домена Fc иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А может использоваться для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех мышиных изотипов и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, в большинстве случаев представлена агарозой, однако имеются и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистирендивинилбензол, позволяют ускорить скорости потока и сократить время процессинга в сравнении с использованием агарозы. Если антитело включает домен CH_3 , для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Также представлены другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение в этаноле, обращено-фазовая ВЭЖХ, хроматография на кремниевой колонке, хроматография на гепарине, хроматография на сефарозе или анион- или катион-обменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусировка, электрофорез в полиакриламидном геле и осаждение в присутствии сульфата аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любой предварительной очистки, смесь, включающая интересующее антитело и загрязняющие вещества, может быть подвергнута хроматографии, подразумевающей гидрофобное взаимодействие при низком значении pH, с использованием буфера элюирования при pH 2,5-4,5 и низких концентрациях соли (например, 0-0,25 М).

Ж. Фармацевтические композиции

Конъюгаты антитело-препарат (КАП) по изобретению могут быть введены любым путем, подходящим для лечения отдельного состояния. Как правило, КАП будут вводиться парентерально, т.е. путем инфузии, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикочно, интратекально и эпидурально.

Для лечения рака в одном варианте воплощения изобретения конъюгат антитело-препарат вводят путем внутривенной инфузии. Доза, вводимая посредством инфузии, находится в диапазоне от примерно 1 мкг/м^2 до примерно $10\,000 \text{ мкг/м}^2$ на дозу, обычно одна доза в неделю при общем количестве одной, двух, трех или четырех доз. С другой стороны, диапазон доз составляет от примерно 1 мкг/м^2 до примерно 1000 мкг/м^2 , от примерно 1 мкг/м^2 до примерно 800 мкг/м^2 , от примерно 1 мкг/м^2 до примерно 600 мкг/м^2 , от примерно 1 мкг/м^2 до примерно 400 мкг/м^2 , от примерно 10 мкг/м^2 до примерно 500 мкг/м^2 , от примерно 10 мкг/м^2 до примерно 300 мкг/м^2 , от примерно 10 мкг/м^2 до примерно 200 мкг/м^2 , и от примерно 1 мкг/м^2 до примерно 200 мкг/м^2 . Доза

может вводиться один раз в день, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но не менее чем один раз в день, несколько доз в месяц, но не менее чем одна доза в день, несколько раз в месяц, но не менее чем один раз в неделю, несколько раз в месяц или прерывисто для ослабления или снижения симптомов заболевания. Введение может продолжаться в течение любого из описанных интервалов до момента ремиссии опухоли или симптомов лимфомы или лейкоза, подвергнутых лечению. Введение может продолжаться после ремиссии или ослабления симптомов, при этом такая ремиссия или ослабление сохраняются при таком продленном введении.

Изобретение также представляет способ облегчения аутоиммунного заболевания, состоящий в введении пациенту, страдающему от аутоиммунного заболевания, терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-гуманизированное антитело 10A8 по любому из описанных выше варианту воплощения изобретения. В предпочтительных вариантах воплощения изобретения антитело вводится внутривенно или подкожно. Конъюгат антитело-препарат вводится внутривенно в дозе в диапазоне от примерно 1 мкг/м² до примерно 100 мкг/м² на дозу, а в специфическом варианте воплощения изобретения доза составляет от примерно 1 мкг/м² до примерно 500 мкг/м². Доза может вводиться один раз в день, один раз в неделю, несколько раз в неделю, но не менее чем один раз в день, несколько доз в месяц, но не менее чем одна доза в день, несколько раз в месяц, но не менее чем один раз в неделю, несколько раз в месяц или прерывисто для ослабления или снижения симптомов заболевания. Введение может продолжаться в течение любого из описанных интервалов до момента выздоровления или ослабления симптомов подвергнутого лечению аутоиммунного заболевания.

Введение может продолжаться после выздоровления или ослабления симптомов, при этом такое выздоровление или ослабление сохраняются при таком продленном введении.

Изобретение также описывает способ лечения В-клеточного нарушения, состоящий в введении пациенту, страдающему от В-клеточного нарушения, такого как нарушение пролиферации В-клеток (включая, не ограничиваясь, лимфому и лейкоз) или аутоиммунное заболевание, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела 10A8 по любому из описанных здесь варианту воплощения изобретения, при этом такое антитело не конъюгировано с цитотоксической молекулой или определяемой молекулой. Как правило, антитело будет вводиться в дозе от примерно 1 мкг/м² до примерно 1000 мг/м².

В одном аспекте изобретение дополнительно описывает фармацевтические композиции, состоящие по меньшей мере из одного антитела к FcRH5 по изобретению и/или, по меньшей мере одного иммуноконъюгата антитела и/или по меньшей мере одного конъюгата препарат-антитело к FcRH5 по изобретению. В некоторых вариантах воплощения изобретения фармацевтическая композиция состоит из (1) антитела по изобретению и/или его иммуноконъюгата, и (2) фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах воплощения изобретения фармацевтическая композиция состоит из (1) антитела по изобретению и/или его иммуноконъюгата, и (2) по меньшей мере, одного терапевтического агента. Дополнительные терапевтические агенты включают, но не ограничиваются, терапевтические агенты, представленные ниже. Как правило, КАП будут вводиться парентерально, т.е. путем инфузии, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, интратекально и эпидурально.

Терапевтические композиции (например, состоящие из антитела к FcRH5 или иммуноконъюгата FcRH5), используемые в соответствии с данным изобретением, получают для хранения путем смешивания активного действующего вещества (например,

антитела или иммуноконъюгата), обладающего необходимой степенью чистоты, с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы представлены нетоксичными для реципиента при используемых дозах и концентрациях и включают следующие: буферы, такие как ацетат, Трис, фосфатные, цитратные и буферы других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; м-крезол); полипептид с низким молекулярным весом (менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатные вещества, такие как ЭДТА; тонификаторы, такие как трегалоза и натрия хлорид; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; сурфактанты, такие как полисорбат; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлом (*например*, комплексы Zn-белок); и/или неинициальные сурфактанты, такие как ТВИН®, ПЛУРОНИКС® или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых случаях композиция предпочтительным образом состоит из фармацевтически приемлемой соли, преимущественно натрия хлорида, находящейся преимущественно в физиологических концентрациях. В некоторых случаях композиции по изобретению могут состоять из фармацевтически приемлемого консерванта. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация консерванта варьирует от 0,1 до 2,0%, как правило, в/в. Подходящие консерванты представлены консервантами, хорошо известными в фармации. Преимущественными консервантами являются бензиловый спирт, фенол, м-крезол, метилпарабен и пропилпарабен. В некоторых случаях композиции по изобретению могут включать фармацевтически приемлемый сурфактант в концентрации от 0,005 до 0,02%.

Фармацевтические композиции, используемые для *in vivo* введения, обычно стерильные. Это сопровождается фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

Композиции изобретения также могут содержать более одного активного действующего вещества, если это необходимо для отдельного показания, подвергнутого лечению, например, такие вещества могут обладать комплементарной активностью, не оказывая отрицательного влияния друг на друга. Например, кроме антитела к FcRH5, может быть необходимым включение в одну композицию дополнительного антитела, например, другого антитела к FcRH5, которое связывается с другой антигенной детерминантой на полипептиде FcRH5, или антитела к такой же самой мишени, например, фактора роста, который влияет на рост отдельного типа рака. С другой стороны или кроме того, композиция может дополнительно включать химиотерапевтический агент, цитотоксический агент, цитокин, препарат-ингибитор роста, противогормональный препарат и/или кардиопротектор. Такие молекулы представлены удобным образом в комбинации и количествах, эффективных для отдельной цели.

Активное действующее вещество также может быть заключено в микрокапсулы, например, путем коацервации или межфазной полимеризации, например, с помощью

гидроксиметилцеллюлозы; микрокапсулы из желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата, соответственно, представлены в виде коллоидных систем доставки препарата (например, в липосомах, белковых микросферах, микроэмульсиях, нано-частицах и нано-капсулах) или в виде макроэмульсий. Такие способы описаны в

5 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть представлены и препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, при этом матрицы представлены в форме твердых частиц, т.е. пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт)), полиактиды (патент США No. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, не поддающийся разрушению этиленвинилацетат, поддающийся разрушению сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, такой как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, включающие сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, а также лейпролида ацетат), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты позволяют высвобождаться молекулам в течение более 100 дней, определенные гидрогели обеспечивают высвобождение в течение более коротких периодов времени. При нахождении инкапсулированных иммуноглобулинов в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или образовывать агрегаты в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от используемого механизма. Например, в случае обнаружения, что механизм агрегации представлен образованием S-S связи между молекулами посредством тио-дисульфидного взаимодействия, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из растворов кислот, контроля содержания влаги, путем использования подходящих вспомогательных веществ, а также разработки специфических композиций, содержащих полимерные матрицы.

Антитело может быть разработано таким образом, чтобы иметь подходящую форму для доставки в клетку-/ткань-мишень. Например, антитела могут быть представлены в виде иммунолипосом. «Липосома» представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или сурфактанта, и может использоваться для доставки препарата в организме млекопитающего. Компоненты липосомы обычно размещаются в виде двух слоев, подобно размещению липидов в биологической мембране. Липосомы, содержащие антитела по изобретению, получают с использованием способов, известных науке и описанных, например, в Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); и патентах США No. 4485045 и 4544545; и WO97/38731, опубликованного 23 октября 1997 г. Липосомы с увеличенным временем циркулирования описаны в патенте США No. 5013556.

Отдельные подходящие липосомы могут быть получены путем обращенно-фазового выпаривания липидной композиции, включающей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-производное фосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ФЭ). Липосомы экстрадируются через фильтры с определенным размером пор с получением липосом необходимого диаметра. Fab' фрагменты антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как это описано Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 257:286-288

(1982), посредством реакции обмена с участием дисульфида. В липосоме в некоторых случаях может содержаться химиотерапевтический препарат. См. Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

Композиции, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильные. Это сопровождается фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

3. Лечение с использованием антител к FcRH5

Для определения экспрессии FcRH5 при раке имеется целый ряд различных способов анализа. В одном варианте воплощения изобретения гиперэкспрессия FcRH5 может анализироваться с использованием иммуногистохимии (ИГХ). Погруженные в парафин фрагменты ткани, полученные в ходе биопсии опухоли, могут быть подвергнуты ИГХ анализу с использованием следующих критериев интенсивности окрашивания белка FcRH5:

Балл 0 - окрашивание отсутствует, или окрашивание мембраны отмечается в менее чем 10% клеток опухоли.

Балл 1+ - слабое/едва заметное окрашивание мембраны определяется для более чем 10% клеток опухоли. Мембрана клеток окрашена только частично.

Балл 2+ - слабое/умеренное окрашивание мембраны определяется для более чем 10% клеток опухоли.

Балл 3+ - умеренное/сильное окрашивание мембраны определяется для более чем 10% клеток опухоли.

Опухоли с баллом экспрессии полипептида FcRH5 0 или 1+ могут характеризоваться как не экспрессирующие FcRH5 в избыточном количестве, в то время как опухоли с баллом 2+ или 3+ могут характеризоваться как экспрессирующие FcRH5 в избыточном количестве.

С другой стороны или кроме того, на фиксированных в формалине и погруженных в парафин образцах опухолевой ткани могут проводиться FISH-анализы, такие как INFORM® (предоставлен Ventana, Arizona) или PATHVISION® (Vysis, Illinois), для определения степени (при возможности) гиперэкспрессии FcRH5 в опухоли.

Гиперэкспрессия или амплификация FcRH5 может быть оценена с использованием анализа определения *in vivo*, например, путем введения молекулы (такой как антитело), связывающейся с молекулой, которую необходимо определить, и образующей тэг с определяемой меткой (например, радиоактивным изотопом или флуоресцентной меткой) с этой второй молекулой, затем пациент подвергается наружному сканированию для локализации метки.

Как это описано выше, антитела к FcRH5 по изобретению имеют целый ряд различных не терапевтических применений. Антитела к FcRH5 по данному изобретению могут использоваться для определения стадии рака при экспрессии полипептида FcRH5 (например, в ходе рентгенографии). Антитела также могут использоваться для очистки или иммунопреципитации полипептида FcRH5 из клеток, для выявления и количественного определения полипептида FcRH5 *in vitro*, например, в ходе ИФА, вестерн-блоттинга, для гибели и элиминации клеток, экспрессирующих FcRH5, из популяции смешанных клеток в качестве этапа очистки других клеток.

В настоящее время, в зависимости от стадии рака, лечение рака предполагает использование одной или комбинации следующих терапий: хирургическое лечение для удаления раковой ткани, лучевая терапия и химиотерапия. Терапия с использованием антитела к FcRH5 может быть особенно подходящей у пациентов пожилого возраста, которые плохо переносят токсичность и побочные эффекты химиотерапии, а также при метастатическом заболевании, когда польза от лучевой терапии ограничена.

Нацеленные на опухоль антитела к FcRH5 по изобретению могут использоваться для снижения симптомов рака при экспрессии FcRH5 после первичной диагностики заболевания или во время рецидива. В терапевтических целях антитело к FcRH5 может использоваться в качестве монотерапии или комбинированной терапии с, например, гормонами, ингибиторами ангиогенеза или радиомечеными соединениями, или вместе с хирургическим вмешательством, криотерапией и/или лучевой терапией. Лечение антителом к FcRH5 может проводиться в комбинации с другими формами стандартной терапии последовательно, до или после использования стандартной терапии. В лечении рака, в частности, пациентов с хорошей степенью риска, используются такие препараты химиотерапии, как ТАКСОТЕР® (доцетаксел), ТАКСОЛ® (паклитаксел), эстрамустин и митоксантрон. В данном способе по изобретению для лечения или облегчения симптомов рака пациенту, страдающему раком, может вводиться антитело к FcRH5 в сочетании с предшествующей терапией одним или несколькими химиотерапевтическими препаратами. В частности, предусматривается комбинированная терапия паклитакселем или его модифицированными производными (см., например, EP0600517). Антитело к FcRH5 будет вводиться вместе с терапевтически эффективной дозой химиотерапевтического препарата. В другом варианте воплощения изобретения антитело к FcRH5 вводят в сочетании с химиотерапией для усиления активности и эффективности химиотерапевтического препарата, например, паклитакселя. Physicians' Desk Reference (PDR) описывает дозы таких препаратов, которые использовались в лечении различных видов рака. Режим приема дозы и дозы представленных выше химиотерапевтических препаратов, которые являются терапевтически эффективными, будут зависеть от отдельного вида рака, подвергаемого лечению, степени прогрессирования заболевания и других факторов, известных доктору в данной области, которые он сможет определить.

В одном отдельном варианте воплощения изобретения пациенту вводится конъюгат, состоящий из антитела к FcRH5, конъюгированного с цитотоксическим агентом. Преимущественным образом, иммуноконъюгат, связанный с белком FcRH5, интернализован клеткой, что приводит к повышению терапевтической эффективности иммуноконъюгата относительно гибели раковой клетки, с которой он связывается. В преимущественном варианте воплощения изобретения цитотоксический агент поражает или взаимодействует с нуклеиновой кислотой в раковой клетке. Примеры таких цитотоксических агентов представлены выше и включают майтансиноиды, калихимицины, рибонуклазы и ДНК-эндонуклеазы.

Терапевтические агенты по данному изобретению (например, антитела к FcRH5 или конъюгаты таких антител с токсинами) вводят пациенту-человеку в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например, болюсное или продолжительная инфузия в течение определенного периода времени, внутримышечное, интраперитонеальное, интрацереброспинальное, подкожное, внутрисуставное, интрасиновиальное, интратекальное, пероральное, местное или ингаляция. Внутривенное или подкожное введение терапевтического агента является предпочтительным.

В целях лечения может использоваться и стратегия *ex vivo*. Стратегии *ex vivo* предусматривают использование трансфицированных клеток или клеток, подвергнутых трансдукции, полученных у субъекта, содержащего полинуклеотид, кодирующий антагонист FcRH5. Трансфицированные клетки или клетки, подвергнутые трансдукции, затем вводят обратно субъекту. Клетки могут быть представлены любыми клетками из широкого диапазона типов, включая, не ограничиваясь, гематопоетические клетки (например, клетки костного мозга, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, Т-клетки

или В-клетки), фибробласты, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты или мышечные клетки.

Например, если антагонист FcRH5 представлен антителом или иммуноконъюгатом, антагонист вводят любым удобным способом, включая парентеральный, подкожный, интраперитонеальный, интрапульмонарный и интраназальный, и, если это необходимо для местного иммуносупрессирующего лечения, введение внутрь поражения.

Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Кроме того, антагонисты вводят путем пульсирующей инфузионной терапии, в частности, со снижением доз антитела. Доза принимается преимущественным образом в виде инъекций, наиболее предпочтительно в виде внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от кратковременного или хронического введения.

В другом примере соединение-антагонист FcRH5 вводят местно, например, путем прямых инъекций, если это позволяет состояние расстройства или расположение опухоли, при этом такие инъекции могут периодически повторяться. Антагонист FcRH5 может также доставляться субъекту систематически или непосредственно в опухолевые клетки, например, в опухоль или ложе опухоли после хирургического иссечения опухоли для предотвращения или снижения локального рецидива или метастазов.

Введение терапевтических агентов в комбинации обычно проводится в течение определенного периода времени (обычно минут, часов, дней или недель, в зависимости от выбранной комбинации). Комбинированная терапия предназначена для введения таких терапевтических агентов последовательным образом, при этом каждый терапевтический агент вводят в различное время, и введение таких терапевтических агентов, или, по меньшей мере, двух терапевтических агентов, производят одновременно.

Терапевтический агент может быть введен одним и тем же путем или разными путями. Например, антитело к FcRH или иммуноконъюгат из комбинации могут быть введены путем внутривенной инъекции, в то время как химиотерапевтический препарат из комбинации может быть введен перорально. С другой стороны, например, оба терапевтических агента могут быть введены перорально, или оба терапевтических агента могут быть введены путем внутривенной инъекции, в зависимости от отдельного терапевтического агента. Последовательность, в ходе которой вводят терапевтические агенты, также отличается в зависимости от отдельных агентов.

В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, начальная кандидатная доза для введения пациенту каждого терапевтического агента составляет от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг, при этом агенты могут вводиться в ходе одной или отдельных процедур введения, или путем непрерывной инфузии. Обычная суточная доза может варьировать от примерно 1 мкг/кг до примерно 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжается до тех пор, пока рак не будет вылечен, что измеряется с использованием описанных выше способов. Однако могут использоваться и другие режимы приема доз.

Данное изобретение предусматривает введение антитела к FcRH5 в ходе генной терапии. См., например, WO96/07321, опубликованный 14 марта 1996 г. и описывающий использование генной терапии для генерации внутриклеточных антител.

Другие режимы лечения могут быть скомбинированы с введением антитела к FcRH5. Комбинированное введение включает со-введение с использованием отдельных композиций или одной фармацевтической композиции, а также последовательное введение в любом порядке, при этом указывается период времени, в течение которого

оба (или все) активных действующих вещества проявляют свою биологическую активность. Такая комбинированная терапия преимущественно приводит к синергичному терапевтическому эффекту.

Также может быть необходимым комбинация введения антитела к FcRH5 или антител с введением антитела, направленного против другого опухолевого антигена, ассоциированного с отдельным видом рака.

В другом варианте воплощения изобретения способы лечения по данному изобретению включают комбинированное введение антитела к FcRH5 (или антител), и одного или нескольких препаратов химиотерапии или препаратов-ингибиторов роста, включая со-введение коктейлей различных препаратов химиотерапии, или других цитотоксических агентов, или других терапевтических агентов, которые также ингибируют рост опухоли. Препараты химиотерапии включают следующие: эстрамустина фосфат, преднимустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамид, гидроксимочевина и таксаны гидроксимочевины (такие как паклитаксел и доцетаксел) и/или антибиотики антрациклинового ряда. Графики получения и режима приема доз таких химиотерапевтических препаратов могут использоваться в соответствии с инструкциями производителя или как это определено эмпирическим образом специалистом в данной области. Получение и графики приема доз для подобной химиотерапии также описаны в *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*. Антитело может быть скомбинировано с антигормональным соединением, например, антиэстрогенным соединением, таким как тамоксифен, антипрогестеронным соединением, таким как онапристон (см. EP 616 812), или антиандрогенным соединением, таким как флутамид, в дозах, установленных для таких соединений. Если раковое заболевание, которое подлежит лечению, представлено андроген-независимым раком, пациент предварительно может быть подвергнут антиандрогенной терапии, а затем, после того, как рак перешел в андроген-независимую форму, пациенту может вводиться антитело к FcRH5 (и в некоторых случаях другие описанные здесь агенты).

Иногда может быть преимущественным совместное введение пациенту кардиопротектора (для предотвращения или снижения дисфункции миокарда, вызванной терапией) или одного или нескольких цитокинов. Кроме указанных выше режимов лечения пациент также может быть подвергнут хирургическому удалению раковых клеток и/или лучевой терапии (например, внешним облучением или терапией с использованием радиоактивно меченого агента, например, антитела) до, одновременно или после лечения антителом. Подходящие дозы для любого из вводимых совместно агентов представлены дозами, используемыми в настоящее время, и такие дозы могут быть снижены по причине комбинированного действия (синергии) агента и антитела к FcRH5.

Композиция антитела по изобретению будет разработана, дозирована и введена в соответствии с надлежащей клинической практикой. Факторы, которые необходимо учитывать в данном контексте, включают отдельное и подвергнутое лечению нарушение, отдельное и подвергнутое лечению заболевание, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место введения агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные специалисту в данной области. Антитело необязательно, но в некоторых случаях может содержать один или более агентов, используемых в настоящее время для профилактики или лечения отдельного нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антител по изобретению, присутствующих в композиции, типу подвергаемого лечению расстройства и других

указанных выше факторов. Такие агенты обычно применяют в таких же самых дозах и вводят таким же самым путем, которые указаны выше, или от примерно 1 до 99% от используемых здесь значений дозы.

Для профилактики или лечения заболевания доза и путь введения будут выбираться доктором на основе известных критериев. Соответствующая доза антитела будет зависеть от типа подвергаемого лечению заболевания, как это определено выше, тяжести и хода течения заболевания, независимо от того, вводится антитело в целях профилактики или лечения, проводимой ранее терапии, истории болезни пациента и ответа на введение антитела, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело вводят соответствующим образом пациенту в одно время или в виде серии процедур. Преимущественным образом, антитело вводят путем внутривенной инфузии или подкожными инъекциями. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, начальная кандидатная доза антитела для введения пациенту может составлять от примерно 1 мкг/кг до 50 мг/кг массы тела (например, от примерно 0,1 до 15 мг/кг массы тела/доза), при этом антитело может вводиться в ходе одной или отдельных процедур введения, или путем непрерывной инфузии. Режим приема доз может включать введение начальной нагрузочной дозы антитела к FcRH5, составляющей примерно 4 мг/кг, затем еженедельного введения поддерживающей дозы в размере примерно 2 мг/кг. Однако могут использоваться и другие режимы приема доз. Обычная суточная доза может варьировать от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают проводить до достижения необходимой супрессии или снижения симптомов заболевания. Прогресс такого лечения может быть легко подвержен мониторингу с использованием стандартных способов и анализов, и основан на критериях, известных доктору или другим специалистам в данной области.

Помимо введения белка антитела пациенту, данное изобретение предусматривает введение антитела в ходе генной терапии. Такое введение нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, выражается как «введение терапевтически эффективного количества антитела». См., например, WO96/07321, опубликованный 14 марта 1996 г. и описывающий использование генной терапии для генерации внутриклеточных антител.

Кроме того, существует два основных подхода в получении нуклеиновой кислоты (содержащей в некоторых случаях вектор) в клетки пациента: *in vivo* и *ex vivo*. Для способа *in vivo* нуклеиновая кислота вводится непосредственно пациенту, обычно в месте организма, где необходимо действие антитела. Для способа *ex vivo* клетки пациента изолируют, в них вводят нуклеиновую кислоту, и модифицированные клетки вводят пациенту непосредственным образом или, например, в инкапсулированном виде с поровыми мембранами, которые затем имплантируют пациенту (см., например, патенты США No. 4892538 и 5283187). Существует целый ряд способов для введения нуклеиновых кислот в жизнеспособные клетки. Способы различаются в зависимости от переноса нуклеиновой кислоты в культивируемые клетки *in vitro*, или *in vivo* в клетки предполагаемого хозяина. Способы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*, включают использование липосом, электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, использование DEAE-декстрана, преципитации кальция фосфата и т.д. Используемый обычно вектор для *ex vivo* поставки гена представлен вектором ретровируса.

Предпочитаемые в настоящее время способы переноса нуклеиновой кислоты *in vivo* включают трансфекцию векторами вирусов (таких как аденовируса, вируса простого герпеса I, аденоассоциированного вируса) и использование липидных систем (таких

липидов для липид-опосредованного трансфера гена, как, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). Обзор известных в настоящее время протоколов маркирования генов и генной терапии представлен в Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992). См. также WO 93/25673 и приведенные здесь ссылки.

5 Антитела к FcRH5 по изобретению могут быть представлены в различных формах, указанных здесь под общим названием «антитело». Таким образом, антитела включают антитела полной длины или интактные антитела, фрагменты антител, антитело с
10 нативной последовательностью или аминокислотные варианты, гуманизированные, химерные антитела или антитела слияния, иммуноконъюгаты и их функциональные фрагменты. В антителах слияния последовательность аминокислот слита с последовательностью гетерологичного полипептида. Антитела могут быть модифицированы в участке Fc для обеспечения необходимых эффекторных функций. Как уже более подробно указывалось в данной главе, в соответствующих участках Fc антитела, связанное на поверхности клеток, может индуцировать цитотоксичность,
15 например, посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или путем задействования комплемента в комплемент-зависимой цитотоксичности, или посредством какого-либо другого механизма. С другой стороны, если необходимо элиминировать или снизить эффекторную функцию для сведения к минимуму побочных эффектов или осложнений лечения, могут использоваться другие определенные
20 фрагменты Fc.

В одном варианте воплощения изобретения антитело конкурирует за связывание или связывается значительным образом с одной и той же антигенной детерминантой, что и антитела по изобретению. Антитела, обладающие биологическими характеристиками данных антител к FcRH5 по изобретению, также рассматриваются,
25 в частности, включая поражение опухоли *in vivo* и ингибирование пролиферации любых клеток, или цитотоксические характеристики.

Способы получения представленных выше антител подробно описаны в данной заявке.

Представленные антитела к FcRH5 используются в лечении рака с экспрессией FcRH5
30 или ослаблении одного или нескольких симптомов рака у млекопитающих. Такие раковые заболевания включают, но не ограничиваются, гематобласты или рак крови, например, лимфому, лейкоз, миеломы или лимфоидные злокачественные новообразования, а также рак селезенки и рак лимфатических узлов. Наиболее специфические примеры рака, вызванного В-клетками, включают В-клеточный рак,
35 включая, например, лимфомы высокой, средней и низкой степени злокачественности (включая В-клеточные лимфомы, такие как, например, В-клеточная лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек и неходжкинская лимфома (НХЛ), лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома Беркитта, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, диффузная крупноклеточная лимфома,
40 фолликулярная лимфома и лимфома Ходжкина, а также Т-клеточные лимфомы) и лейкозы (включая вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), такой как В-клеточный лейкоз (CD5+ В-лимфоциты), миелолейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоидный лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и миелодисплазию), и другие гематологические
45 и/или В- или Т-клеточные виды рака. Раковые заболевания также включают метастатические раковые заболевания всех вышеперечисленных заболеваний. Антитело способно связываться по меньшей мере, с частью раковых клеток, экспрессирующих полипептид FcRH5 у млекопитающих. В преимущественном варианте воплощения

изобретения антитело эффективно в уничтожении или гибели опухолевых клеток, экспрессирующих FcRH5, или ингибирует рост таких опухолевых клеток в условиях *in vitro* или *in vivo* при связывании с полипептидом FcRH5 на поверхности клетки. Такое антитело включает несвязанное антитело к FcRH5 (не конъюгированное ни с одним агентом). Несвязанные антитела, обладающие цитотоксическими или ингибирующими рост клеток свойствами, могут быть в дальнейшем соединены с цитотоксическим агентом для придания им большей силы в разрушении опухолевых клеток. Антителу к FcRH5 могут быть приданы цитотоксические свойства, например, путем конъюгации антитела с цитотоксическим агентом, с образованием иммуноконъюгата, как это описано в тексте данной заявки. Цитотоксический агент или препарат-ингибитор роста представлен преимущественно небольшой молекулой. Предпочтительным является использование токсинов, таких как калихимицин или майтансиноид и их аналоги или производные.

Изобретение описывает композицию, состоящую из антитела к FcRH5 по изобретению и носителя. Для лечения рака композиции могут быть введены пациенту, нуждающемуся в таком лечении, при этом композиция может состоять из одного или нескольких антител к FcRH5, присутствующих в виде иммуноконъюгата или несвязанного антитела. В дополнительном варианте воплощения изобретения композиция может состоять из таких антител в комбинации с другими терапевтическими агентами, такими как цитотоксические агенты или препараты-ингибиторы роста, включая препараты химиотерапии. Изобретение также описывает композиции, состоящие из антитела к FcRH5 по изобретению и носителя. В одном варианте воплощения изобретения представлена терапевтическая композиция, состоящая из фармацевтически приемлемого носителя.

Другой аспект изобретения представляет собой изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела к FcRH5. Аспект охватывает нуклеиновые кислоты, кодирующие Н и L цепи и особенно остатки гипервариабельных участков, цепи, кодирующие нативные последовательности антитела, а также варианты, модификации и гуманизированные версии антитела.

Изобретение также описывает способы, используемые для лечения рака с экспрессией полипептида FcRH5 или ослабления одного или нескольких симптомов рака у млекопитающего, и такой способ состоит из введения терапевтически эффективного количества антитела к FcRH5 млекопитающему. Терапевтические композиции антитела могут вводиться кратковременно (остро) или хронически, или прерывистым образом согласно указанию доктора. Кроме того, представлены способы ингибирования роста и гибели клеток, экспрессирующих полипептид FcRH5.

Изобретение также описывает наборы и готовые изделия, состоящие как минимум из одного антитела к FcRH5. Наборы, содержащие антитела к FcRH5, используются, например, в анализах гибели клеток, экспрессирующих FcRH5, для очистки или иммунопреципитации полипептида FcRH5 из клеток. Например, для изоляции и очистки FcRH5 набор может состоять из антитела к FcRH5, соединенного с гранулами (например, гранулами сефарозы). Могут быть представлены наборы, содержащие антитела для идентификации и количественного определения FcRH5 *in vitro*, например, в ходе ИФА или вестерн-блоттинга. Такое антитело для определения может содержать метку, например, флуоресцирующую или радиометку.

И. Лечение с использованием конъюгатов антитело-препарат

Предусматривается, что конъюгаты антитело-препарат (КАП) данного изобретения могут использоваться для лечения различных заболеваний или нарушений, например,

характеризующихся гиперэкспрессией опухолевого антигена. Типичные состояния или состояние гиперпролиферации включают злокачественные или доброкачественные опухоли, лейкозы и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие включают нейронные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические, glandулярные, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластоцелльные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, включая аутоиммунные, расстройства.

Соединения КАП, которые идентифицированы в животных моделях и клеточных анализах, могут быть дополнительно тестированы на опухолях высших приматов и в ходе клинических исследований на человеке. Клинические исследования на человеке могут быть разработаны для исследования эффективности моноклонального антитела к FcRH5 или иммуноконъюгата по изобретению у пациентов, имеющих нарушения пролиферации В-клеток, выбираемых из следующего: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны. Клиническое исследование может быть разработано для оценки эффективности КАП в сочетаниях с известными терапевтическими режимами, например, лучевой и/или радиотерапией, подразумевающими применение известных химиотерапевтических и/или цитотоксических агентов.

Как правило, заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представлено лимфопролиферативным заболеванием, таким как пролиферативное заболевание В-клеток и/или В-клеточным раком. Примеры раковых заболеваний, подвергаемых лечению в контексте данного изобретения, включают, но не ограничиваются, следующие: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

Рак может включать клетки, экспрессирующие FcRH5, т.е. КАП данного изобретения способен связываться с раковыми клетками. Для определения экспрессии FcRH5 при раке имеется целый ряд различных диагностических/прогностических анализов. В одном варианте воплощения изобретения FcRH5 может анализироваться с использованием иммуногистохимии (ИГХ). ИГХ анализу могут быть подвергнуты образцы ткани из кожной биопсии, погруженные в парафин, с последующим окрашиванием с соблюдением критериев относительно интенсивности окрашивания белка FcRH5 в части исследуемых клеток опухоли.

В целях профилактики или лечения заболевания соответствующая доза КАП будет зависеть от типа подвергаемого лечению заболевания, как это определено выше, тяжести и хода течения заболевания, независимо от того, вводится антитело в целях профилактики или лечения, проводимой ранее терапии, истории болезни пациента и ответа на введение антитела, а также на усмотрение лечащего врача. Молекулу вводят соответствующим образом пациенту в одно время или в виде серии процедур. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, начальная кандидатная доза молекулы для введения пациенту составляет от примерно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (т.е. 0,1-20 мг/кг) молекулы, при этом агенты могут вводиться в ходе одной или отдельных процедур введения, или путем непрерывной инфузии. Обычная суточная доза может

варьировать от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Типичная доза КАП, которую вводят пациенту, представлена диапазоном от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг веса пациента.

Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают проводить до достижения необходимой супрессии или снижения симптомов заболевания. Типичный режим приема доз может включать введение начальной нагрузочной дозы, составляющей примерно 4 мг/кг, затем еженедельного введения поддерживающей дозы антитела к ErbB2 в размере примерно 2 мг/кг. Однако могут использоваться и другие режимы приема доз. Прогресс в такой терапии может быть с легкостью подвергнут мониторингу с использованием стандартных способов и анализов.

К. Комбинированная терапия

Конъюгат антитело-препарат (КАП) по изобретению может быть комбинирован в фармацевтическую композицию или приниматься в виде комбинированной терапии с другим соединением, обладающим противораковыми свойствами. Второе соединение фармацевтической композиции или режима приема преимущественным образом обладает комплементарной активностью к КАП комбинации, т.о., они не оказывают друг на друга нежелательного воздействия.

Второе соединение может быть представлено химиотерапевтическим агентом, цитотоксическим агентом, цитокином, препаратом-ингибитором роста, противогормональным препаратом и/или кардиопротектором. Такие молекулы представлены удобным образом в комбинации и количествах, эффективных для отдельной цели. Фармацевтическая композиция, содержащая КАП по изобретению, также может содержать терапевтически эффективное количество химиотерапевтического препарата, такого как ингибитор образования тубулина, ингибитор топоизомеразы агент для связывания ДНК.

В одном аспекте изобретения первое соединение представлено КАП к FcRH5 по изобретению, и второе соединение представлено антителом к CD20 (несвязанным антителом или КАП). В одном варианте воплощения изобретения второе соединение представлено антителом к CD20 ритуксимабом (Ритуксан®) или 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Другие антитела, которые могут использоваться для комбинированной иммунотерапии с КАП к FcRH5, включают, не ограничиваясь, антитело к VEGF (например, Авастин®).

Другие режимы лечения могут быть скомбинированы с введением противоракового препарата, идентифицированного в соответствии с данным изобретением, включая, не ограничиваясь, лучевую терапию и/или трансплантаты костного мозга и периферической крови, и/или цитотоксический агент, препарат химиотерапии или препарат-ингибитор роста. В одном из таких вариантов воплощения изобретения химиотерапевтический агент представлен агентом или комбинацией агентов, таких как, например, циклофосфамид, гидроксидаунорубин, адриамицин, доксорубин, винкристин (Онковин™), преднизолон, CNOP, CVR или COP, или иммунотерапевтическим препаратом, таким как антитело к CD20 (например, Ритуксан®) или антитело к VEGF (например, Авастин®).

Комбинированная терапия может вводиться одновременным или последовательным образом. При последовательном введении, комбинация может вводиться за два и более введений. Комбинированное введение включает со-введение с использованием отдельных композиций или одной фармацевтической композиции, а также последовательное введение в любом порядке, при этом указывается период времени, в течение которого

оба (или все) активных действующих вещества проявляют свою биологическую активность.

В одном варианте воплощения изобретения лечение КАП предполагает комбинированное введение описанного здесь противоракового препарата и одного или более химиотерапевтических агентов или препаратов-ингибиторов роста, включая со-введение коктейлей различных химиотерапевтических препаратов.

Химиотерапевтические препараты включают таксаны (такие как паклитаксел и доцетаксел) и/или антибиотики антрациклинового ряда. Графики получения и режима приема доз таких химиотерапевтических препаратов могут использоваться в соответствии с инструкциями производителя или как это определено эмпирическим образом специалистом в данной области. Получение и графики приема доз для подобной химиотерапии также описаны в *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Подходящие дозы для любого из вводимых совместно агентов представлены дозами, используемыми в настоящее время, и такие дозы могут быть снижены по причине комбинированного действия (синергии) нового препарата и других химиотерапевтических препаратов или видов лечения.

Комбинированная терапия может приводить к возникновению «синергии» и иметь «синергический» эффект, т.е. эффект, достигаемый при совместном использовании активных действующих веществ, который суммарно больше эффектов, вызываемых применением соединений по-отдельности. Синергический эффект может быть достигнут в случае, если активные действующие вещества: (1) находятся в одной композиции и вводятся или доставляются одновременно в комбинированной единице дозы композиции; (2) поставляются поочередно или параллельно в виде отдельных композиций; или (3) включены в отдельный режим лечения. При использовании чередующейся терапии, эффект синергии может быть достигнут, если соединения вводятся или доставляются последовательно, например, в ходе различных инъекций в разных шприцах. В целом, во время чередующейся терапии, эффективная доза каждого активного действующего вещества вводится последовательно, т.е. серийно, в то время как в ходе комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных действующих веществ вводятся вместе.

Комбинированная терапия по изобретению может дополнительно состоять из одного или нескольких химиотерапевтических препаратов. Комбинированное введение включает со-введение или конкурентное введение с использованием отдельных композиций или одной фармацевтической композиции, а также последовательное введение в любом порядке, при этом указывается период времени, в течение которого оба (или все) активных действующих вещества проявляют свою биологическую активность.

Химиотерапевтический препарат, при его введении, обычно вводится в известных дозах, или такая доза может в некоторых случаях понижаться по причине комбинированного действия препаратов или отрицательных побочных эффектов, вызванных введением антиметаболического химиотерапевтического препарата. Графики получения и режима приема доз таких химиотерапевтических препаратов могут использоваться в соответствии с инструкциями производителя или как это определено эмпирическим образом специалистом в данной области.

Могут быть скомбинированы различные химиотерапевтические препараты в соответствии с представленным здесь описанием.

В некоторых вариантах воплощения изобретения химиотерапевтические препараты для комбинирования выбирают из группы, включающей иммуномодуляторы (ИМ)

(включая талидомид и Ревлимид® (леналидомид)), протеосомальные ингибиторы (такие как Велкаде® (бортезомиб) и PS342), токсoid боры (включая доцетаксел и паклитаксел), токсoid барвинка (такие как винорелбин или винбластин), соединения платины (такие как карбоплатин или цисплатин), ингибитор ароматазы (такой как анастрозол или экземестан), антиэстрогенный препарат (например, фулвестрант или тамоксифен), этопозид, тиотепа, циклофосфамид, пеметрексед, метотрексат, липосомальный доксорубин, пэгилированный липосомальный доксорубин, капецитабин, гемцитабин, мелталин, доксорубин, винкристин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб) или стероид (например, дексаметазон и преднизон). В некоторых вариантах воплощения изобретения (например, вариантах воплощения, предусматривающих лечение множественной миеломы), комбинируются дексаметазон и леналидомид, или дексаметазон, или бортезомиб, или винкристин, доксорубин и дексаметазон, или талидомид и дексаметазон, или липосомальный доксорубин, винкристин и дексаметазон, или леналидомид и дексаметазон, или бортезомиб и дексаметазон, или бортезомиб, доксорубин и дексаметазон.

В некоторых вариантах воплощения изобретения химиотерапевтические препараты для комбинирования выбирают из группы, включающей Ревлимид® (леналидомид), протеосомальные ингибиторы (такие как Велкаде® (бортезомиб) и PS342), токсoid боры (включая доцетаксел и паклитаксел), токсoid барвинка (такие как винорелбин или винбластин), соединения платины (такие как карбоплатин или цисплатин), ингибитор ароматазы (такой как анастрозол или экземестан), антиэстрогенный препарат (например, фулвестрант или тамоксифен), этопозид, тиотепа, циклофосфамид, пеметрексед, метотрексат, липосомальный доксорубин, пэгилированный липосомальный доксорубин, капецитабин, гемцитабин, мелталин, доксорубин, винкристин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб) или стероид (например, дексаметазон и преднизон).

В некоторых вариантах воплощения изобретения (например, вариантах воплощения для лечения множественной миеломы) комбинируются дексаметазон и леналидомид, или дексаметазон и бортезомиб.

В одном варианте воплощения изобретения комбинированная терапия состоит из антитела или иммуноконъюгата и более чем одного химиотерапевтического препарата. Например, антитело или иммуноконъюгат могут быть скомбинированы со следующими препаратами: (i) винкристин, доксорубин (в липосомальных и нелипосомальных композициях) и дексаметазон; (ii) талидомид и дексаметазон; (iii) Велкаде® (бортезомиб), доксорубин и дексаметазон; (iv) Велкаде® (бортезомиб), талидомид и дексаметазон; (v) мелфалан и преднизон; (vi) мелфалан, преднизон и талидомид; (vii) мелфалан, преднизон и Велкаде® (бортезомиб); (viii) винкристин, доксорубин и дексаметазон; или (ix) талидомид и дексаметазон.

В одном варианте воплощения изобретения комбинированная терапия состоит из описанного здесь антитела или иммуноконъюгата и одного или нескольких следующих препаратов: (i) Велкаде® (бортезомиб), (ii) дексаметазон, (iii) Ревлимид® (леналидомид). В другом варианте воплощения изобретения комбинированная терапия состоит из антитела или иммуноконъюгата и следующих препаратов: дексаметазон и Ревлимид® (леналидомид) или Велкаде® (бортезомиб) и дексаметазон. В одном варианте воплощения изобретения комбинированная терапия состоит из антитела или иммуноконъюгата и каждого из следующих препаратов: Велкаде® (бортезомиб), дексаметазон и Ревлимид® (леналидомид).

Л. Готовые изделия и наборы

Другой вариант воплощения изобретения представлен готовым изделием, содержащим материалы, используемые в лечении, профилактике и/или диагностике рака с экспрессией FcRH5. Готовое изделие состоит из контейнера и этикетки или вкладыша на контейнере или вложенного в контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть выполнены из целого ряда материалов, таких как стекло или пластик. Контейнеры содержат композицию, которая эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики рака и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может быть представлен мешком с раствором для внутривенного введения или ампулой с мембраной, прокалываемой иглой шприца для внутрикожных инъекций). По меньшей мере, одно активное действующее вещество в композиции представлено антителом к FcRH5. Этикетка или упаковочный вкладыш указывает, что композиция должна применяться для лечения рака. Этикетка или упаковочный вкладыш также будет содержать инструкции по введению композиции антитела пациенту, страдающему раком. Кроме того, готовое изделие может дополнительно состоять из второго контейнера, содержащего фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Дополнительно готовое изделие может включать и другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Также представлены наборы для использования в различных целях, например, для анализа гибели клеток, экспрессирующих FcRH5, для очистки или иммунопреципитации полипептида FcRH5 из клеток. Для изоляции и очистки FcRH5 набор может состоять из антитела к FcRH5, соединенного с гранулами (например, гранулами сефарозы). Могут быть представлены наборы, содержащие антитела для идентификации и количественного определения полипептида FcRH5 *in vitro*, например, в ходе ИФА или вестерн-блоттинга. Как и готовое изделие, набор состоит из контейнера и этикетки или вкладыша на контейнере или вложенного в контейнер. Контейнер содержит композицию, включающую, по меньшей мере, одно антитело к FcRH5. Могут быть включены дополнительные контейнеры, содержащие, например, растворители и буферы, контрольные антитела. На этикетке или вкладыше может содержаться описание композиции, а также инструкции по использованию *in vitro* или для анализов.

М. Применение полипептидов FcRH5

Изобретение описывает способы скрининга соединений для выявления соединений, способных имитировать полипептид FcRH5 (агонистов) или предотвратить эффект полипептида FcRH5 (антагонистов). Скрининг-анализы на выявление кандидатных антагонистов-препаратов разработаны для идентификации соединений, которые связываются или образуют комплекс с полипептидами FcRH5, кодируемыми представленными здесь генами, или иным способом взаимодействуют с кодируемыми полипептидами и другими клеточными белками, включая, например, ингибирование экспрессии полипептида FcRH5 в клетках. Такие скрининг-анализы будут включать анализы для высокорезультативного скрининга химических библиотек, что делает такие анализы специфическим образом подходящими для идентификации небольших молекул кандидатных препаратов.

Анализы могут проводиться в различных форматах, включая анализы связывания белок-белок, биохимические скрининг-анализы, иммуноанализы и клеточные анализы, которые достаточно хорошо описаны в науке.

Все анализы антагонистов похожи в том, что для них необходим контакт кандидатного препарата с полипептидом FcRH5, кодируемым нуклеиновой кислотой в условиях и в течение времени, достаточных для взаимодействия таких двух компонентов.

- 5 В ходе анализа связывания взаимодействие представлено связыванием, и образующийся комплекс может быть изолирован из реакционной смеси. В отдельном варианте воплощения изобретения полипептид FcRH5, кодируемый указанным здесь геном, или кандидатный препарат иммобилизуют на твердой фазе, например, на пластине микротитратора, с образованием ковалентных и нековалентных связей.
- 10 Образование нековалентной связи обычно сопровождается покрытием твердой поверхности раствором полипептида FcRH5 и высушиванием. С другой стороны, иммобилизованное антитело, например, моноклональное антитело, специфическое относительно полипептида FcRH5, которое необходимо иммобилизовать, может использоваться для присоединения к твердой поверхности. Анализ выполняют путем
- 15 добавления неиммобилизованного компонента, который может быть помечен определяемой меткой, к иммобилизованному компоненту, например, покрытой поверхности, содержащей фиксированный компонент. По окончании реакции непрореагировавшие компоненты удаляют, например, путем смыва, и определяют комплексы, зафиксированные на твердой поверхности. Если изначально
- 20 неиммобилизованный компонент содержит определяемую метку, определение такой метки, иммобилизованной на поверхности, указывает на образование комплекса. Если изначально неиммобилизованный компонент не содержит определяемую метку, комплексообразование может быть определено, например, путем использования меченого антитела, которое специфически связывается с иммобилизованным
- 25 комплексом.

- Если кандидатное соединение взаимодействует, но не связывается с отдельным полипептидом FcRH5, кодируемым представленным здесь геном, такое взаимодействие с полипептидом может быть проанализировано с использованием способов для идентификации взаимодействий белок-белок. Такие анализы включают традиционные
- 30 подходы, такие как, например, перекрестное связывание, со-иммунопреципитация и со-очистка посредством градиентов или хроматографических колонок. Кроме того, взаимодействия белок-белок могут подлежать мониторингу с использованием генной системы дрожжей, описанной Fields и сотрудниками (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) as disclosed
- 35 by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Большая часть активаторов транскрипции, таких как GAL4 дрожжей, состоит из двух физически дискретных модулярных доменов, один из которых действует в качестве ДНК-связывающего домена, а второй функционирует в качестве домена-активатора транскрипции. Система экспрессии дрожжей из представленной выше публикации
- 40 (обычно указываемой как «двухгибридная система») обладает в данном случае преимуществом, включая использование двух гибридных белков, один из которых слит с ДНК-связывающим доменом GAL4, в другой слит с активирующим доменом. Экспрессия гена-репортера GAL1-*lacZ* под контролем GAL4-активированного промотора зависит от повторного восстановления активности GAL4 посредством взаимодействия
- 45 белок-белок. Колонии, содержащие взаимодействующие полипептиды, определяют с использованием хромогенного субстрата для β -галактозидазы. Полный набор (MATCHMAKERTM) для идентификации взаимодействий белок-белок между двумя специфическими белками с использованием двухгибридного способа, представлен на

рынке компанией Clontech. Такая система также может быть расширена для картографирования белковых доменов, задействованных в специфических взаимодействиях белков, а также для определения точного положения аминокислотных остатков, играющих критическую роль для таких взаимодействий.

Соединения, которые мешают взаимодействию гена, кодирующего полипептид FcRH5, и других интра- или экстрацеллюлярных компонентов, могут быть тестированы следующим образом: обычно реакционную смесь готовят с содержанием продукта гена и интра- или экстрацеллюлярным компонентом в условиях в течение периода времени, которые обеспечивают взаимодействие двух продуктов. Для испытания способности кандидатного соединения ингибировать связывание, реакцию проводят в отсутствии и присутствии тестируемого соединения. Кроме того, в третью реакционную смесь может быть добавлено плацебо, и такая смесь будет служить в качестве положительного контроля. Связывание (образование комплекса) между тестовым соединением и интра- или экстрацеллюлярным компонентом, присутствующим в смеси, контролируют в соответствии с представленным выше способом. Образование комплекса в контрольной смеси, но не в реакционной смеси, содержащей тестируемое соединение, указывает на то, что тестируемое соединение препятствует взаимодействию тестируемого соединения или реакционного партнера.

Для анализа антагонистов, в клетку вместе с соединением, подвергаемым скринингу на предмет специфической активности, может быть добавлен полипептид FcRH5, и способность такого соединения ингибировать активность в присутствии полипептида FcRH5 указывает на то, что соединение является антагонистом полипептида FcRH5. С другой стороны, антагонисты могут быть определены путем комбинирования полипептида FcRH5 и потенциального антагониста с мембранными полипептидными рецепторами FcRH5 или рекомбинантными рецепторами в соответствующих условиях для проведения анализа конкурентного ингибирования. Полипептид FcRH5 может быть меченым, например, радиоактивной меткой, поэтому количество молекул полипептида FcRH5, связанных с рецептором, может быть определено для установления эффективности потенциального антагониста. Ген, кодирующий рецептор, может быть идентифицирован с использованием различных известных специалистам в данной области способов, например, пэннингом лиганда и сортировкой FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Если полиаденилированную РНК получают из клетки, чувствительной к полипептиду FcRH5, может использоваться экспрессионный вектор, и библиотека кДНК, созданная из такой РНК, разделена на пулы и используется для трансфицирования клеток COS или других клеток, которые не чувствительны к полипептиду FcRH5. Трансфицированные клетки, выращенные на предметных стеклах, подвергают воздействию меченым полипептидом FcRH5. Полипептид FcRH5 может быть помечен с использованием целого ряда способов, включая йодирование или включение участка распознавания для сайт-специфической протеинкиназы. После фиксации и инкубации предметные стекла подвергают ауторадиографическому анализу. Положительные пулы идентифицируют, затем получают субпулы, которые повторно трансфицируют с использованием интерактивного процесса субобъединения и повторного скрининга, получая, в итоге, один клон, кодирующий предполагаемый рецептор.

В качестве альтернативного подхода для идентификации рецептора, меченый полипептид FcRH5 может быть соединен с клеточной мембраной посредством фотоаффинности или экстрактов при экспрессии молекулы рецептора. Вещество для перекрестного связывания разлагают с использованием электрофореза в

полиакриламидном геле и наносят на пленку для рентгенографии. Содержащий рецептор меченый комплекс может быть отделен, расщеплен на пептидные фрагменты и подвергнут белковому микросеквенированию. Аминокислотная последовательность, полученная в результате микросеквенирования, будет использоваться для разработки набора дегенерационных олигонуклеотидных зондов для скрининга библиотеки кДНК в целях идентификации гена, кодирующего предполагаемый рецептор.

В ходе другого анализа антагонистов клетки млекопитающих или мембраны, экспрессирующие рецептор, подлежат инкубации с меченым полипептидом FcRH5 в присутствии кандидатного соединения. Затем проводят изменение способности соединения повышать или блокировать такое взаимодействие.

Более специфические примеры потенциальных антагонистов включают олигонуклеотид, связывающийся со слитыми иммуноглобулинами с полипептидом FcRH5, и, в частности, с антителами, включая, без ограничений, поли- и моноклональные антитела и фрагменты антител, одноцепочечные антитела, антиидиотипические антитела и химерные или гуманизированные версии таких антител или фрагментов, а также человеческие антитела и фрагменты антител. С другой стороны, потенциальный антагонист может быть представлен родственным белком, например, мутированной формой полипептида FcRH5, которая распознает рецептор, но не оказывает какого-либо эффекта, ингибируя действие полипептида FcRH5 конкурентным образом.

Антитела, специфически связывающиеся с полипептидом FcRH5, а также другие молекулы, идентифицированные в ходе анализов скрининга, описанных в тексте данной заявки, могут вводиться для лечения различных нарушений, включая рак, в форме фармацевтических композиций.

Если полипептид FcRH5 является внутриклеточным, и в качестве ингибиторов используются целые антитела, предпочтительным является использование интернализирующих антител. Однако могут также использоваться липофекции или липосомы для доставки антитела или фрагмента антитела в клетки. Если используются фрагменты антитела, предпочтительным будет использование наименьшего фрагмента антитела, который специфически связывается с доменом связывания белка-мишени.

Например, основываясь на последовательностях переменного участка антитела, пептидные молекулы могут быть разработаны таким образом, чтобы сохранять возможность связываться с последовательностью белка-мишени. Такие пептиды могут быть синтезированы химически и/или получены в ходе процедуры рекомбинации ДНК. См., например, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

Композиции изобретения также могут содержать более одного активного действующего вещества, если это необходимо для отдельного показания, подвергнутого лечению, например, такие вещества могут обладать комплементарной активностью, не оказывая отрицательного влияния друг на друга. С другой стороны или кроме того, композиция будет состоять из агента, который усиливает функцию композиции, например, цитотоксического агента, цитокина, препарата химиотерапии или препарата-ингибитора роста. Такие молекулы представлены удобным образом в комбинации и количествах, эффективных для отдельной цели.

Н. Производные антител

Антитела по данному изобретению могут быть дополнительно модифицированы для включения дополнительных небелковых молекул, известных науке и представленных на рынке. Молекулы, подходящие для дериватизации антитела, представлены преимущественным образом водорастворимыми полимерами. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают следующие: полиэтиленгликоль

(ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1, 3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/ангидрида малеиновой кислоты, полиаминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры), а также декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может быть преимущественным в производстве благодаря его устойчивости в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и в случае присоединения более чем одного полимера, такие полимеры могут быть представлены одной или разными молекулами. В целом, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, может быть определено на основе (не ограничиваясь) отдельных свойств или функций антитела, подвергнутого улучшению, при этом производное антитело будет использоваться в лечении при определенных условиях и т.д.

О. Способ скрининга

Еще один вариант воплощения данного изобретения представляет способ определения присутствия полипептида FcRH5 в образце, подозреваемом на содержание полипептида FcRH5, и такой способ состоит в воздействии на образец конъюгатом антитело-препарат, который связывается с полипептидом FcRH5, с последующим определением связывания конъюгата антитело-препарат с полипептидом FcRH5 в образце, при этом присутствие такого связывания является доказательством наличия полипептида FcRH5 в образце. В некоторых случаях образец может содержать клетки (которые могут быть представлены раковыми клетками), подозреваемыми или экспрессирующими полипептид FcRH5. Используемый в данном способе конъюгат антитело-препарат может в некоторых случаях быть помечен определяемой меткой, присоединен к твердому субстрату и т.п.

Другой вариант воплощения данного изобретения представляет способ диагностики наличия опухоли у млекопитающего, и такой способ состоит в (а) контакте исследуемого образца, содержащего опухолевые клетки, полученные у млекопитающего, с конъюгатом антитело-препарат, который связывается с полипептидом FcRH5; и (б) определении образования комплекса между конъюгатом антитело-препарат и полипептидом FcRH5 в исследуемом образце, при этом образование такого комплекса является доказательством присутствия опухоли у млекопитающего. В некоторых случаях конъюгат антитело-препарат помечают определяемой меткой, присоединяют к твердому субстрату или т.п., и/или исследуемый образец опухолевых клеток получают из индивидуума, подозреваемого на наличие раковой опухоли.

IV. Дополнительные способы использования антител к FcRH5 и иммуноконъюгатов

А. Диагностические способы и способы определения

В одном аспекте изобретения антитела к FcRH5 и иммуноконъюгаты по изобретению используют для определения наличия FcRH5 в биологическом образце. В контексте данного изобретения термин «определение» охватывает качественное или количественное определение. В определенных вариантах воплощения изобретения биологический образец состоит из клетки или ткани. В определенных вариантах воплощения изобретения такие ткани включают здоровые и/или раковые ткани, экспрессирующие большое количество FcRH5 в сравнении с другими тканями, например, В-клетками и/или тканями, содержащими В-клетки.

В одном аспекте изобретение описывает способ определения наличия FcRH5 в биологическом образце. В определенных вариантах воплощения изобретения способ состоит в контакте биологического образца с антителом к FcRH5 в условиях, допускающих связывание антитела к FcRH5 с FcRH5, и определении образования

5 комплекса между антителом к FcRH5 и FcRH5.

В одном аспекте изобретение описывает способ диагностики расстройства, связанного с повышенной экспрессией FcRH5. В определенных вариантах воплощения изобретения способ состоит в контакте исследуемой клетки с антителом к FcRH5, определении уровня экспрессии (качественным или количественным образом) FcRH5 исследуемой

10 клеткой путем определения связывания антитела к FcRH5 с FcRH5, а также сравнении уровня экспрессии FcRH5 исследуемой клеткой с уровнем экспрессии FcRH5 контрольной клеткой (например, здоровой клеткой из такой же самой ткани, что и исследуемая клетка, или клеткой, экспрессирующей FcRH5 на уровне, сопоставимом с уровнем экспрессии в здоровой клетке), при этом более высокий уровень экспрессии FcRH5

15 исследуемой клеткой в сравнении с контрольной клеткой указывает на наличие расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией FcRH5. В определенных вариантах воплощения изобретения исследуемую клетку получают от индивидуума, который подозревается на наличие расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией FcRH5. В определенных вариантах воплощения изобретения расстройство

20 представлено нарушением клеточной пролиферации, таким как рак или опухоль.

Типичные нарушения пролиферации клеток, которые могут быть диагностированы с использованием антитела по изобретению, включают (но не ограничиваясь) следующие: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ,

25 рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

В определенных вариантах воплощения изобретения способ диагностики или

30 определения состоит в определении связывания антитела к FcRH5 с FcRH5, экспрессируемым на поверхности клетки или мембране, полученной из клетки, экспрессирующей FcRH5 на своей поверхности. В определенных вариантах воплощения изобретения способ состоит в контакте клетки с антителом к FcRH5 в условиях, допускающих связывание антитела к FcRH5 с FcRH5, и определении образования

35 комплекса между антителом к FcRH5 и FcRH5 на клеточной поверхности. Типичный анализ для определения связывания антитела к FcRH5 с FcRH5, экспрессируемым на клеточной поверхности, является FACS-анализ.

Для определения связывания антител к FcRH5 с FcRH5 могут использоваться и другие способы. Такие способы включают, не ограничиваясь, анализы связывания антигена, хорошо известные науке и включающие вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ИФА (иммуноферментный анализ), сэндвич-анализ, анализы иммунопреципитации, иммуноанализ с использованием флуоресценции, иммуноанализ белка А или иммуногистохимические (ИГХ) анализы.

40

В определенных вариантах воплощения изобретения антитела к FcRH5 подлежат мечению. Метки включают, но не ограничиваются, метки или молекулы, которые определяются непосредственным образом (такие как флуоресцирующие метки, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также молекулы, такие как ферменты или лиганды, которые определяются косвенным

образом, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Типичные метки включают, не ограничиваясь, следующие:

радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцирующие метки и их производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу (патент США No. 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу редьки (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказу и ксантиноксидазу, соединенные с ферментом, содержащим пероксид водорода, который окисляет предшественник красителя, такой как HRP, лактопероксидазу или микропероксидазу, биотин/авидин, спин-метки, метки бактериофагами, устойчивые свободные радикалы и т.п.

В определенных вариантах воплощения изобретения антитела к FcRH5 иммобилизованы на нерастворимой матрице. Иммобилизация влечет за собой разделение антитела к FcRH5 и любого FcRH5, остающегося несвязанным в растворе. Это обычно сопровождается инсолюбизацией антитела к FcRH5 перед проведением процедуры анализа путем абсорбции водонерастворимой матрицей или поверхностью (Bennich et al., патент США No. 3720760), или путем ковалентного связывания (например, с использованием перекрестного связывания с глутаральдегидом), или путем инсолюбизации антитела к FcRH5 после образования комплекса между антителом к FcRH5 и FcRH5, например, в ходе иммунопреципитации.

Любое из представленных выше вариантов воплощения изобретения для диагностики или определения может использоваться вместе с иммуноконъюгатом по изобретению вместо или в дополнение к антителу к FcRH5.

Б. Способы лечения

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению может использоваться, например, в способах лечения *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В одном аспекте изобретение описывает способы ингибирования роста или пролиферации клеток *in vivo* или *in vitro*, и такой способ состоит в воздействии на клетку антителом к FcRH5 или иммуноконъюгатом в условиях, обеспечивающих связывание иммуноконъюгата с FcRH5. «Ингибирование роста или пролиферации клеток» обозначает снижение роста или пролиферации клетки по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%, и включает индуцирование гибели клетки. В определенных вариантах воплощения изобретения клетка представлена опухолевой клеткой. В определенных вариантах воплощения изобретения клетка представлена В-клеткой. В определенных вариантах воплощения изобретения клетка представлена ксенотрансплантатом, например, как это объяснено в данной заявке.

В одном аспекте изобретения используется антитело или иммуноконъюгат для лечения или профилактики В-клеточного пролиферативного нарушения. В определенных вариантах воплощения изобретения нарушение пролиферации клетки связано с повышенной экспрессией и/или активностью FcRH5. Например, в определенных вариантах воплощения изобретения нарушение пролиферации В-клеток связано с повышенной экспрессией FcRH5 на поверхности В-клетки. В определенных вариантах воплощения изобретения нарушение пролиферации В-клеток представлено опухолью или раком. Примеры нарушения пролиферации В-клеток, подвергаемых лечению антителами или иммуноконъюгатами по изобретению, включают, но не ограничиваются, следующие: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ,

рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной

5 зоны.

В одном аспекте изобретения представлены способы лечения нарушения пролиферации В-клеток, состоящие из введения индивидууму эффективного количества антитела к FcRH5 или иммуноконъюгата. В определенных вариантах воплощения изобретения способ лечения нарушения пролиферации В-клеток состоит в введении

10 индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, состоящей из антитела к FcRH5 или иммуноконъюгата антитела к FcRH5, и, в некоторых случаях, по меньшей мере одного терапевтического агента, такого как, например, представленного ниже. В определенных вариантах воплощения изобретения способ лечения нарушения пролиферации клеток состоит в введении индивидууму эффективного

15 количества фармацевтической композиции, состоящей из 1) иммуноконъюгата антитела к FcRH5 и цитотоксического агента; и, в некоторых случаях, 2) по меньшей мере одного терапевтического агента, такого как, например, представленного ниже.

В одном аспекте изобретения, по меньшей мере, некоторые антитела или иммуноконъюгаты по изобретению могут связываться с FcRH5 видов организмов, за

20 исключением человека. В соответствии с этим, антитела или иммуноконъюгаты по изобретению могут использоваться для связывания с FcRH5, например, в культуре клеток, содержащей FcRH5, человека или других млекопитающих, содержащих FcRH5, с которыми антитело или иммуноконъюгат по изобретению реагирует перекрестным образом (например, шимпанзе, павиана, мармозетки, яванского макаки и макаки-резуса,

25 свиньи или мыши). В одном варианте воплощения изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат может использоваться для поражения FcRH5 на В-клетках путем контакта антитела или иммуноконъюгата с FcRH5 для образования антитела или комплекса иммуноконъюгат-антиген, таким образом, конъюгированный цитотоксин иммуноконъюгата поступает в клетку. В одном варианте воплощения изобретения

30 FcRH5 представлен FcRH5 человека.

В одном варианте воплощения изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат может использоваться в способе связывания FcRH5 у индивидуума, страдающего от расстройства, вызванного повышенной экспрессией и/или активностью FcRH5, и такой способ состоит в введении индивидууму антитела или иммуноконъюгата для связывания

35 FcRH5 в организме индивидуума. В одном варианте воплощения изобретения антитело или иммуноконъюгат интернализован в В-клетку, экспрессирующую FcRH5. В одном варианте воплощения изобретения FcRH5 представлен FcRH5 человека, а индивидуум представлен человеком. С другой стороны, индивидуум может быть представлен млекопитающим, экспрессирующим FcRH5, с которым связывается антитело к FcRH5.

40 Кроме того, индивидуум может быть представлен млекопитающим, в которого был введен FcRH5 (например, путем введения FcRH5 или экспрессии трансгена, кодирующего FcRH5).

Антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат может быть введен человеку в терапевтических целях. Кроме того, антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат может

45 быть введен млекопитающему, за исключением человека, у которого отмечается экспрессия FcRH5, с которым реагирует антитело перекрестным образом (например, примату, свинье, крысе или мыши), в ветеринарных целях или при использовании в качестве животной модели заболевания человека. Такие животные модели могут

использоваться для оценки терапевтической эффективности антител или иммуноконъюгатов по изобретению (например, для тестирования доз и продолжительности курсов введения).

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению могут использоваться поодиночке или в комбинации с другими композициями в ходе лечения. Например, антитело или иммуноконъюгат по изобретению может быть введен совместно с, по меньшей мере, одним дополнительным терапевтическим агентом и/или адъювантом. В определенных вариантах воплощения изобретения дополнительный терапевтический агент представлен цитотоксическим агентом, препаратом химиотерапии или препаратом-ингибитором роста. В одном из таких вариантов воплощения изобретения препарат химиотерапии представлен препаратом или комбинацией препаратов, таких как, например, циклофосфамид, гидроксидоанурубицин, адриамицин, доксорубицин, винкристин (Онковин™), преднизолон, СНОР, СVP или СОР, или иммунотерапевтическими препаратами, такими как антитело к CD20 (например, Ритуксан®) или антитело к VEGF (например, Авастин®); такая комбинированная терапия может использоваться в лечении рака и/или В-клеточных нарушений, таких как нарушения пролиферации В-клеток, включая следующие: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая агрессивная форма НХЛ, рецидивирующая вялотекущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная вялотекущая НХЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкоз, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ) и лимфома из клеток мантийной зоны.

Указанные выше комбинированные терапии включают комбинированное введение (с использованием двух или более терапевтических агентов, включенных в одну или отдельные композиции) и раздельное введение, при этом введение антитела или иммуноконъюгата по изобретению может проводиться до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению также могут использоваться в комбинации с лучевой терапией.

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент или адъювант) может быть введен любым подходящим способом, включая парентеральное, подкожное, интраперитонеальное, внутривенное и интраназальное, а также, при необходимости местного лечения, введение внутрь поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Кроме того, антитело или иммуноконъюгат вводят путем пульсирующей инфузионной терапии, в частности, со снижением доз антитела или иммуноконъюгата. Доза может вводиться любым подходящим способом, например, в виде инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, частично, от того, является ли введение кратковременным или хроническим.

Используемые в изобретении терапевтические агенты (например, антитела или иммуноконъюгаты по изобретению) будут разработаны, дозированы и введены в соответствии с надлежащей клинической практикой. Факторы, которые необходимо учитывать в данном контексте, включают отдельное и подвергнутое лечению нарушение, отдельное и подвергнутое лечению млекопитающее, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место введения агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные специалистам в данной области. Антитело или иммуноконъюгат необязательно, но в некоторых случаях может содержать один или

более агентов, используемых в настоящее время для профилактики или лечения отдельного нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела или иммуноконъюгата, присутствующих в композиции, типа подвергнутого лечению расстройства и других указанных выше факторов. Обычно используются одни и те же дозы и одни и те же пути введения, что и описанные в данной заявке, или от примерно 1 до 99% дозы, описанной в данной заявке, или любые другие дозы и любые другие пути введения, которые были эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза антитела или иммуноконъюгата по изобретению (при использовании в качестве монотерапии или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами, такими как препараты химиотерапии) будет зависеть от типа заболевания, подвергнутого лечению, типа антитела или иммуноконъюгата, тяжести и хода заболевания, независимо от того, вводят ли антитело или иммуноконъюгат в профилактических или терапевтических целях, используемой ранее терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело или иммуноконъюгат, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело или иммуноконъюгат вводят соответствующим образом пациенту в одно время или в виде серии процедур. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, начальная кандидатная доза антитела или иммуноконъюгата для введения пациенту составляет от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг, при этом агенты могут вводиться в ходе одной или отдельных процедур введения, или путем непрерывной инфузии. Обычная суточная доза может варьировать от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают проводить до достижения необходимой супрессии или снижения симптомов заболевания. Одноразовая типичная доза антитела или иммуноконъюгата будет находиться в диапазоне от примерно 0,05 мг/кг до примерно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту может быть введена одна или более доз в размере примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любые их комбинации) антитела или иммуноконъюгата. Такие дозы могут вводиться прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, пациент принимает от примерно двух до примерно двадцати, или, например, примерно шесть доз антитела или иммуноконъюгата). Вначале принимается начальная и более высокая нагрузочная доза, затем одна или несколько более низких доз. Типичный режим приема доз может включать введение начальной нагрузочной дозы, составляющей примерно 4 мг/кг, затем еженедельного введения поддерживающей дозы антитела в размере примерно 2 мг/кг. Однако могут использоваться и другие режимы приема доз. Прогресс в такой терапии может быть с легкостью подвергнут мониторингу с использованием стандартных способов и анализов.

В. Анализы активности

Антитела к FcRH5 или иммуноконъюгаты по изобретению могут характеризоваться по своим физическим/химическим свойствам и/или биологической активности с использованием различных и известных в науке анализов.

1. Анализы активности

В одном аспекте изобретения представлены анализы для идентификации антител к FcRH5 или иммуноконъюгатов, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, способность ингибировать рост или пролиферацию клеток (например, активность в «гибели клеток»), или способность индуцировать гибель клеток, включая программируемую гибель клеток (апоптоз).

Также описаны антитела или иммуноконъюгаты, обладающие такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

В определенных вариантах воплощения изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат исследуется на предмет своей способности ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vitro*. Анализ ингибирования роста или пролиферации клеток хорошо известен в науке. Определенные анализы клеточной пролиферации, примерами которых являются описанные здесь анализы «гибели клеток», измеряют жизнеспособность клеток. Один такой анализ представлен анализом жизнеспособности клеток с использованием люминесценции CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay, представленным на рынке компанией Promega (Madison, WI). Такой анализ определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, который является индикатором метаболически активных клеток. См. Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США No. 6602677. Анализ может проводиться с использованием планшета с 96 или 384 лунками, что позволяет в дальнейшем проводить автоматизированный скрининг с высокой производительностью (АСВП). См. Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. Процедура анализа подразумевает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo[®]) непосредственно к культивируемым клеткам. Это приводит к лизису клеток и генерации люминесцентного сигнала в ходе реакции с люциферазой. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующего АТФ, которое, в свою очередь, прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток, присутствующих в культуре. Данные могут быть записаны с использованием люминометра или ПЗС-камеры для формирования видеосигналов. Мощность люминесценции выражается в виде относительных световых единиц (ОСЕ).

Другой анализ пролиферации клеток представлен «МТТ»-анализом, т.е. колориметрическим анализом, измеряющим окисление 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид в формазан редуктазой митохондрий. Подобно анализу CellTiter-GloTM, данный анализ определяет количество метаболически активных клеток, присутствующих в культуре клеток. См., например, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, и Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

В одном аспекте изобретения антитело к FcRH5 тестируют на предмет его способности индуцировать гибель клетки *in vitro*. Анализы индукции гибели клеток хорошо известны в науке. В некоторых вариантах воплощения изобретения такие анализы измеряют, например, потерю целостности мембраны по захвату пропидиума йодида (ПИ), трипанового синего или (см. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11) 7AAD. В типичном анализе захвата ПИ клетки культивируют в модифицированной по способу Дульбеко среде Игла (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) с добавлением 10% термоинактивированной ФБС (Hyclone) и 2 mM L-глутамина. Таким образом, анализ проводят в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток. Клетки высеивают с плотностью 3×10^6 на чашку в чашки 100×20 мм, и оставляют на ночь. Затем среду удаляют и заменяют свежей средой или средой, содержащей различные концентрации антитела или иммуноконъюгата. Клетки инкубируют в течение периода 3 дней. После обработки, монослой промывают в ФБС и разъединяют в ходе трипсинизации. Затем клетки центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 минут при 4°C, осадок ресуспендируют в 3 мл охлажденного Ca^{2+} -связывающего буфера (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) и отмеряют аликвоты в 35 мм пробирки с пробкой 12×75 мм (1 мл/

пробирка, 3 пробирки для каждой группы обработки) для удаления агглютинированных клеток. Затем в пробирки вносят ПИ (10 мкг/мл). Образцы могут быть подвергнуты анализу с использованием проточного цитометра FACSCAN® и программного обеспечения FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Затем определяют антитела или иммуноконъюгаты, которые индуцируют статистически значимую гибель клеток, идентифицируемую по захвату ПИ.

В одном аспекте изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат тестируют на предмет его способности индуцировать апоптоз (программируемую гибель клетки) *in vitro*. Типичный анализ антител или иммуноконъюгатов, индуцирующих апоптоз, представлен анализом связывания аннексина. В типичном анализе связывания аннексина клетки культивируют и высеивают на чашки в соответствии с представленным выше описанием. Затем среду удаляют и заменяют свежей средой или средой, содержащей от 0,001 до 10 мкг/мл антитела или иммуноконъюгата. После трехдневного периода инкубации, монослои промывают в ФСБ и разъединяют в ходе трипсинизации. Затем клетки центрифугируют, ресуспендируют в охлажденном Ca^{2+} -связывающем буфере и отбирают аликвоты в соответствии с представленным выше описанием. Затем в пробирки вносят меченый аннексин (например, аннексин V-FITC (1 мкг/мл)). Образцы могут быть подвергнуты анализу с использованием проточного цитометра FACSCAN® и программного обеспечения FACSCONVERT® CellQuest (BD Biosciences). После этого определяют антитела или иммуноконъюгаты, индуцирующие статистически значимое связывание с аннексином в сравнении с контролем. Другой типичный анализ антител или иммуноконъюгатов, индуцирующих апоптоз, является колориметрическим ИФА гистонов ДНК для определения межнуклеосомного распада геномной ДНК. Такой анализ может проводиться с использованием, например набора Cell Death Detection ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

Клетки для использования в любом из представленных выше *in vitro* анализов, включают клетки или линии клеток, которые естественным образом экспрессируют FcRH5 или которые были получены путем биосинтеза для экспрессии FcRH5. Такие клетки включают опухолевые клетки, избыточно экспрессирующие FcRH5 в сравнении со здоровыми клетками, произошедшими из одной и той же ткани. Такие клетки также включают клеточные линии (включая линии опухолевых клеток), экспрессирующие FcRH5, и клеточные линии, которые не экспрессируют FcRH5 естественным образом, но которые были трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей FcRH5.

В одном аспекте изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат исследуется на предмет своей способности ингибировать рост или пролиферацию клеток *in vivo*. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело к FcRH5 или иммуноконъюгат исследуется на предмет своей способности ингибировать рост опухоли *in vivo*. Для таких исследований могут использоваться системы модели *in vivo*, например, модели ксенотрансплантатов. В типичной системе ксенотрансплантата опухолевые клетки человека вводят подходящему животному с ослабленным иммунитетом, например, мышам линии SCID. Антитело или иммуноконъюгат по изобретению вводят животному. Определяют способность антитела или иммуноконъюгата ингибировать или снижать рост опухоли. В определенных вариантах воплощения изобретения в указанной выше системе ксенотрансплантата опухолевые клетки человека представлены опухолевыми клетками, полученными у пациента-человека. Такие клетки, используемые для получения моделей ксенотрансплантатов, включают линии клеток лейкоза и лимфомы человека, которые включают, не ограничиваясь, клетки VJAB-luc (линия клеток лимфомы Беркитта с отрицательным показателем вируса Эпштейна-Барра,

трансфицированных геном-репортером люциферазы), клетки Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), клетки SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), клетки DoHH2 (см. Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991), и Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), клетки Granta-519 (см. Jadayel, D.M. et al, Leukemia 11(1): 64-72 (1997)). В определенных вариантах воплощения изобретения опухолевые клетки человека вводят подходящему животному с ослабленным иммунитетом путем подкожной инъекции или трансплантацией в подходящее место, например, жировую подушку молочной железы.

2. Анализы связывания и другие анализы

В одном аспекте изобретения антитело к FcRH5 тестируют на предмет его активности связывать антиген. Например, в определенных вариантах воплощения изобретения антитело к FcRH5 тестируют на предмет его способности связывать FcRH5, экспрессируемый на поверхности клеток. Для этого может использоваться анализ FACS.

В одном аспекте изобретения для идентификации моноклонального антитела, конкурирующего с мышинным антителом 10A8 (mu10A8 и/или гуманизированное антитело 10A8v1 (hu10A8v1)) за связывание с FcRH5, могут использоваться анализы конкурентного связывания. В определенных вариантах воплощения изобретения такое конкурирующее антитело связывается с одной и той же антигенной детерминантой (например, линейной или конформационной антигенной детерминантой), с которой связывается мышинное антитело 10A8 (mu10A8) и/или гуманизированное антитело 10A8 v1 (hu10A8 v1). Типичные анализы конкурентного связывания включают, но не ограничиваются, стандартные анализы, представленные в Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Подробное описание стандартных способов картографирования антигенной детерминанты, с которой связывается антитело, представлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Считается, что два антитела связываются с одной и той же антигенной детерминантой, если каждое антитело блокирует связывание другого антитела на 50% или более.

В типичном анализе конкурентного связывания иммобилизованный FcRH5 инкубируют в растворе, состоящем из одного меченого антитела, связывающегося с FcRH5 (например, мышинного антитела 10A8 (mu10A8), химерного антитела 10A8 (ch10A8) и/или гуманизированного антитела 10A8 v1 (hu10A8 v1)), и второго немеченого антитела, подвергаемого тестированию на предмет его способности конкурировать с первым антителом за связывание с FcRH5. Второе антитело может быть представлено в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный FcRH5 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с FcRH5, избыточное количество несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным FcRH5. Если количество метки, связанной с иммобилизованным FcRH5, существенно снижено в исследуемом образце в сравнении с контрольным образцом, это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с FcRH5. В определенных вариантах воплощения изобретения иммобилизованный FcRH5 присутствует на поверхности клетки или препарате мембраны, полученном из клетки, экспрессирующей на своей поверхности FcRH5.

В одном аспекте изобретения очищенные антитела к FcRH5 могут быть дополнительно охарактеризованы серией анализов, включая, но не ограничиваясь, N-терминальное секвенирование, анализ аминокислот, эксклюзионную

высокоэффективную жидкостную хроматографию без денатурации (ВЭЖХ), масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

В одном варианте воплощения изобретения представлено измененное антитело, сохранившее некоторые эффекторные функции, что делает его желательным кандидатом для большинства видов применений, в которых период полужизни антитела *in vivo* является важным, а отдельные эффекторные функции (такие как КЗЦ и АЗКЦ) не являются необходимыми или являются вредными. В определенных вариантах воплощения изобретения для обеспечения сохранности только необходимых свойств измеряется активность Fc антитела. Для подтверждения уменьшения/снижения активности КЗЦ и/или АЗКЦ могут проводиться *in vitro* и/или *in vivo* анализы цитотоксичности. Например, для обеспечения того, что у антитела отсутствует способность связывать Fc γ R (и, следовательно, отсутствует активность АЗКЦ), но сохранена способность связывать FcRn, могут проводиться анализы связывания рецептора Fc (FcR). Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гематопозитичных клетках обобщена в Таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Пример *in vitro* анализа для оценки активности АЗКЦ интересующей молекулы описан в патенте США No. 5500362 или 5821337. Полезные для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK-клетки). С другой стороны (или кроме того), активность АЗКЦ указанных молекул может быть оценена *in vivo*, например, с использованием животной модели, описанной Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Для подтверждения того, что антитело не способно связываться с C1q и у него отсутствует активность КЗЦ, также могут проводиться анализы связывания C1q. Для оценки активации комплемента может выполняться анализ КЗЦ, например, описанный в Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163. Путем использования известных в науке способов может проводиться определение связывания FcRn, а также клиренса/периода полужизни *in vivo*.

Представленные ниже примеры приводятся только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения области применения данного изобретения никоим образом.

Все приведенные в данной заявке ссылки на патенты и литературные источники включены в текст данной заявки во всей своей полноте посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Представленные на рынке реагенты, указанные в примерах, использовали в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное. Антитела, используемые в примерах, являются представленными на рынке антителами или описанными здесь антителами. Источники клеток, указанных в следующих примерах и по всему тексту данной заявки, идентифицированы по учетным номерам и представлены в Американской коллекции типовых культур, Manassas, VA.

ПРИМЕР 1: Получение антител, связывающихся с FcRH5

Данный пример иллюстрирует получение моноклональных антител, которые специфическим образом связываются с FcRH5.

Способы получения моноклональных антител известны науке и описаны, например, в Goding (см. выше). Иммуногены, которые могут использоваться, включают очищенный FcRH5, белки слияния, содержащие FcRH5, и клетки, экспрессирующие рекомбинантный FcRH5 на своей поверхности. Выбор иммуногена может проводиться специалистом в данной области без неоправданных экспериментов.

Мышей, например, линии Balb/c, иммунизируют иммуногеном FcRH5, эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда, и такой иммуноген вводят подкожно или интраперитонеально в количестве от 1 до 100 мкг. Кроме того, иммуноген эмульгируют в адьюванте MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) и вводят в подушечки стоп задних лап животных. Затем иммунизированных мышей дополнительно стимулируют спустя 10-12 дней иммуногеном, эмульгированным в выбранном адьюванте. В течение нескольких последующих недель мыши могут быть стимулированы дополнительными инъекциями. Периодически у мышей могут отбираться образцы сыворотки, получаемые путем отбора образцов крови в позадиглазничной области, и такие образцы могут быть тестированы в ходе ИФА для определения антител к FcRH5.

После выявления подходящего титра антитела, животным, «положительным» на антитела, может быть введена последняя внутривенная инъекция иммуногена. Спустя три-четыре дня, животных умерщвляют и производят забор клеток селезенки. Клетки селезенки подвергают слиянию (с использованием 35% полиэтиленгликоля) с выбранной линией клеток миеломы мыши, такой как P3X63AgU.1 (ATCC No. CRL 1597). В результате слияния получают клетки гибридомы, которые затем наносят на культуральный планшет с 96 лунками, содержащими среду НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин) для ингибирования пролиферации неслившихся клеток, гибридов миеломы и гибридов клеток селезенки.

Клетки гибридомы подвергают скринингу в ходе ИФА на предмет реакционной способности относительно иммуногена. Определение «положительных» клеток гибридомы, секретирующих необходимые моноклональные антитела к иммуногену, находится в пределах возможностей специалиста в данной области.

Положительные клетки гибридомы могут быть введены интраперитонеально изогенным мышам линии Balb/c для выработки асцитов, содержащих моноклональные антитела к иммуногену.

С другой стороны, клетки гибридомы могут быть выращены в культуре ткани с использованием колб или роллер-флаконов. Очистка моноклональных антител, выработанных в асцитах, может сопровождаться использованием осаждения в аммония сульфате с последующим проведением гель-хроматографии. С другой стороны, может использоваться аффинная хроматография на основе связывания антитела с белком А или белком G.

Описанные здесь антитела, направленные против полипептида FcRH5, могут быть с успехом получены при использовании таких способов. В частности, функциональные моноклональные антитела к белку FcRH5, способные распознавать и связываться с белком FcRH5 (как это измерено с использованием стандартного ИФА, анализа сортировки FACS и/или иммуногистохимического анализа), могут быть с успехом получены в соответствии со способами, описанными в PRO820 (DNA56041), PRO52387 (DNA257845).

Кроме получения моноклональных антител, направленных против полипептида FcRH5, как это описано в данной заявке, большая часть моноклональных антител может быть с успехом конъюгирована с клеточным токсином для использования в регуляции клеточного токсина в клетке (или ткани), экспрессирующей полипептид FcRH5 (*in vitro* и *in vivo*). Например, дериватизированные токсином (например, DM1) моноклональные антитела к полипептидам FcRH5 могут быть с успехом получены в соответствии с описанием, представленным в PRO820 (DNA56041), PRO52387 (DNA257845).

А. Получение устойчивых линий клеток FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Для получения клеточных линий для скрининга антител к FcRH5, были получены линии клеток фибробластов мыши SVT2, которые стабильно экспрессируют содержащие и не содержащие тэг FcRH5/IRTA2. кДНК FcRH5/IRTA2 была подвергнута амплификации в ходе ПЦР с использованием библиотеки клеток селезенки и клонирована с использованием ТА (Invitrogen) в pCR4. Для получения системы экспрессии без тэга, открытые рамки считывания (ОРС) были клонированы в вектор экспрессии млекопитающих pCMV.PD.nbe путем использования ПЦР для добавления сайтов рестрикции, расщепления продукта ПЦР и лигирования в вектор. N-терминальные и содержащие тэг векторы экспрессии были получены путем амплификации ОРС FcRH5/IRTA2 без сигнальной последовательности и лигирования продукта ПЦР в вектор pMSCVneo (Clontech), содержащий тэг gD и сигнальную последовательность (M G G T A A R L G A V I L F V V I V G H G V R G K Y A L A D A S L K M A D P N R F R G K D L P V L D Q L L) (SEQ ID NO: 1). Для каждого FcRH5/IRTA2 были определены две устойчивые линии клеток для использования в скрининге моноклональных антител на предмет специфической реакционной способности FACS и перекрестной реакционной способности между FcRH/IRTA. Векторы экспрессии с тэгом gD и без тэга были трансфицированы в SVT2 (рост клеток в среде DMEM+10% ФБС+2мМ L-глутамина с высоким содержанием глюкозы) с использованием стандартного протокола Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, Ca). Трансфектанты с тэгом gD были подвергнуты селекции в 0,5 мг/мл генецитина (Invitrogen; Carlsbad, Ca) в течение одной недели, а затем отдельные клетки были подвергнуты сортировке FACS со специфическим моноклональным антителом с тэгом gD (gD:952, Genentech; South San Francisco) для получения наибольшего экспрессируемого клона. Трансфектанты без тэга были подвергнуты селекции в 0,5 мкг/мл пуромицина (Calbiochem; La Jolla, Ca) до момента возникновения видимых колоний. РНК из каждой колонии было изолировано с использованием стандартного протокола Trizol® (Invitrogen; Carlsbad, Ca) и анализа TaqMan® (ABI; Foster City, Ca) для определения наибольшего экспрессируемого клона.

Б. Получение моноклональных антител к FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Были получены мышинные моноклональные антитела, способные связываться с человеческим FcRH5.

Белок для иммунизации мышей был получен путем временной трансфекции векторов, экспрессирующих внеклеточные домены (ECD) с тэгом His FcRH5/IRTA2 в клетки CHO. Белок был очищен из супернатанта трансфицированных клеток на никелевой колонке, а идентичность белка была подтверждена с использованием N-концевого секвенирования.

Десять мышей линии Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) были гипериммунизированы с использованием белка с тэгом полигистидина (HIS6 (SEQ ID NO: 68)) в присутствии адъюванта Рибби (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). В-клетки мышей имели высокие титры антител к иммуногену, что было определено в ходе прямого ИФА, и характеризовались специфическим связыванием с фибробластами мыши SVT2, стабильно экспрессирующими FcRH (определялось FACS); такие клетки были слиты с клетками миеломы мыши (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) с использованием модифицированного протокола, аналогичного описанному ранее протоколу (Kohler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995). Спустя 10-12 дней был собран супернатант, который был подвергнут скринингу на предмет выработки антитела и связывание, что было определено прямым ИФА и FACS. Положительные клоны, характеризующиеся наивысшими показателями связывания

после второго цикла субклонирования при ограниченном разделении, были обогащены и культивированы для дальнейшей характеристики, включая FcRH1, -2, -3, -4 и -5 специфичность и перекрестную реакционную способность. Супернатант, собранный с каждой линии клеток гибридомы, был очищен путем аффинной хроматографии (Pharmacia fast protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden) с использованием модифицированного протокола, описанного ранее (Hongo et al., 1995). Очищенные препараты антител были подвергнуты стерильной фильтрации (размер пор 0,2 мкм; Nalgene, Rochester NY) и хранились при температуре 4°C в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФСБ).

Моноклональные антитела к PRO52837 (FcRH5c/IRTA2c), способные распознавать и связывать белок FcRH5 (как это измерено стандартным ИФА, анализом сортировки FACS и/или иммуногистохимическим анализом), были с успехом получены и обозначены следующим образом:

антитело к FcRH5-9E2 (указанное в тексте данной заявки как 9E2 или 9E2.1.1) (ATCC No. PTA-7207, размещено 9 ноября 2005 г.),

антитело к FcRH5-1H4 (указанное в тексте данной заявки как 1H4 или 1H4.1.1) (ATCC No. PTA-7208, размещено 9 ноября 2005 г.),

антитело к FcRH5-13G9 (указанное в тексте данной заявки как 13G9 или 13G9.1.1) (описано в предварительной заявке на патент США No. 61/211695 от 1 апреля 2009 г.

и 61/166 214 от 2 апреля 2009 г.),

антитело к FcRH5-4D10 (указанное в тексте данной заявки как 4D10 или 4D10.1.1) (ATCC No. PTA-7210, размещено 9 ноября 2005 г.),

антитело к FcRH5-6H1 (указанное в тексте данной заявки как 6H1 или 6H1.1.1) (ATCC No. PTA-7211, размещено 9 ноября 2005 г.),

антитело к FcRH5-8H6 (указанное в тексте данной заявки как 8H6 или 8H6.1.1) (ATCC No. PTA-7212, размещено 9 ноября 2005 г.),

антитело к FcRH5-7D11 (указанное в тексте данной заявки как 7D11 или 7D11.1.1) (описано в тексте данной заявки),

антитело к FcRH5-10A8 (указанное в тексте данной заявки как 10A8 или 10A8.1.1) (описано в тексте данной заявки).

1. Определение аффинности (анализ Biacore)

Аффинность IgG относительно связывания FcRH была рассчитана на основе значений констант ассоциации и диссоциации, измеренных с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore 2000 (BIAcore, Inc.). Для ковалентного связывания антител к IgG мыши (BR-1008-338) был активирован чип-биосенсор с использованием N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями производителя (BIAcore, Inc.). Для каждого цикла кинетического анализа на чип наносилось 5 мкл 100 нМ IgG, затем вводились двукратные серийные разведения различных FcRH при скорости потока 20 мкл/мин в течение 150 секунд. Диссоциация антигена отслеживалась в течение 180 секунд перед регенерацией. Равновесные константы диссоциации при температуре 25°C были рассчитаны путем аппроксимации данных с моделью связывания Ленгмюра 1:1. Подвижный буфер был представлен ФСБ с 0,05% твина-20. Результаты приведены в Таблице 9 ниже. Все антитела связывали антиген с достаточной степенью аффинности для использования в терапевтических целях.

Таблица 9

Мышиное антитело	Аффинность к антигену человека (Biacore)	Перекрестная реакционная способность Суно (FACS) в стабильных трансфицированных клетках

1H4	6 нМ	X*
4D10	3 нМ	
6H1	<0,1 нМ	X
7D11	6 нМ	X*
8H6	20 нМ	X (ИГХ)
9E2	0,2 нМ	
10A8	Н/Д	X
10F5	Н/Д	X
13G9	19 нМ	X
*Очень незначительная при насыщающей концентрации		

Г. Получение и секвенирование химерных антител к FcRH5 человека

1. Химерное антитело 7D11 (ch7D11) к FcRH5 человека

Для получения химерного 7D11 IgG1, вся РНК была выделена из клеток гибридомы 7D11 с использованием мини-набора Qiagen RNeasy Mini Kit (номер по каталогу 74104) и предлагаемого протокола производителя. Путем использования N-концевых аминокислотных последовательностей для легких и тяжелых цепей моноклонального антитела 7D11, были получены праймеры ПЦР, специфичные для каждой цепи. Обратные праймеры для ОТ-ПЦР были разработаны для соответствия каркасному участку 4 семейства генов, соответствующему N-концевой последовательности. Также были разработаны праймеры для добавления необходимых сайтов рестрикции для клонирования. Для легкой цепи такие праймеры были представлены EcoRV на N-конце и KpnI на 3'-конце каркасного участка 4. Для тяжелой цепи добавленные сайты были представлены BsiWI на N-конце и ApaI, расположенным немного ниже соединения VH-CH1. Последовательности праймеров были следующими:

7D11LCF.EcoRV (прямой праймер легкой цепи 7D11):

5'-GATCGATATCYTGCTACMCARTGTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 2)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

C7F7LCR.KpnI (обратный праймер легкой цепи 7D11):

5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (SEQ ID NO: 3)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

1D1(IIIID-2)HCF.BsiWI (прямой праймер тяжелой цепи 7D11):

5'-GATCGACGTACGCTGARGTGARYTGGTGGARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 4)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

C7F7HCR.ApaI (обратный праймер тяжелой цепи 7D11):

5'-ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (SEQ ID NO:

5)
(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

Реакции ОТ-ПЦР для легкой и тяжелой цепей проводились с использованием набора Qiagen One-step RT-PCR kit (номер по каталогу 210210) и предлагаемых реакционных смесей и условий. Векторы pRK для экспрессии IgG в клетках млекопитающих уже были описаны ранее (Gorman et al., DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990)). Векторы были модифицированы с включением определенных участков распознавания эндонуклеазной рестриктазой для облегчения клонирования и экспрессии (Shields et al., J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604). Амплифицированный VL был клонирован в вектор экспрессии pRK клетки млекопитающего (pRK.LPG3.HumanКарра), содержащего константный домен каппа-цепи человека. Амплифицированный VH был введен в вектор экспрессии pRK клетки млекопитающего (pRK.LPG4.HumanHC), кодирующий константный домен IgG1 человека полной длины.

Последовательность ДНК была получена для всего кодирующего участка

результатирующих легкой (Фигура 1) и тяжелой (Фигура 3) цепей химерного мышино-человеческого антитела к FcRH5 человека (ch7D11). Кодированный полипептид для мышино-человеческих химерных легких и тяжелых цепей, кодируемых ДНК, представлен на Фигурах 2 и 4, соответственно. После секвенирования ДНК была проанализирована экспрессия плазмид.

Плазмиды были временно трансфицированы в 293 клетки (линия клеток эмбриональной почки человека, трансформированных аденовирусом) (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977)). В частности, 293 клетки были разделены за день до трансфекции и посеяны на среде, содержащей сыворотку. На следующий день была добавлена двухцепочечная ДНК, полученная в виде преципитата кальция фосфата, с последующим добавлением pAdVantage™ DNA (Promega, Madison, WI); затем клетки инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. Клетки были культивированы в среде, не содержащей сыворотку, и собраны спустя 4 дня. Белки антитела были очищены от супернатанта трансфицированных клеток на колонке с белком А; затем буфер был заменен на 10 мМ натрия сукцинат, 140 мМ NaCl, pH 6,0, и концентрирован с использованием Centricon-10 (Amicon). Идентичность белков была подтверждена путем N-концевого секвенирования. Концентрации белка определялись путем количественного анализа аминокислот. Антитела тестировались на предмет связывания с человеческим FcRH5 в ходе FACS с использованием клеток SVT2, как это описано ниже.

2. Химерное антитело 10A8 (ch10A8) к FcRH5 человека

Антитело 10A8 было получено в виде члена панели антител к FcRH5 гибридомы. Мышиные/человеческие химеры таких антител были получены с использованием ОТ-ПЦР, как это описано выше, для амплификации переменных доменов легкой и тяжелой цепей гибридомы с использованием всей мРНК в качестве субстрата. Переменные домены легкой цепи были клонированы в вектор pRK.LPG3.HumanКаппа, содержащий константный каппа-домен человека, в то время как переменные домены тяжелой цепи были клонированы в вектор pRK.LPG4.HumanГамма, кодирующий константные домены IgG1 человека полной длины. Последовательность ДНК была получена для всего кодирующего участка результирующих легкой (Фигура 5) и тяжелой (Фигура 7) цепей химерного мышино-человеческого антитела к FcRH5 человека (ch10A8), что позволило идентифицировать каркасный участок и участки CDR переменных доменов. Кодированный полипептид для мышино-человеческих химерных легких и тяжелых цепей 10A8, кодируемых ДНК, представлен на Фигурах 6 и 8, соответственно.

Последовательности праймеров, используемых для ОТ-ПЦР клонирования 10A8, представлены следующими:

10A8LCF.EcoRV (прямой праймер легкой цепи 10A8):

5'-GATCGATATCGTGATGACCCARTCTCAY AA-3' (SEQ ID NO: 6)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

10A8LCR.KpnI (обратный праймер легкой цепи 10A8):

5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (SEQ ID NO: 7)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCF.BsiWI (прямой праймер тяжелой цепи 10A8):

5'-GATCGACGTACGCTGARGTGCACTG GTGGARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 8)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCR (обратный праймер тяжелой цепи 10A8):

5'-CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA-3' (SEQ ID NO: 9)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T, S=G/C, H=A/T/C)

3. Химерное антитело 13G9 (ch13G9) к FcRH5 человека

Антитело 13G9 было получено в виде члена панели антител к FcRH5 гибридомы. Мышиные/человеческие химеры таких антител были получены с использованием ОТ-ПЦР для амплификации переменных доменов легкой и тяжелой цепей гибридомы с использованием всей мРНК в качестве субстрата. Переменные домены легкой цепи были клонированы в вектор pRK.LPG3.HumanKappa, содержащий константный каппа-домен человека, в то время как переменные домены тяжелой цепи были клонированы в вектор pRK.LPG4.HumanHC, кодирующий константные домены IgG1 человека полной длины. Секвенирование ДНК позволило идентифицировать каркасные участки и участки CDR переменных доменов. Химерные и гуманизированные версии 13G9 описаны в предварительных заявках на патент США No. 61/211695 от 1 апреля 2009 г. и 61/166214 от 2 апреля 2009 г. (включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки).

Г. Получение гуманизированного антитела 10A8 к FcRH5 человека

Номера остатков приводятся согласно Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Используются однобуквенные обозначения аминокислот. Дегенерация ДНК представлена с использованием кода IUB (N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T).

1. Гуманизированное антитело к FcRH5

Были получены различные гуманизированные антитела к FcRH5. Домены VL и VH из мышинового антитела к FcRH5 (10A8) были выровнены относительно консенсусных доменов VL каппа I (huKI) и консенсусного домена VH подгруппы III (huIII) человека. Выравнивание переменного домена легкой цепи мышинового антитела 10A8 с консенсусной последовательностью каппа I человека представлено на Фигуре 9.

Гиперпеременные участки из мышинового антитела к 10A8 (mu10A8) были встроены в акцепторный каркасный участок консенсусной последовательности человека для получения прямого HVR-трансплантата MA10A8 (обозначаемого в тексте данной заявки как «10A8-трансплантат» или «гуманизированное» антитело с 10A8-трансплантатом, или «трансплантат hu10A8»). CDR 10A8 были получены с использованием вектора экспрессии млекопитающих, содержащего сигнальную последовательность млекопитающих, консенсусную последовательность переменного домена V каппа I человека и константную последовательность каппа I человека. Из МАТ донора в плазмиду-акцептор не было трансфицировано ни одного остатка мыши. CDR были трансфицированы с использованием простых олигонуклеотидов, кодирующих каждый CDR, а также одноцепочечной ДНК плазмиды-акцептора с соблюдением протокола мутагенеза по Kunkle. Привитые остатки и переменный домен (SEQ ID NO: 19) легкой цепи (hu10A8 v1) полученной версии 10a8 человека представлены на Фигуре 9.

Подобным образом, CDR переменного домена тяжелой цепи мышинового антитела 10A8 (mu10A8) были встроены в вектор, содержащий сигнальную последовательность млекопитающего, консенсусную последовательность подгруппы III тяжелой цепи человека и последовательности, кодирующие константные домены IgG1 человека полной длины. Из донора в плазмиду-акцептор не было трансфицировано ни одного остатка мыши. Выравнивание переменного домена тяжелой цепи мышинового антитела 10A8, привитых остатков подгруппы III переменного домена человека, и переменный домен (SEQ ID NO: 21) тяжелой цепи результирующего антитела 10A8 человека версии 1 (hu10A8 v1) представлены на Фигуре 10.

Для начальных исследований химерные и гуманизированные версии 1 (hu10A8 v1)

были временно экспрессированы с использованием 293 клеток из линии клеток эмбриональной почки человека, трансформированных аденовирусом (Graham et al., 1977). Для каждого варианта к 0,9 мл среды DMEM, содержащей 0,1 мл FuGene, было добавлено 10 мкг плазмид легкой и тяжелой цепи (см. описание выше). Такой смеси было достаточно для добавления к одному флакону T250 с 75% конфлюэнтном 293 клеток с 24 мл среды, и флаконы были инкубированы в течение ночи при температуре 37°C и 5% CO₂. На следующий день клетки были промыты ФСБ, и среда была заменена средой, не содержащей сыворотки, но с добавленным инсулином и следовыми элементами. Спустя 5 дней была собрана кондиционированная среда, а антитела были очищены путем аффинной хроматографии на сефарозе с белком А.

Значения относительной аффинности связывания гуманизированной версии 1 (hu10A8 v1) и химеры были измерены с использованием FACS и анализа Скэтчарда (см. ниже). Поскольку аффинность гуманизированной версии 1 оказалась эквивалентной химере, каких-либо других версий для повышения аффинности не было получено, и дальнейшие исследования основываются на данной версии и ее конъюгированных производных (см. ниже).

2. Получение IgG

Плазмиды были временно трансфицированы в 293 клетки (линия клеток эмбриональной почки человека, трансформированных аденовирусом) (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977)). В частности, 293 клетки были разделены за день до трансфекции и высеяны на среде, содержащей сыворотку. На следующий день была добавлена двухцепочечная ДНК, полученная в виде преципитата кальция фосфата, с последующим добавлением ДНК pAdVantage™ (Promega, Madison, WI); затем клетки инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. Клетки были культивированы в среде, не содержащей сыворотку, и собраны спустя 4 дня. Белки антитела были очищены от супернатанта трансфицированных клеток на колонке с белком А; затем буфер был изменен на 10 мМ натрия сукцинат, 140 мМ NaCl, pH 6,0, и концентрирован с использованием Centricon-10 (Amicon). Идентичность белков была подтверждена путем N-концевого секвенирования. Концентрации белка определялись путем количественного анализа аминокислот. Антитела тестировались на предмет связывания с человеческим FcRH5 в ходе FACS с использованием клеток SVT2, как это описано ниже.

3. Анализ связывания (FACS-анализ)

Для определения перекрестной реакционной способности антител к FcRH5, связывание вариантов IgG с клетками SVT2, экспрессирующими FcRH1-6 человека, было проанализировано с использованием FACS-анализа.

Примерно 10⁶ клеток SVT2, стабильно экспрессирующих huFcRH1-6 с тэгом gD, в 100 мкл были инкубированы с 1,0 мкг мышинового или химерного АТ [мышинное антитело с тэгом gD (положительный контроль), мышинное антитело к FcRH5 (1H4) («mu1H4»), мышинное антитело к FcRH5 (4D10) («mu4D10»), мышинное антитело к FcRH5 (6H1) («mu6H1»), мышинное антитело к FcRH5 (7D11) («mu7D11»), химерное антитело к FcRH5 (7D11) («ch7D11»), мышинное антитело к FcRH5 (8H6) («mu8H6»), мышинное антитело к FcRH5 (9E2) («mu9E2») или мышинное антитело к FcRH5 (13G9) («mu13G9»)]. Инкубация клеток SVT2, стабильно экспрессирующих пустой вектор, проводилась с использованием тех же самых антител, что и для отрицательного контроля. Конъюгированное ФЭ крысиное антитело к MuIgG₁, крысиное антитело к MuIgG_{2a+b}, или мышинное антитело к HuIgG использовалось в качестве второго детекторного антитела. Результаты приводятся на Фигуре 14. Все исследуемые антитела специфически связываются с FcRH5,

за исключением мышиногo антитела к FcRH5 (6H1), которое связывается перекрестным образом с FcRH1. Мышиное антитело к FcRH5 (8H6) является слабым, но специфическим относительно FcRH5, что было определено в ходе анализа FACS.

Для дальнейшего определения перекрестной реакционной способности антител к FcRH5, связывание супернатантов вариантов IgG с клетками SVT2, экспрессирующими FcRH1-6 человека, было проанализировано с использованием FACS-анализа.

Примерно 10^6 клеток SVT2, стабильно экспрессирующих huFcRH1-6 с тэгом gD, были инкубированы в 1,0 мкг очищенного антитела Ms с тэгом gD или 100 мкл (концентрация неизвестна) супернатанта мышиногo АТ гибридомы (мышиное антитело к FcRH5 (10A8) («mu10A8»), мышиное антитело к FcRH5 (10F5) («mu10F5»). Инкубация клеток SVT2, стабильно экспрессирующих пустой вектор, проводилась с использованием тех же самых антител, что и для отрицательного контроля. Конъюгированное с ФЭ крысиное антитело к MsIgG₁ использовалось в качестве второго детекторного антитела.

Результаты приводятся на Фигуре 15. Антитела mu10A8 и mu10F5 специфически связывали FcRH5.

Для дальнейшего определения связывания мышиных антител к FcRH5, с использованием FACS-анализа было определено связывание вариантов IgG с клетками Раджи, экспрессирующими FcRH5 человека, и клетками 293Т, экспрессирующими FcRH5 яванского макака.

Примерно 10^6 клеток Раджи, стабильно трансфицированных FcRH5 человека, и клетки 293Т, временно трансфицированные супо FcRH5 с тэгом gD, были инкубированы в 0,1 мкг биотинилированного контроля (изотип мыши), биотинилированного мышиногo антитела с тэгом gD, биотинилированного mu6H1, биотинилированного mu13G9 или биотинилированного mu7D11 в 100 мкл буфера FACS (ФСБ, 0,5% БСА, 0,05% натрия азида). Конъюгированный с ФЭ стрептавидин использовался в качестве второго определяемого реагента. Результаты представлены на Фигурах 16 и 17.

Для дополнительного FACS- анализа антител к FcRH5 1,0 мкг, 0,1 мкг или 0,01 мкг антитела было титровано на миллион клеток BJAB, стабильно экспрессирующих huFcRH5, и клеток SVT2, стабильно экспрессирующих супоFcRH5. Примерно 10^6 клеток в 100 мкл было инкубировано с различными количествами (1,0 мкг, 0,1 мкг или 0,01 мкг) мышиногo АТ mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5 или mu13G9 на миллион клеток BJAB, стабильно экспрессирующих huFcRH5, и клеток SVT2, стабильно экспрессирующих супоFcRH5. Инкубация с 1,0 мкг/ 10^6 клеток подходящего контроля (IgG, изотип мыши) использовалась в качестве отрицательного контроля. Конъюгированное с ФЭ крысиное антитело к MsIgG₁ или крысиное антитело к MuIgG_{2a+b} использовалось в качестве второго детекторного антитела. Результаты представлены на Фигурах 18 и 19. mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5 или mu13G9 реагируют перекрестным образом с FcRH5 яванского макаки (как это определено FACS-анализом), и могут использоваться в доклинических исследованиях безопасности, оценивающих зависящую от мишени токсичность.

Для FACS-анализа конъюгаты препарат-антитело к FcRH5 (см. Пример 2), КАП FcRH5, были добавлены в увеличивающихся концентрациях (0,1, 1,0 и 10 мкг/мл) к 10^6 клеткам OPM2, трансфицированным и стабильно экспрессирующим FcRH5 человека, или клеткам SVT2, трансфицированным и стабильно экспрессирующим FcRH5 яванского макаки, в реакционном объеме 100 мкл. Затем образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере FACS (ФСБ, 0,5% БСА, 0,1% натрия азид) для

ингибирования интернализации. После промывания, клетки были ресуспендированы в буфере FACS и инкубированы в течение 30 минут при комнатной температуре с 20 мкл мышинового антитела к IgG человека, конъюгированного с фикоэритрином (мышиное АТ к IgG человека-ФЭ), в качестве второго определяемого антитела в реакционном объеме 100 мкл. После промывания, клетки были фиксированы в 200 мкл 2% параформальдегида/ФСБ, после чего был проведен анализ способом потоковой цитометрии. Такая же процедура использовалась для HuIgG, но только при более высокой концентрации (10 мкг/мл). HuIgG использовалось в качестве изотипического контроля для установления начального значения PMT для линии клеток. Потоковая цитометрия была проведена с использованием BD FACSCalibur®, и для каждого образца было записано геометрическое среднее значение интенсивности флуоресценции. Записанные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo v8.4.5 (см. Фигуры 20-25). Thio-hu10A8-HC(A118C) и thio-hu10A8-LC(V205C) связывались одинаковым образом при различных концентрациях неконъюгированного антитела с клетками OPM2, стабильно экспрессирующими huFcRH5, и клетками SVT2, стабильно экспрессирующими FcRH5 яванского макаки (определено FACS-анализом). Thio-ch10A8-HC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE, thio-hu10A8-HC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE, thio-hu10A8-LC(V205C)-MC-vc-PAB-MMAE, ch10A8-SPDB-DM4 и hu10A8-SPDB-DM4 связывались одинаковым образом при различных концентрациях КАП с клетками OPM2, стабильно экспрессирующими huFcRH5 (определено FACS-анализом).

4. Определение аффинности (анализ Скэтчарда)

Для дополнительного определения связывания мышинных антител к FcRH5 и клонов IgG, был проведен анализ связывания по Скэтчарду йодированных вариантов IgG с клетками OPM2, экспрессирующими huFcRH5, и клетками SVT2, экспрессирующими FcRH5 яванского макаки.

Для анализа Скэтчарда 0,5 нМ мышинового антитела к FcRH5 или клона IgG, меченых I^{125} , было сопоставлено относительно немеченого мышинового антитела к FcRH5 или клона IgG, соответственно, в концентрации от 50 до 0,02 нМ (12-этапное серийное разведение 1:2) в присутствии трансфицированной линии клеток OPM2, стабильно экспрессирующих FcRH5 человека, и трансфицированной линии клеток SVT2, стабильно экспрессирующих FcRH5 яванского макаки. После 4-часовой инкубации при температуре 4°C, клетки были промыты, и количество конгломератов клеток было подсчитано с использованием счетчика гамма-частиц (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Все действия проводились в трех повторностях, а подсчет проводился в течение 10 минут. Для расчета Kd использовался средний показатель числа импульсов в минуту и программа New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA). Результаты представлены в Таблице 10 («ms» относится к мышинному антителу).

Таблица 10

Определение аффинности с использованием анализа по Скэтчарду

Клеточная линия	PUR/ Партия	АТ	Kd (нМ)	Среднеквадратичная ошибка
BJAB.huFcRH5	50095-16	ms10A8	0,44	0,046
SVT2.cyFcRH5	50095-16	ms10A8	2,74	0,530
OPM2.huFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0,52	0,036
SVT2.cyFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0,98	0,022
OPM2.huFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	0,85	0,050
SVT2.cyFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	1,57	0,000
OPM2.huFcRH5	CA51434-50	hu10A8 v1	1,44	0,150

SVT2.cyFcRH5	CA51434-50	hu10A8 v1	3,04	1,340
OPM2.huFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	1,77	0,240
OPM2.huFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	1,21	0,142
SVT2.cyFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	3,12	0,139
SVT2.cyFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	2,63	1032,300
BJAB.huFcRH5	50095-53	ms6H1	0,19	0,007
SVT2.cyFcRH5	50095-93	ms6H1	0,38	0,027

ПРИМЕР 2: Получение конъюгатов антитело к FcRH5-препарат (КАП)

Препараты, используемые для получения конъюгатов антитело-препарат (КАП) к FcRH5 человека, включают майтансиноид DM1 и DM4 и производное доластатина 10 (монометилауристатин Е (ММАЕ)). (См. US20050276812 от 31 мая 2005 г. и US20050238649 от 5 ноября 2004 г. (включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки)). DM1, DM4 и ММАЕ являются ингибиторами митоза, которые, по меньшей мере, в 100 раз более токсичны, чем митотические ингибиторы алкалоида барвинка, используемые в химиотерапевтическом лечении НХЛ (Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006); Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003); Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). Линкеры, используемые для получения КАП, представлены SMCC для DM1, SPDB для DM4 и MC для MMAF или MC-vc-PAB для MMAE. Для DM1 и DM4, антитела были соединены с DM1 и DM4 посредством е-аминогруппы лизина с использованием устойчивого тиоэфирного линкера SMCC (обозначаемого после конъюгации как MCC). С другой стороны, для DM4 антитела были соединены с DM4 посредством е-аминогруппы лизина с использованием линкера SPDB. DM1, присоединенный посредством линкера SMCC, устойчив к расщеплению в восстанавливающих условиях. Кроме того, КАП SMCC-DM1 и SPDB-DM4 индуцируют клеточную токсичность, если КАП интернализован и направлен на лизосому, что вызывает высвобождение соединения лизин-N^c-DM1, которое является эффективным антимиотическим агентом внутри клетки, и при высвобождении из клетки соединение лизин-N^c-DM1 не является токсичным (Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). Для MMAE, антитела были соединены с MMAE посредством цистеина с использованием малеимидокапроил-валин-цитруллин (vc)-p-аминобензилоксикарбонила (MC-vc-PAB). Линкер MC-vc-PAB расщепляется межклеточными протеазами, такими как катепсин В, и при таком расщеплении высвобождает несвязанный препарат (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)), в то время как линкер MC устойчив к расщеплению межклеточными протеазами.

Конъюгаты антитело-препарат (КАП) к FcRH5 человека с использованием SMCC-DM1 были получены в ходе процедуры, подобной процедуре, описанной в заявке на патент США No. 11/141344 от 31 мая 2005 г. (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). Буфер для очищенных антител к FcRH5 человека был заменен раствором, содержащим 50 мМ калия фосфата и 2 мМ ЭДТА, pH 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) был растворен в диметилацетамиде (DMA) и добавлен к раствору с антителом для получения конечного молярного соотношения SMCC/АТ 10:1. Реакция продолжалась в течение трех часов при комнатной температуре и перемешивании. Модифицированное SMCC антитело было впоследствии очищено на обессоливающей колонке GE Healthcare HiTra (G-25), уравновешенной с использованием 35 мМ натрия цитрата с 150 мМ NaCl и 2 мМ ЭДТА, pH 6,0. DM1, растворенный в DMA, был добавлен к смеси SMCC-антитело с получением молярного соотношения DM1:антитело, равного 10:1. Реакция продолжалась в течение 4-20 часов при комнатной температуре и перемешивании. Раствор с модифицированным DM1

антителом был подвергнут диафильтрации с 20 объемами ФСБ для удаления непрореагировавшего DM1, стерильной фильтрации, и хранился при температуре 4°C. Как правило, в ходе такого процесса достигается выход антитела 40-60%. Как правило, мономерность препарата составляет >95%, как это оценено гель-фильтрацией и способом

5 рассеяния лазерного излучения. Поскольку максимум абсорбции DM1 составляет при 252 нм, количество препарата, связанного с антителом, может быть определено путем дифференциальных измерений абсорбции при 252 и 280 нм. Как правило, соотношение препарат:антитело составило 3:4.

Для получения конъюгата антитело к FcRH5 человека-препарат SPDB DM4 с 3-4

10 препаратами/АТ, антитело сперва было модифицировано SPDB[эфир 4-(2-пиридилдитио) масляной кислоты и N-гидроксисукцинимид] для получения дитиопиридиловых групп. К антителу был добавлен SPDB в 4-6-кратном молярном избытке, и реакция проводилась в течение 90 минут при комнатной температуре. Реакция проводилась в 50 мМ калия фосфата, pH 7 с 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА при концентрации антитела 5-10 мкг/мл.

15 После реакции с SPDB был добавлен этанол в конечной концентрации 5% в/в, а также содержащий тиол препарат DM4, молярная концентрация которого была в 1,7 раз больше, чем SPDB. Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 16 часов. Конъюгат очищается в ходе диафильтрации, гель-фильтрации или катион-обменной хроматографии.

20 Конъюгаты антитело-препарат (КАП) к FcRH5 человека с использованием линкера препарата MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE были получены в ходе процедуры, подобной процедуре, описанной в заявке на патент США No. 10/983340 от 05.11.2004 (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). Очищенное антитело к FcRH5 было растворено в 500 мМ натрия бората и 500 мМ натрия хлорида при pH

25 8,0, и в дальнейшем подвергнуто воздействию избытком 100 мМ дитиотреитола (DTT). После инкубации при температуре 37°C в течение примерно 30 минут, буфер был заменен путем элюирования через смолу Sephadex G25 и элюирован с ФСБ и 1 мМ DTPA. Значение тиол/АТ было проверено путем определения пониженной концентрации антитела в ходе поглощения раствора при 280 нм и концентрации тиола в ходе реакции

30 с DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) и определения поглощения при 412 нм. Восстановленное антитело, растворенное в ФСБ, было охлаждено на льду. Линкер препарата MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE в DMSO был растворен в ацетонитриле и воде, и затем добавлен к охлажденному и восстановленному антителу в ФСБ. После часовой инкубации для остановки реакции и ограничения любых непрореагировавших тиоловых групп антитела

35 было добавлено избыточное количество малеимида. Реакционная смесь была концентрирована путем ультрацентрифугирования, и конъюгат антитело-препарат был очищен и обессолен путем элюирования через смолу G25 в ФСБ, отфильтрован через фильтры 0,2 мкм в стерильных условиях и заморожен для хранения.

ПРИМЕР 3: Получение антител к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином

40 Получение антител к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином было осуществлено в соответствии с представленным здесь описанием. Остатки цистеина могут быть добавлены в легкую цепь, тяжелую цепь или участок Fc антитела для возможности конъюгации с различными препаратами. В препарате антитела к FcRH5 с добавленным в ходе рекомбинации цистеином (10A8), ДНК, кодирующая легкую

45 цепь, была подвергнута мутации для замены цистеина на валин в положении 205 по Kabat, как это показано на Фигуре 13. ДНК, кодирующая тяжелую цепь, была подвергнута мутации для замены цистеина на аланин в положении 118 по EU в тяжелой цепи (последовательное положение 118, номер для Kabat 114), как это показано на

Фигуре 12. Участок Fc антител к FcRH5 может быть подвергнут мутации для замены цистеина серином в положении 400 по EU в участке Fc тяжелой цепи (последовательное положение 400, номер для Kabat 396).

ПРИМЕР 4: Анализ гибели опухолевых клеток *in vivo* с использованием конъюгатов мышинного антитела к FcRH5 - препарата

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности различных антител к FcRH5, мышинные антитела были конъюгированы с DM1, после чего был проанализирован эффект конъюгированного варианта на опухоли у мышей.

В частности, была проанализирована способность антител вызывать регрессию опухолей в клетках BJAB с люциферазой (линия клеток лимфомы Беркитта, стабильно трансфицированных FcRH5 человека).

После трансфекции pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки BJAB с люциферазой и пуромицином (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были подвергнуты аутоклонированию с использованием FACS для экспрессии среднего масштаба с антителами к FcRH5 (7D11). После аутоклонирования, линия клеток BJAB с люциферазой, экспрессирующих FcRH5 (экспрессия близко напоминает экспрессию плазмацитами, как это определено FACS-анализом), была выбрана в ходе FACS-анализа с использованием антител к FcRH5 (7D11). В качестве отрицательного контроля клетки BJAB с люциферазой были трансфицированы пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe.

Для анализа эффективности мышинных антител, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 BJAB-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мыши CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 128 мм^3 в среднем. День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $100\text{-}250 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Группы из 8 мышей были подвергнуты лечению с еженедельным введением внутривенной (в/в) дозы 400 мкг антитела-препарата/ м^2 мыши (что соответствует $\sim 8\text{-}10 \text{ мг}$ КАП/кг мыши) с КАП к FcRH5 или контрольными конъюгатами антитело-препарат на день 0 и день 7. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась один раз в неделю в течение всего эксперимента. Перед тем, как размер опухоли достиг 2000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Линкеры, используемые между антителом и токсином, были представлены тиоэфирным кросслинкером SMCC для DM1. Дополнительные линкеры могут включать дисульфидный линкер SPP или тиоэфирный кросслинкер SMCC для DM1 или MC, или MC-валин-цитруллин(vс)-PAB, или (валин-цитруллин (vс)) дипептидный линкерный реагент), имеющий малеимидный компонент и пара-аминобензилкарбамоил (PAB) саможертвующий компонент для монометилауристатина E (MMAE) или монометилауристана F (MMAF). Используемые токсины были представлены DM1.

Дополнительные токсины могут включать MMAE или MMAF. Антитела для данного эксперимента включали mu7D11, описанное в Chang et al. PCT/US2004/043514 (WO 2005/063299) (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки), а также описанное здесь антитело к FcRH5 (см. Пример 1B, такое как mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9, and mu9E2).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе gp-120 (SMCC-DM1).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты BJAB-FcRH5

На 48 день использования конъюгатов антител к FcRH5 mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9 и mu9E2 и препаратов в указанных дозах, отмечалось ингибирование роста опухоли у мышей SCID с опухолями BJAB-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем gp-120 SMCC-DM1. КАП вводился в двух дозах (как это указано ниже в Таблице 11) на день 0 и день 7 для всех КАП и контроля. В частности, все КАП к FcRH5 значительно ингибировали рост опухоли (Фигура 26).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 17 дней. Результаты (Фигура 27) показали, что введение таких КАП с мышинным антителом к FcRH5 не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 11 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО= количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 11

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата - DM1 (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Mu-anti-gp120	8/8	0	0	--	10,8	--
Mu-anti-gp120-mcc-dm1	8/8	0	0	400	8,4	3,2
Mu-anti-FcRH5 (7D11)	8/8	0	0	--	10,8	--
Mu-anti-FcRH5 (7D11)-mcc-dm1	8/8	0	0	400	9	3
Mu-anti-FcRH5 (6H1)-mcc-dm1	6/8	1	2	400	10,8	2,5
Mu-anti-FcRH5 (10A8)-mcc-dm1	7/8	3	1	400	10	2,7
Mu-anti-FcRH5 (13G9)-mcc-dm1	7/8	0	1	400	8,4	3,2
Mu-anti-FcRH5 (9E2)-mcc-dm1	8/8	2	0	400	10,4	2,6

ПРИМЕР 5: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами ТиоМАТ к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгатов ТиоМАТ hu10A8 - препаратов с конъюгатами MC-vc-PAV-MMAE и hu10A8 -препарат с SPDB-DM4, было проанализировано влияние конъюгатов ТиоМАТ 10A8-препарат и конъюгатов 10A8-препарат на опухоли у мышей.

В частности, была проанализирована способность антител вызывать регрессию опухолей в клетках OPM2 (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека).

После трансфекции линеаризованным pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки OPM2 и селекции с использованием пуромицина (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были сепарированы на клетки, экспрессирующие FcRH5 и меченые биотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, и микрогранулы MACS с антителом к биотину с использованием колонки MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Экспрессия FcRH5 после сепарации была подтверждена FACS-анализу с использованием антител к FcRH5 (10A8) и линии клеток OPM2, трансфицированных пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe (отрицательный контроль).

Для анализа эффективности конъюгатов ТиюМАТ hu10A8-препарат с конъюгатами MC-vc-PAB-MMAE и hu10A8-препарат с SPDB-DM4, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были

инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 OPM2-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мыши CB17 ICR SCID, при этом

ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 180 мм^3 в среднем.

День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $100\text{--}250 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая и/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью

штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Группы из 8 мышей были подвергнуты введению однократной внутривенной (в/в) дозы 2, 4 или 8 мг КАП/кг с использованием КАП к FcRH5 или контрольных конъюгатов антитело-препарат. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась один раз в неделю в течение всего эксперимента. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4 and MC-vc-PAB-MMAE).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты OPM2-FcRH5

В течение 35-дневного периода использовались конъюгаты антитело-препарат и дозы, как это представлено в Таблице 12: hu10A8, конъюгированное с SPDB-DM4 (Hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4), и hu10A8 ТиюМАТ, конъюгированное с MC-vc-PAB-MMAE («thio-NC-hu-anti-FcRH5(10A8)-vc-E»), характеризовались ингибированием роста опухоли у мышей SCID с опухолями OPM2-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с SPDB-DM4 (Hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4), и гуманизированным тиомоноклональным антителом к HER2 (4D5), конъюгированным с MC-vc-PAB-MMAE («thio-hu-anti-HER2 (4D5)-vc-E»). КАП вводился в однократной дозе (как это указано ниже в Таблице 12) на день 0 для всех КАП и контроля. В частности, все КАП к FcRH5 и гуманизированные КАП ТиюМАТ к FcRH5 значительно ингибировали рост опухоли (Фигура 28). Конъюгаты с основой на антителе к HER2, использовались в качестве отрицательного контроля («Thio-hu-anti-Her2 (4D5)-vc-E» и «Anti-Her2 (4D5)-spdb-dm4»).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 14 дней. Результаты

(Фигура 29) показали, что введение таких гуманизированных антител к FcRH5 и КАП с гуманизированным ТиоМАТ к FcRH5 не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 12 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 12

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата - DM4 или MMAE (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель*	8/8	0	0	н/п	--	н/п
Thio-hu-anti-Her2 (4D5)-vc-E	8/8	0	0	227	8	1,9
Anti-Her2 (4D5)-spdb-dm4	8/8	0	0	196	4	3,02
Thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	7/8	2	1	112	4	1,94

Thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	6	1	224	8	1,94
Thio-LC(L205C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	4	0	109	4	1,89
Thio-LC(L205C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	3	1	218	8	1,89
Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4	8/8	2	1	98	2	3,13
Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4	2/8	2	6	196	4	3,13

*Носитель = 20 мМ гистидина ацетата, pH 5,5, 240 мМ сахарозы, 0,02% ПС20

ПРИМЕР 6: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с SPDB-DM4 («hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4») в различных дозах, были проанализированы эффекты конъюгированного антитела на опухоли у мышей.

В частности, была проанализирована способность антител вызывать регрессию опухолей в клетках OPM2 (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека).

После трансфекции линейаризованным pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки OPM2 и селекции с использованием пуромицина (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были сепарированы на клетки, экспрессирующие FcRH5 и меченые биотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, и микрогранулы MACS с антителом к биотину с использованием колонки MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Экспрессия FcRH5 после сепарации была подтверждена FACS-анализом с использованием антител к FcRH5 (10A8) и линии клеток OPM2, трансфицированных пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe (отрицательный контроль).

Для анализа эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с SPDB-DM4, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 OPM2-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мышцы CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 180 мм³ в среднем.

День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно 100-250 мм³, и когда была введена первая и/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью

штангенциркуля, и выражался в мм³ в соответствии с формулой: $V=0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Группы из 9 мышей были подвергнуты введению однократной внутривенной (в/в) дозы, варьирующей от 0,5 до 12 мг КАП/кг с использованием КАП к FcRH5 или контрольных конъюгатов антитело-препарат. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась один раз в неделю в течение всего эксперимента. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм³, или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб)) (SPDB-DM4).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты OPM2-FcRH5

В ходе 50-дневного периода использовались конъюгаты антитело-препарат и дозы, как это представлено в Таблице 13: гуманизированное антитело к FcRH5 (10A8) (hu10A8), конъюгированное с SPDB-DM4 («hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4»), ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями OPM2-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с SPDB-DM4 («hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4»). КАП вводился в однократной дозе (как это указано ниже в Таблице 13) на день 0 для всех КАП и контроля. В частности, доза 8 мг/кг и 12 мг/кг КАП гуманизированного антитела к FcRH5 значительно ингибировала рост опухоли (Фигура 30a).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 14 дней. Результаты (Фигура 30b) показали, что введение таких гуманизированных антител к FcRH5 и КАП с гуманизированным ТиоМАТ к FcRH5 не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 13 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 13

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата - DM4 (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель*	9/9	0	0	н/п	н/п	н/п
Hu-Anti-Her2-SPDB DM4	9/9	0	0	587	12	3,02
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	30	0,5	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	60	1	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	119	2	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	2	1	238	4	3,8

Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	1/8	1	8	477	8	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	0/9	4	9	715	12	3,8
*Носитель = 20 мМ гистидина ацетата, pH 5,5, 240 мМ сахарозы, 0,02% ПС20						

ПРИМЕР 7: Анализ снижения пролиферации клеток *in vitro* с использованием конъюгатов ТиоМАТ к FcRH5-антителу

С использованием анализа пролиферации клеток и трансфицированной линии клеток OPM2, стабильно экспрессирующих FcRH5 человека (OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP2), была измерена *in vitro* способность конъюгатов антител hu10A8 и hu10A8 thioMAb (HC(A118C) с препаратом (включая hu anti-FcRH5 (10A8)-несвязанное, thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-несвязанное, hu anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4, thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE)). Анализ жизнеспособности клеток с использованием свойства люминесценции CellTiter-Glo® представлен на рынке (Promega Corp., Madison, WI) и является однородным способом анализа, основанным на рекомбинантной экспрессии люциферазы жесткокрылых (US 5583024; US 5674713; US 5700670). Такой анализ пролиферации клеток определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, являющегося индикатором метаболически активных клеток (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993); US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводился с использованием 96 лунок, обеспечивая возможность проведения автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995)). Процедура однородного анализа включает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo®) непосредственно в клетки, культивируемые в среде с добавленной сывороткой.

Однородный формат «добавление-смешивание-измерение» приводит к лизису клеток и получению люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТФ. Субстрат (люциферин жука) подвергается окислительному декарбоксилированию рекомбинантной люциферазой светлячка с сопутствующим переходом АТФ в АМФ и генерацией фотонов. Жизнеспособные клетки выражаются в относительных единицах люминесценции (ОЕЛ). Данные могут быть записаны с использованием люминометра или ПЗС-камеры для формирования видеосигналов. В течение времени измеряется выходная мощность люминесценции, выраженная в виде ОЕЛ. %ОЕЛ является нормализованным процентным показателем ОЕЛ в сравнении с контролем «конъюгата без препарата». С другой стороны, фотоны в ходе люминесценции могут быть подсчитаны сцинтиллятором в присутствии сцинтиллянта. Единицы света могут быть представлены в виде числа импульсов в секунду.

Эффективность конъюгатов гуманизированного антитела-препарат была измерена в ходе анализа пролиферации клеток с соблюдением протокола, адаптированного из анализа жизнеспособности клеток с использованием свойства люминесценции CellTiter-Glo® (Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)):

1. Аликвота 50 мкл культуры клеток, содержащая примерно 75000 клеток OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP2 в среде была помещена в каждую лунку 96-луночного матового планшета.

2. hu10A8 или thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8) или КАП (50 мкл) были добавлены в трехкратных повторностях в экспериментальные лунки для получения конечной концентрации 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 14, 4,6 или 1,5 нг/мл, при этом в лунки с контролем «конъюгата без препарата» была добавлена только среда; инкубация проводилась в течение 3 дней.

3. Температура лунок была уравновешена до комнатной температуры в течение

примерно 30 минут.

4. Был добавлен реагент CellTiter-Glo (100 мкл).

5. Содержимое было перемешано в течение 2 минут с использованием орбитальной мешалки для индуцирования лизиса клеток.

5 6. Планшет был инкубирован при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала.

7. Люминесценция была записана и указана на графиках в виде %ОЕЛ (относительные единицы люминесценции).

8. В качестве контроля эта же линия клеток параллельно анализировалась с нерелевантными несвязывающими антителами hu-anti-Her2.4D5 или КАП (включая hu-anti-Her2.4D5-несвязанное, hu-anti-Her2.4D5.НC.A118C-несвязанное hu anti-Her2.4D5-SPDB-DM4, hu anti-Her2.4D5.НC.A118C-MC-vc-PAB-MMAE).

Носитель: клетки OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP2, выращенные в RPMI1640/20%ФБС/2 мМ глутамин/1,0 мкг/мл пуромицина.

15 Эффективность конъюгатов мышиных антител и препарата представлена на Фигурах 31 и 32. Результаты такого анализа указаны в мг/мл в виде IC50. IC50 является концентрацией антитела или КАП, которая необходима для 50% ингибирования роста клеток. Неконъюгированные hu10A8 и thio-hu anti-FcRH5 (10A8)-НC(A118C) не ингибировали рост клеток OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP2 *in vitro* со значением IC50 10 мг/мл (верхний предел титрации концентрации в ходе анализа). Hu anti-FcRH5(10A8)-SPDB-DM4 и thio-hu anti-FcRH5(10A8)-НC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE приводили к ингибированию роста клеток OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP2 со значением IC50 0,03 и 0,04 мг/мл, соответственно. Кроме того, hu anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4 вызывает полное ингибирование роста клеток OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP2 при более высоких

20 концентрациях. Из контрольных антител и КАП, только hu anti-Her2.4D5-SPDB DM4 ингибировало рост клеток OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP2 со значением IC50 1,8 мг/мл. Поскольку SPDB DM4 является расщепляемым линкером-препаратом, такое ингибирование роста является, по всей вероятности, «фоновой» активностью препарата.

25 **ПРИМЕР 8: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат**

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгата гуманизированного антитела (10A8)-препарата (hu Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE) в комбинации с Велкаде® (бортезомибом), были проанализированы эффекты конъюгированного антитела в виде

35 монотерапии или в сочетании с Велкаде® на опухоли (ксенотрансплантат множественной миеломы OPM2-FcRH5) у мышей.

В частности, была проанализирована способность антитела и Велкаде® вызывать регрессию опухолей в клетках OPM2 (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека). После трансфекции линейаризованным

40 pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки OPM2 и селекции с использованием пуромицина (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были сепарированы на клетки, экспрессирующие FcRH5 и меченые биотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, и микрогранулы MACS с антителом к биотину с использованием колонки MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Экспрессия FcRH5 после сепарации была

45 подтверждена FACS-анализом с использованием антител к FcRH5 (10A8) и линии клеток OPM2, трансфицированных пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe (отрицательный контроль).

Для анализа эффективности конъюгатов hu anti-FcRH5 10A8 с MC-vc-PAB-MMAE в

виде монотерапии и в комбинации с Велкаде®, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 OPM2-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мыши CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 331 мм^3 в среднем. День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $172\text{-}511 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая и/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Мыши были рандомизированы в девять групп по 9 мышей в каждой, после чего мышам была введена доза. Группа 1 получила однократное внутривенное (в/в) введение буфера гистидина на день 0 плюс в/в введение 0,9% натрия хлорида (физиологического раствора) два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10 вместе с контролем носителя. Группа 2 получила однократное в/в введение 10 мг/кг hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1135, на день 0 в качестве контрольного конъюгата. Группа 3 получала в/в введения 1 мг/кг Велкаде® два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Группы 4-5 получили однократное в/в введение 4 или 10 мг/кг thio hu anti-FcRH5(10A8)-НС-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1465, соответственно, на день 0. Группы 6-7 получили однократное в/в введение 4 или 10 мг/кг hu anti-FcRH5(10A8)-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1575, соответственно, на день 0. Группа 8 получила однократное в/в введение 4 мг/кг hu anti-FcRH5(10A8)-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1575, на день 0 плюс в/в инъекции 1 мг/кг Велкаде® два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась два раза в неделю в течение первых трех недель. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (МС-vc-РАВ-ММАЕ).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты OPM2-FcRH5

В ходе 45-дневного периода использовались конъюгаты препарата в виде монотерапии или в комбинации с Велкаде®: hu10A8 конъюгированное с -МС-vc-РАВ-ММАЕ (hu anti-FcRH5(10A8)-МС-vc-РАВ-ММАЕ и комбинированное с Велкаде® ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями OPM2-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем, гуманизированным антителом к Her2, конъюгированным с -МС-vc-РАВ-ММАЕ (Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ) (Фигура 39). КАП вводились в виде однократной дозы на день 0 для всех конъюгатов препарата и контроля. Препарат Велкаде® вводился два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Кроме того, 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ в комбинации с 1 мг/кг препарата Велкаде® значительно ингибировал рост опухоли в сравнении с группами монотерапии с Thio Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ в дозе 4 и 10 мг/кг, Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ в дозе 4 и 10 мг/кг, и Велкаде® в дозе 1 мг/кг (Фигура 39).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 24 дней (Фигура 40). Результаты показали, что введение Велкаде® вызывало существенное снижение массы тела или потерю массы тела в ходе лечения, но после прекращения введения доз вес был восстановлен.

Более того, в Таблице 14 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 14						
Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата ММАЕ (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель*	9/9	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	432	10	2,9
Велкаде®	9/9	0	0	Н/П	1	Н/П
Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	112	4	1,94
Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	3	0	280	10	1,94
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	198	4	3,44
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	6	0	496	10	3,44
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE (4 мг/кг) + Велкаде® (1 мг/кг)	7/8	6	3	496	4/1	3,44 / Н/П
*Носитель = 20 мМ гистидина ацетата, pH 5,5, 240 мМ сахарозы, 0,02% ПС20						

ПРИМЕР 9: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгата гуманизированного антитела (10A8)-препарата (hu Hu Anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4) в комбинации с Велкаде®, были проанализированы эффекты конъюгированного антитела в виде монотерапии или в сочетании с Велкаде® на опухоли (ксенотрансплантат множественной миеломы OPM2-FcRH5) у мышей.

В частности, была проанализирована способность антитела и Велкаде® вызывать регрессию опухолей в клетках OPM2 (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека). После трансфекции линейаризованным pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки OPM2 и селекции с использованием пурамицина (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были сепарированы на клетки, экспрессирующие FcRH5 и меченые биотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, и микрогранулы MACS с антителом к биотину с использованием колонки MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Экспрессия FcRH5 после сепарации была подтверждена FACS-анализом с использованием антител к FcRH5 (10A8) и линии клеток OPM2, трансфицированных пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe (отрицательный контроль).

Для анализа эффективности конъюгатов hu anti-FcRH5 10A8 с -SPDB-DM4 в виде монотерапии и в комбинации с Велкаде®, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы

подкожно с использованием 2×10^7 OPM2-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мышцы CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 306 мм^3 в среднем. День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $197\text{--}499 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая и/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где a и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Мыши были рандомизированы в шесть групп по 9 мышей в каждой, после чего мышам была введена доза. Группа 1 получала в/в введения 1 мг/кг Велкаде® два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Группа 2 получила однократное внутривенное (в/в) введение буфера гистидина на день 0 плюс в/в введение 0,9% натрия хлорида (физиологического раствора) два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10 вместе с контролем носителя. Группа 3 получила однократное в/в введение 4 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4, CNJ 1433, на день 0 в качестве контрольного конъюгата. Группа 4 получила однократное в/в введение 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8 SPDB-DM4, CNJ 1503, на день 0. Группа 5 получила однократное в/в введение 4 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4, CNJ 1433, на день 0 плюс в/в инъекции 1 мг/кг Велкаде® два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Группа 6 получила однократное в/в введение 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8 SPDB-DM4, CNJ 1503, на день 0 плюс в/в инъекции 1 мг/кг Велкаде® два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась два раза в неделю в течение первых трех недель. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты OPM2-FcRH5

В ходе 37-дневного периода использовались конъюгаты антитело-препарат и дозы, как это представлено в Таблице 13: гуманизированное антитело к FcRH5 (10A8) (hu10A8), конъюгированное с -SPDB-DM4 (Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4) в комбинации с Велкаде®, ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями OPM2-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с -SPDB-DM4 (Hu anti-Her2 трастузумаб- SPDB-DM4) (Фигура 41). КАП вводились в виде однократной дозы на день 0 для всех конъюгатов препарата и контроля. Препарат Велкаде® вводился два раза в неделю в течение двух недель на дни 0, 3, 7 и 10. Кроме того, 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 в комбинации с 1 мг/кг Велкаде® значительно ингибировали рост опухоли в сравнении с группами монотерапии, принимающими Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 в дозе 4 мг/кг и Велкаде® в дозе 1 мг/кг, а также группой комбинированной терапии, принимающей Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4 плюс Велкаде® в дозе 1 мг/кг. (Фигура 41).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 21 дня (Фигура 42).

Результаты показали, что введение таких КАП с гуманизированным антителом к FcRH5 и Велкаде® не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 15 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР, когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 15

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата DM4 (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Велкаде®	8/8	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Носитель*	9/9	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-SPDB-DM4	8/8	0	0	195	4	3,02
Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 мг/кг	9/9	1	0	238	4	3,8
Hu anti-Her2 Трастузумаб-SPDB-DM4 + Велкаде®	8/8	0	0	195 / Н/П	4/1	3,02 / Н/П
Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 06 + Велкаде®	1/9	1	8	238 / Н/П	4/1	3,8 / Н/П

*Носитель = 20 мМ гистидина ацетата, pH 5,5, 240 мМ сахарозы, 0,02% ПС20

ПРИМЕР 10: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгата гуманизированного антитела (10A8)-препарата (Hu Anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE) в комбинации с препаратами Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон, были проанализированы эффекты конъюгированного антитела в виде монотерапии или в сочетании с препаратами Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон на опухоли (ксенотрансплантат множественной миеломы OPM2-FcRH5) у мышей.

В частности, была проанализирована способность антитела и препаратов Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон вызывать регрессию опухолей в клетках OPM2 (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека). После трансфекции линейризованным pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 в клетки OPM2 и селекции с использованием пурамицина (Calbiochem, San Diego, CA), выжившие клетки были сепарированы на клетки, экспрессирующие FcRH5 и меченые биотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, и микрогранулы MACS с антителом к биотину с использованием колонки MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Экспрессия FcRH5 после сепарации была подтверждена FACS-анализом с использованием антител к FcRH5 (10A8) и линии клеток OPM2, трансфицированных пустым вектором pRK.CMV.PD.nbe (отрицательный контроль).

Для анализа эффективности конъюгатов hu anti-FcRH5 10A8 с -MC-vc-PAB-MMAE в виде монотерапии и в комбинации с препаратами Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10⁷ OPM2-FcRH5 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мышцы CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 446 мм³ в среднем. День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно

263-630 мм³, и когда была введена первая/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм³ в соответствии с формулой: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Мыши были рандомизированы в девять групп по 8 мышей в каждой, после чего мышам была введена доза. Группа 1 получала ежедневно интраперитонеальные (и/п) инъекции смеси ДМСО и буфера МСТ на дни 0-13 в качестве контрольного носителя. Группа 2 получила однократное в/в введение 6 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1135, на день 0 в качестве контрольного конъюгата. Группа 3 получила однократное в/в введение 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1672, на день 0. Группа 4 получала ежедневные и/п инъекции 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13. Группа 5 принимала ежедневно пероральную (п/о) дозу 3 мг/кг дексаметазона в течение 4 дней, затем было 3 дня перерыва, в ходе 2 циклов на дни 0-3 и 7-10. Группа 6 получала ежедневно и/п инъекции 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13 плюс ежедневную п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона в течение 4 дней, затем было 3 дня перерыва, в ходе 2 циклов на дни 0-3 и 7-10. Группа 7 получала однократную в/в инъекцию 6 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1135, на день 0 плюс получала ежедневно и/п инъекции 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13 плюс ежедневную п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона в течение 4 дней, затем было 3 дня перерыва, в ходе 2 циклов на дни 0-3 и 7-10. Группа 8 получала однократную в/в инъекцию 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1672, на день 0 плюс получала ежедневно и/п инъекции 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13 плюс ежедневную п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона в течение 4 дней, затем было 3 дня перерыва, в ходе 2 циклов на дни 0-3 и 7-10. Группа 9 получила однократное в/в введение 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ, CNJ 1672, на день 0 плюс получала ежедневно и/п инъекции 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась два раза в неделю в течение всего эксперимента. Если у мышей отмечалась потеря массы тела более чем на 15% в сравнении с массой тела на день 0, мыши подвергались ежедневному взвешиванию до тех пор, пока вес не был восстановлен или до тех пор, пока потеря массы тела не превышала 20%. После того, как потеря массы тела мышей достигала более 20% в сравнении с их массой тела на день 0, до достижения объема опухоли 3000 мм³, или опухоль имела признаки опасного изъязвления, мыши подвергались эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (МС-vc-РАВ-ММАЕ).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты OPM2-FcRH5

В ходе 38-дневного периода использовались конъюгаты антител и препаратов Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон: гуманизированное антитело к FcRH5 (10A8), конъюгированное с -МС-vc-РАВ-ММАЕ (Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ) в комбинации с препаратами Ревлимид® и Ревлимид® плюс дексаметазон ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями OPM2-FcRH5 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с -МС-vc-РАВ-ММАЕ (Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ). (Фигура 43). КАП вводились

в виде однократной дозы на день 0 для всех конъюгатов препарата и контроля. Ревлимид® вводился в виде ежедневных и/п инъекций в дозе 50 мг/кг препарата Ревлимид® на дни 0-13. Дексаметазон принимался ежедневно перорально (п/о) в течение 4 дней, затем было 3 дня перерыва, в ходе 2 циклов на дни 0-3 и 7-10. Кроме того, 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ в комбинации с 50 мг/кг препарата Ревлимид® и 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ в комбинации с 50 мг/кг препарата Ревлимид® плюс 3 мг/кг дексаметазона существенно ингибировал рост опухоли в сравнении с группами приема монотерапии, принимающими 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ, 50 мг/кг препарата Ревлимид® (леналидомид) и 3 мг/кг дексаметазона. (Фигура 43).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 17 дней (Фигура 44). Результаты показывают, что введение препаратов дексаметазон и Ревлимид® вызывало значительное снижение массы тела или потери веса.

Более того, в Таблице 16 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 16

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата ММАЕ (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель (ДМСО + буфер МСТ)	7/7	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ (однократно в/в)	8/8	0	0	259	6	2,9
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ (однократно в/в)	7/7	2	0	294	6	3,4
Ревлимид (ip qdX13)	4/4	0	0	Н/П	50	Н/П
Дексаметазон (po qdX4 в течение 3 циклов при графике 4/3/4/3/4)	5/5	0	0	Н/П	3	Н/П
Ревлимид + Дексаметазон	5/5	3	0	Н/П	50/3	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАЕ + Ревлимид, + Дексаметазон	6/6	4	0	259	6/50/3	108
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ + Ревлимид + Дексаметазон	4/4	8	0	294	6/50/3	3,4
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ + Ревлимид	4/4	8	0	294	6/50	3,4

Изложенный выше текст заявки на изобретение считается достаточным для практического использования изобретения специалистом в данной области. Данное изобретение не ограничивается в своей области применения представленными примерами, поскольку представленные варианты воплощения изобретения являются одиночными иллюстрациями отдельных аспектов изобретения, и любые другие варианты воплощения изобретения, являющиеся функционально эквивалентными, находятся в пределах области применения изобретения. Представленный здесь материал не является признанием того, что представленное письменное описание не обеспечивает практического применения любого аспекта изобретения, включая наилучший способ, а также такой материал не должен рассматриваться в качестве ограничения области применения формул изобретения представленными здесь описаниями. Наоборот, различные модификации изобретения, кроме представленных и описанных в тексте

данной заявки, будут очевидны специалисту в данной области, исходя из представленного выше описания, и будут включены в область применения заявленной формулы изобретения.

Пример 11: Получение и характеристика биспецифических антител к FcRH5

Разработка и получение биспецифических антител к CD3/FcRH5 Разработка биспецифического антитела к FcRH5, в частности, антитела с выпуклостями CD3/FcRH5, описана ниже.

Ранее были описаны различные другие биспецифическое антитела с выпуклостями. См., например, патенты США No. 5731168 и 7183076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998). В определенных вариантах воплощения изобретения взаимосвязь C_H3 между гуманизированного химерного антитела к CD3/CD4-IgG, описанного ранее Chamow et al. J. Immunol. 153:4268 (1994), была разработана для максимального процентного повышения гетеромультимеров, которые можно восстановить из линий клеток млекопитающих, котрансфицированных векторами экспрессии. В контексте данного изобретения термин «гетеромультимер» относится к молекуле, например, биспецифическому антителу, которая состоит из, по меньшей мере, одного полипептида и второго полипептида, при этом второй полипептид отличается по своей аминокислотной последовательности от первого полипептида, по меньшей мере, одним аминокислотным остатком.

Как это описано в документах, приведенных в абзаце выше, стратегия использования образования гетеродимера основана на введении одной или нескольких «протуберантных» мутаций в первый полипептид, например, домен C_H3 Н цепи антитела, и также введение одной или нескольких «полостных» мутаций во второе антитело, например, домен C_H3 Н цепи второго антитела. «Протуберантная» мутация позволила заменить небольшую аминокислоту большей аминокислотой, и «полостная мутация» заменила большую аминокислоту меньшей аминокислотой. Далее, кроме полостных мутаций, на поверхность взаимодействия двух полипептидов, например, двух доменов C_H3, были введены несвязанные тиол-содержащие остатки, что, как было доказано, повысит образование гетеромультимеров. Были описаны различные типичные полостные мутации и внедрение несвязанных тиол-содержащих остатков в полипептид. См., например, патенты США No. 5731168 и 7183076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998).

Для получения биспецифического антитела к CD3/FcRH5 проводятся следующие этапы. Конструируют плазмиды для экспрессии *E. coli*, кодирующие гуманизированные варианты легкой (L) и тяжелой (H) цепей моноклонального мышинового антитела к CD3 UCHT1 (патенты США No. 5821337 и 6407213; Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217 [1992] и Rodrigues et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 45 [1992]). Науке известно много подходящих плазмид для экспрессии *E. coli*, включая pAK19. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992). Мутации, позволяющие образовать в домене C_H3 цепи Н гуманизированного антитела к CD3 бугорок или полость (как это описано выше), осуществляются, например, сайт-специфическим мутагенезом. Науке известны различные способы сайт-специфического мутагенеза. См., например, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987). Кроме того, разработаны плазмиды *E. coli* для экспрессии, кодирующие легкую и тяжелую цепи гуманизированного антитела к FcRH5 (такие легкие и тяжелые цепи гуманизированного антитела к FcRH5 описаны в данной заявке на изобретение).

Мутации, в ходе которых в C_H3 домене Н цепи гуманизированного антитела к FcRH5 образуется соответствующая полость (если домен C_H3 антитела к CD3 имеет протуберантную мутацию) или соответствующий бугорок (если домен C_H3 антитела к CD3 имеет полостную мутацию), осуществляются с использованием, например, сайт-специфического мутагенеза.

Биспецифические антитела к CD3/FcRH5 получают путем трансформации описанных выше плазмид экспрессии *E. coli* в соответствующий штамм *E. coli*, например, 33B6, с использованием известных науке способов. См., например, Rodrigues et al., Cancer Res. 55:63-70 (1995). Антитело секретируется трансформированным штаммом *E. coli*, выращенным в 10 л ферментаторе, как это было описано ранее. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992). Антитела очищают и анализируют с использованием известных науке способов. См., например, Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997).

Анализ связывания клеток: для оценки способности биспецифических антител к CD3/FcRH5 связываться с Т-клетками и В-клетками, белые кровяные клетки периферической крови человека выделяют из цельной крови здоровых доноров с использованием градиента Фиколла в соответствии со стандартными и известными науке процедурами. Примерно 1 миллион клеток инкубируют с биспецифическим антителом к CD3/FcRH5 на льду в буфере, содержащем 0,5 БСА и 2 мМ ЭДТА в ФСБ. Затем клетки промывают и окрашивают фрагментом антитела козы (Fab')₂ к IgG человека, конъюгированным с флуоресцеина изотиоцианатом, вместе с антителами к CD8-APC, CD138-PE и CD38-PerCP-Cy5 с соблюдением протокола производителя (BD Biosciences, San Diego, CA). Активность связывания оценивали с использованием FACS-анализа и проточного цитометра FACSCaliburTM (BD Biosciences, San Diego, CA), и такой анализ проводился с использованием программного обеспечения Flowjo (Tree Star, Ashland, OR).

Анализ гибели клеток *in vitro*: клетки множественной миеломы EJM-FcRH5.LSP2 (клетки EJM, DSMZ ACC-560, стабильно трансфицированные FcRH5 человека) использовались в качестве клеток-мишеней и подлежали совместному культивированию с белыми кровяными клетками периферической крови человека или CD8+ Т-клетками. При использовании CD8+ Т-клеток, такие клетки очищают от МПКК человека путем отрицательной сортировки с использованием набора для выделения CD8+ Т-клеток (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) и 96-луночного круглодонного планшета. 20000 EJM-FcRH5.LSP2 клеток добавляют в каждую лунку при соотношении мишень : эффекторные клетки = 1:10, с/без биспецифического антитела к CD3/FcRH5. Спустя примерно 19 часов, клетки окрашивают меченым антителом CD38-FITC и CD138-PE в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences, San Diego, CA) и смешивают с микросферами Fluoresbrite® Calibration Grade 6.0 Micron YG (Polysciences, Inc., Warrington, PA). FACS-анализ проводился путем установки дискриминационного окна вперед/в сторону от направления рассеивания и окрашивания CD38-CD138. Мертвые клетки исключают с использованием окрашивания пропидиниум йодидом с соблюдением стандартных процедур. Специфическая активность биспецифического антитела к CD3/FcRH5 относительно клеток рассчитывается в соответствии со следующим уравнением: % специфической гибели = (1 - количество живых клеток EJM-FcRH5.LSP2 с воздействием / количество живых клеток EJM-FcRH5.LSP2 в эффекторе и EJM-FcRH5.LSP2 без биспецифического антитела к CD3/FcRH5) × 100.

Эффективность *in vivo*: клетки множественной миеломы EJM-FcRH5.LSP2 смешивают с моноклеарными клетками периферической крови и вводят подкожно с правой стороны в области груди самкам мышей NOD.CD17-Prkdc^{scid}/J (Charles Rivers Laboratories,

Wilmington, MA). Инокулированных мышей затем разделяют случайным образом в группы контроля и лечения. Группам контроля вводят носитель или контрольное биспецифическое антитело к CD3/Her2. Группам лечения вводят биспецифическое антитело к CD3/FcRH5. Биспецифические антитела вводят в диапазоне дозы от 0,01 до 10 мг/кг. Контроль или лечение вводят внутривенно в течение 1-2 часов после инокуляции и повторяют ежедневно в течение последующих 5 дней. Опухоль измеряют в двух размерах (длина и ширина) с использованием штангенциркуля два раза в неделю. Мыши подлежат клиническому мониторингу два раза в неделю. По окончании эксперимента, размер опухоли в группе контроля сопоставлялся с размером опухоли в группе лечения биспецифическим антителом к CD3/FcRH5 для оценки эффективности лечения биспецифическим антителом к CD3/FcRH5.

ПРИМЕР 12: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с MC-vc-PAB-MMAE («hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE») в различных дозах, были проанализированы эффекты конъюгированного антитела на опухоли у мышей.

В частности, была проанализирована способность антител вызывать регрессию опухолей в клетках EJM (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека).

Клетки EJM (ACC-560) являются представленными на рынке клетками линии множественной миеломы человека, представленными компанией DSMZ (Германия). Поскольку клетки EJM не экспрессируют эндогенно FcRH5, такие клетки были стабильно трансфицированы FcRH5 человека, что привело к возникновению линии клеток EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP2.

Для анализа эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с MC-vc-PAB-MMAE, самки мышей CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 EJM2-FcRH5.LSP2 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мыши CB17 ICR SCID, при этом ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 134 мм^3 в среднем.

День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $100\text{-}250 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V=0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Группы из 8 мышей были подвергнуты введению однократной внутривенной (в/в) дозы, варьирующей от 1 до 8 мг КАП/кг с использованием КАП к FcRH5 или контрольных конъюгатов антитело-препарат. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась один раз в неделю в течение 2 недель. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (MC-vc-PAB-MMAE).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты EJM-FcRH5.LSP2

В ходе 80-дневного периода использовались конъюгаты антитело-препарат и дозы, как это представлено в Таблице 17: гуманизированное антитело к FcRH5 (10A8) (hu10A8), конъюгированное с MC-vc-PAB-MMAE («hu-anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE»), ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями EJM-FcRH5.LSP2 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с MC-vc-PAB-MMAE («Hu-anti-HER2 (4D5)-MC-vc-PAB-MMAE»). КАП вводились в виде однократной дозы на день 0 для всех КАП и контроля. В частности, все уровни доз гуманизированных КАП к FcRH5 значительно ингибировали рост опухоли (Фигура 45).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 7 дней. Результаты (Фигура 46) показали, что введение таких КАП с гуманизированным антителом к FcRH5 не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 17 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм³) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 17

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата - DM1 (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель*	8/8	0	0	н/п	н/п	н/п
Hu-Anti-Her2-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	0	0	346	8	2,9
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	4/6	1	2	49	1	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	3/5	2	3	98	2	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	7	1	196	4	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	1/5	2	6	392	8	3,4

*Носитель = 20 mM гистидина ацетата, pH 5,5, 240 mM сахарозы, 0,02% ПС20

ПРИМЕР 13: Анализ ингибирования роста опухоли *in vivo* конъюгатами гуманизированного антитела к FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантаты

Для исследования эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с SPDB-DM4 («hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4») в различных дозах, были проанализированы эффекты конъюгированного антитела на опухоли у мышей.

В частности, была проанализирована способность антител вызывать регрессию опухолей в клетках EJM (линия клеток множественной миеломы, стабильно трансфицированных FcRH5 человека).

Клетки EJM (ACC-560) являются представленными на рынке клетками линии множественной миеломы человека, представленными компанией DSMZ (Германия). Поскольку клетки EJM не экспрессируют эндогенно FcRH5, такие клетки были стабильно трансфицированы FcRH5 человека, что привело к возникновению линии клеток EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP2.

Для анализа эффективности конъюгатов hu10A8-препарат с SPDB-DM4, самки мышей

CB17 ICR SCID (возраст 6-8 недель, получены от Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) были инокулированы подкожно с использованием 2×10^7 EJM2-FcRH5.LSP2 клеток посредством инъекции в боковую поверхность мышцы CB17 ICR SCID, при этом

ксенотрансплантационным опухолям дали вырасти до примерно 134 мм^3 в среднем.

День 0 относится ко дню, когда размер опухолей составлял примерно $100\text{-}250 \text{ мм}^3$, и когда была введена первая/или единственная доза, если не указано иное. Объем опухоли рассчитывался на основе двух размеров, измеренных с помощью штангенциркуля, и выражался в мм^3 в соответствии с формулой: $V=0,5 \times a \times b^2$, где а и b являются большим и меньшим диаметрами опухоли, соответственно. Данные, собранные для каждой экспериментальной группы, были выражены в виде среднего $\pm$ СО. Группы из 8 мышей были подвергнуты введению однократной внутривенной (в/в) дозы, варьирующей от 2 до 8 мг КАП/кг с использованием КАП к FcRH5 или контрольных конъюгатов антитело-препарат. Опухоли измеряли два раза в неделю в ходе всего эксперимента. Масса тела мышей измерялась один раз в неделю в течение 2 недель. Перед тем, как размер опухоли достиг 3000 мм^3 , или когда опухоли имели признаки угрожающего изъязвления, мыши были подвергнуты эвтаназии. Все протоколы для животных были утверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC).

Отрицательный контроль включал конъюгаты, основанные на антителе к HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4).

Б. Результаты

1. Ксенотрансплантаты EJM-FcRH5.LSP2

В ходе 24-дневного периода использовались конъюгаты антитело-препарат и дозы, как это представлено в Таблице 18: гуманизированное антитело к FcRH5 (10A8) (hu10A8), конъюгированное с SPDB-DM4 («hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4»), ингибировало рост опухоли у мышей SCID с опухолями EJM-FcRH5.LSP2 в сравнении с отрицательным контролем, т.е. гуманизированным антителом к HER2, конъюгированным с SPDB-DM4 («Hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4»). КАП вводились в виде однократной дозы на день 0 для всех КАП и контроля. В частности, доза 8 мг/кг гуманизированного КАП к FcRH5 значительно ингибировали рост опухоли (Фигура 47).

Кроме того, в этом же самом исследовании в каждой группе приема дозы было определено процентное изменение массы тела в течение первых 7 дней. Результаты (Фигура 48) показали, что введение таких КАП с гуманизированным антителом к FcRH5 не приводило к существенному снижению массы тела или потери массы тела в течение данного периода времени.

Более того, в Таблице 18 показано количество мышей из общего количества всех исследуемых мышей с достижением частичной регрессии (ЧР; когда объем опухоли в любое время после введения падал ниже 50% от объема опухоли, измеренного на день 0), полной ремиссии (ПР; когда объем опухоли в любое время после введения падал до 0 мм^3) (Н/П = не применимо); (КО = количество наблюдаемых опухолей на момент окончания исследования).

Таблица 18

Введенные антитела (лечение)	КО	ЧР	ПР	Доза препарата - DM1 (мкг/м ²)	Доза АТ (мг/кг)	Соотношение препарата (Препарат/АТ)
Носитель*	8/8	0	0	н/п	н/п	н/п
Hu-Anti-Her2-SPDB-DM4	8/8	0	0	391	8	3,02

Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	0	0	119	2	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	7/8	0	1	238	4	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	2	0	476	8	3,8
*Носитель = 20 мМ гистидина ацетата, pH 5,5, 240 мМ сахарозы, 0,02% PC20						

5

Формула изобретения

1. Выделенное моноклональное антитело к FcRH5 человека, содержащее:

(a) вариабельный домен легкой цепи, который содержит:

(i) HVR-L1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26;

10 (ii) HVR-L2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 27;

и

(iii) HVR-L3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 28;

и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит:

15 (i) HVR-H1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35;

(ii) HVR-H2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 36;

и

(iii) HVR-H3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37,

или его антигенсвязывающий фрагмент.

20 2. Антитело по п.1, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело представляет собой гуманизированное антитело.

25 4. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело представляет собой химерное антитело.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит последовательность каркасного участка и по меньшей мере часть последовательности каркасного участка представляет собой консенсусную последовательность каркасного участка человека.

30 6. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит к консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы I человека.

7. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит консенсусную последовательность каркасного участка подгруппы III тяжелой цепи человека.

8. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

35 9. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

10. Антитело по п.8, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

40 11. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело содержит один участок Fab, присоединенный к участку Fc.

12. Антитело по п.10, отличающееся тем, что антитело содержит CH1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и/или Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

45 13. Антитело по п.12, отличающееся тем, что антитело содержит CL1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

14. Антитело по п.1, отличающееся тем, что содержит один или более свободных остатков цистеина.

15. Антитело по п.14, отличающееся тем, что один или более свободных остатков

цистеина имеют значение реакционной способности тиоловой группы в диапазоне от 0,6 до 1,0.

16. Антитело по п.14, отличающееся тем, что один или более свободных остатков цистеина расположены в легкой цепи.

5 17. Антитело по п.14, отличающееся тем, что последовательность тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

18. Антитело по п.17, отличающееся тем, что последовательность легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

10 19. Антитело по п.14, отличающееся тем, что последовательность тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

20. Антитело по п.19, отличающееся тем, что последовательность легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

21. Антитело по п.14, отличающееся тем, что свободный остаток цистеина находится в положении 205 легкой цепи согласно нумерации по Kabat и/или в положении 114 и/или 400 тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat.

22. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело является моновалентным и содержит Fc область.

23. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело представляет собой биспецифичное антитело.

20 24. Антитело по п.23, которое специфично связывается с CD3.

25. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-24.

26. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.25.

27. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-24, содержащая экспрессирующий вектор по п.26.

25 28. Иммуноконъюгат для ингибирования роста клеток, которые экспрессируют FcRH5 человека, содержащий антитело по любому из пп.1-24, ковалентно присоединенное к цитотоксическому средству.

29. Иммуноконъюгат по п.28, отличающийся тем, что цитотоксическое средство выбрано из токсина, химиотерапевтического средства, молекулы препарата, антибиотика, радиоактивного изотопа и нуклеазы.

30. Иммуноконъюгат для определения присутствия FcRH5 человека в образце, содержащий антитело по любому из пп.1-24, ковалентно присоединенное к захватываемой метке, метке для определения или твердому субстрату.

31. Иммуноконъюгат по п.30, отличающийся тем, что антитело ковалентно присоединено к захватываемой биотиновой метке.

32. Иммуноконъюгат по п.30, отличающийся тем, что антитело ковалентно присоединено к определяемой метке - флуоресцентному красителю.

33. Иммуноконъюгат по п.32, отличающийся тем, что флуоресцентный краситель выбран из красителей флуоресцирующего типа, родаминового типа, дансила, лиссамина, цианина, фикоэритрина, техасского красного и их аналогов.

34. Иммуноконъюгат по п.30, отличающийся тем, что антитело ковалентно присоединено к радионуклидной определяемой метке, выбираемой из ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At и ^{213}Bi .

35. Иммуноконъюгат для лечения пролиферативного расстройства, опосредованного FcRH5, с формулой Ab-(L-D)p, где

(a) Ab является антителом по п.1;

(b) L является линкером;

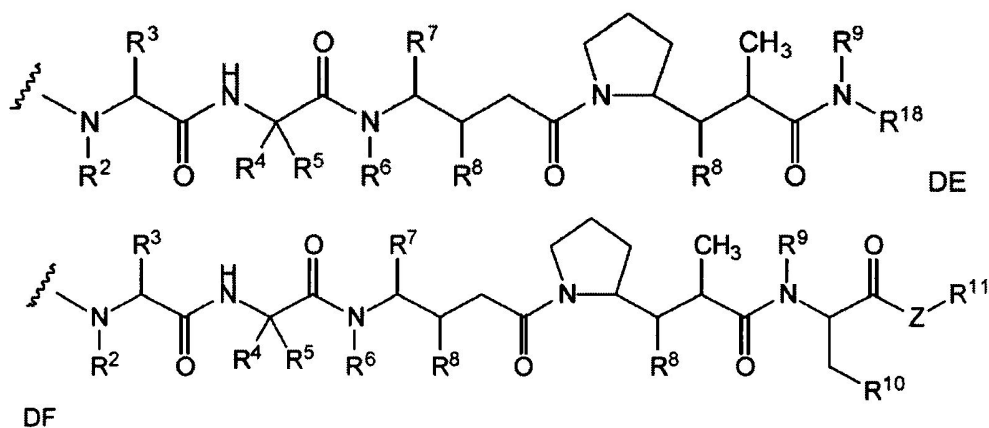
(c) D является цитотоксическим или цитостатическим агентом;

и

(d) $p =$ от 1 до 8.

36. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что L содержит линкер, выбранный из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропаноила (MP), валин-цитруллина (val-cit), аланин-фенилаланина (ala-phe), p-аминобензилоксикарбонила (PAB), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио) пентаноата (SPP), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1 карбоксилата (SMCC), эфира 4-(2-пиридилдитио) масляной кислоты и N-гидроксисукцинимид (SPDB) и N-сукцинимидил (4-йодоацетил) аминокислоты (SIAB).

37. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что D представляет собой ауристатин или долостатин и D представляет собой лекарственное соединение формулы DE или DF:



где R^2 и R^6 представляют собой метил, R^3 и R^4 представляют собой изопропил, R^5 представляет собой H или метил; R^7 представляет собой вторичный бутил, каждый R^8 независимо выбран из CH_3 , $O-CH_3$, OH и H , R^9 представляет собой H , R^{10} представляет собой арил, Z представляет собой $-O-$ или $-NH-$, R^{11} представляет собой H , C_1-C_8 -алкил или $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$, R^{18} представляет собой $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арил.

38. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что D выбран из MMAE или MMAF.

39. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что иммуноконъюгат представлен формулой $Ab-(L-MMAE)_p$, где p варьирует от 2 до 5.

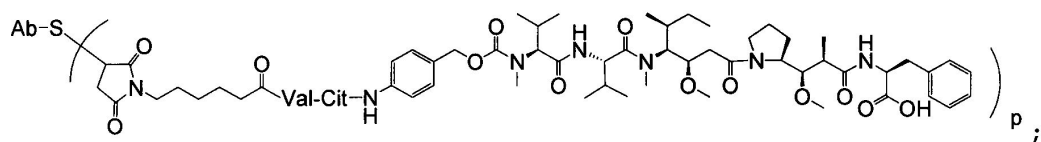
40. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что иммуноконъюгат представлен формулой $Ab-(L-MMAF)_p$, где p варьирует от 2 до 5.

41. Иммуноконъюгат по п.39, отличающийся тем, что L содержит val-cit, MC, PAB и/или MC-PAB.

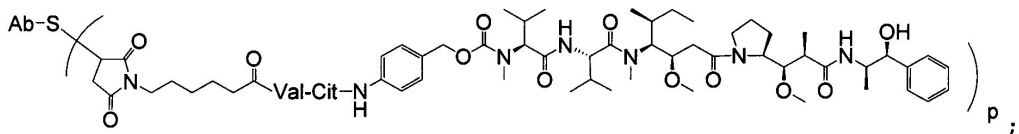
42. Иммуноконъюгат по п.40, отличающийся тем, что L содержит val-cit, MC, PAB и/или MC-PAB.

43. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что D представляет собой майтансиноид, выбранный из DM1, DM3 и DM4.

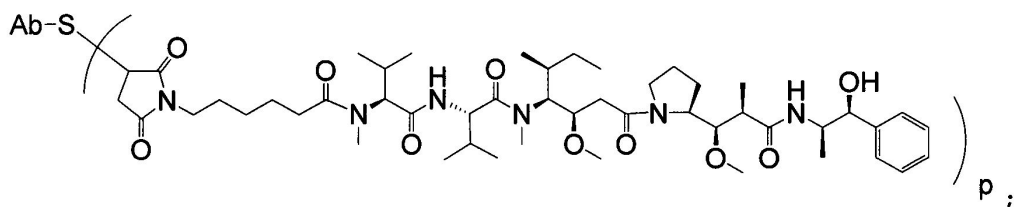
44. Иммуноконъюгат по п.35, отличающийся тем, что иммуноконъюгат выбран из следующих структур:



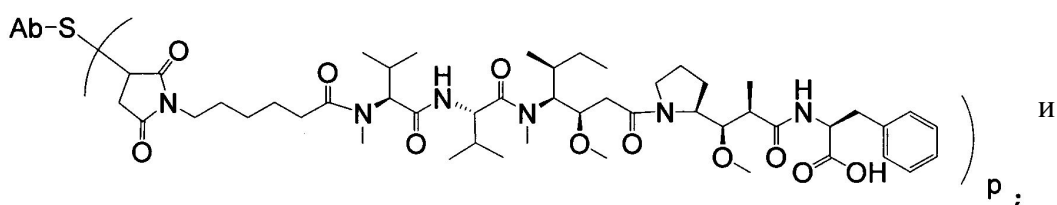
5



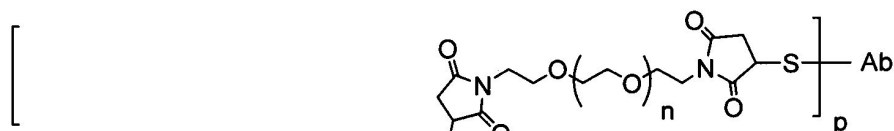
10



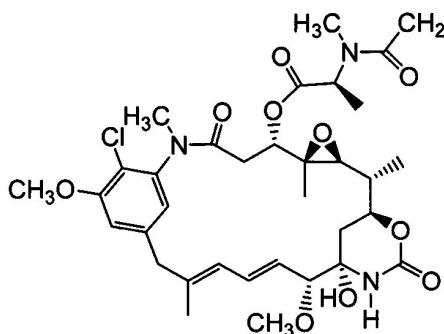
15



20



25



30

где Val представляет собой валин, а Cit представляет собой цитруллин.

45. Фармацевтическая композиция для ингибирования роста клеток, которые экспрессируют FcRH5 человека, содержащая эффективное количество иммуноконъюгата по любому из пп.35-44, и фармацевтически приемлемый носитель.

46. Применение иммуноконъюгата по любому из пп.35-44 для получения лекарственного средства для ингибирования жизнеспособности клетки, которая экспрессирует FcRH5 человека.

47. Применение по п.46, отличающееся тем, что D является цитотоксическим средством.

48. Применение по п.46, отличающееся тем, что лекарственное средство дополнительно содержит эффективное количество другого терапевтического средства.

49. Применение иммуноконъюгата по любому из пп.35-44 для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного расстройства, опосредованного FcRH5 человека.

50. Применение по п.49, отличающееся тем, что указанное пролиферативное

расстройство представляет собой злокачественное новообразование.

51. Применение по п.50, отличающееся тем, что указанное злокачественное новообразование выбрано из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), агрессивной формы НХЛ, рецидивирующей агрессивной формы НХЛ, рецидивирующей вялотекущей НХЛ, рефрактерной НХЛ, рефрактерной вялотекущей НХЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лейкозов, волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и лимфомы из клеток мантийной зоны.

52. Применение по п.49, отличающееся тем, что D является цитотоксическим средством.

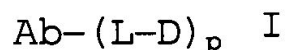
53. Применение по п.49, отличающееся тем, что лекарственное средство дополнительно содержит эффективное количество другого терапевтического средства.

54. Применение по п.53, отличающееся тем, что терапевтическое средство выбрано из группы, включающей: антитело, химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, антиангиогенный препарат, иммуносупрессант, пролекарство, цитокин, антагонист цитокинов, цитотоксическая радиотерапия, кортикостероид, противорвотный препарат, антиканцероматозная вакцина, анальгетик или препарат-ингибитор роста.

55. Применение по п.56, отличающееся тем, что терапевтический агент выбран из группы, включающей: велкаде, ревлимид, тамоксифен, летрозол, экземестан, анастрозол, иринотекан, цетуксимаб, фулвестрант, винорелбин, эрлотиниб, бевацизумаб, винкристин, иматиниб, сорафениб, лапатиниб или трастузумаб, цисплатин, гемцитабин, метотрексат, винбластин, карбоплатин, паклитаксел, пеметрексед, 5-фторурацил, доксорубин, бортезомиб, леналидомид, мелфалин, преднизон, дексаметазон или доцетаксел.

56. Способ *in vitro* определения присутствия белка FcRH5 человека в биологическом образце, подозреваемом на содержание белка FcRH5 человека, включающий *in vitro* воздействие на указанный образец антителом по любому из пп.1-24, и определение связывания указанного антитела с белком FcRH5 человека в представленном образце, при этом связывание указанного антитела с указанным белком FcRH5 человека в представленном образце является индикатором присутствия указанного белка FcRH5 человека в заданном образце.

57. Способ получения соединения конъюгата антитело-препарат, содержащего антитело к FcRH5 человека (Ab) по любому из пп.1-24 и молекулу препарата ауристатин или майтансиноид (D), где антитело присоединяют через одну или более введенных в ходе рекомбинации аминокислот цистеина посредством линкерной молекулы (L) к D; соединение представлено Формулой I:



где p равно 1, 2, 3 или 4;

способ содержит следующие этапы:

(а) реакцию добавленной в ходе рекомбинации группы цистеина антитела с линкерным реагентом с образованием промежуточного вещества антитело-линкер Ab-L; и

(b) реакцию Ab-L с активированной молекулой препарата D с образованием конъюгата антитело-препарат;

или содержит следующие этапы:

(а) реакцию нуклеофильной группы молекулы препарата с линкерным реагентом с образованием промежуточного вещества препарат-линкер D-L; и

(b) реакцию D-L с добавленной в ходе рекомбинации группы цистеина антитела с

образованием конъюгата антитело-препарат.

58. Иммуноконъюгат для ингибирования пролиферации клетки, которая экспрессирует FcRH5 человека, с формулой Ab-(L-D)_p, где:

(a) Ab является антителом, представляющим собой выделенное моноклональное антитело к FcRH5 человека, содержащее:

i. переменный домен легкой цепи, который содержит:

a. HVR-L1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26;

b. HVR-L2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 27; и

c. HVR-L3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 28; и

ii. переменный домен тяжелой цепи, который содержит:

a. HVR-H1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35;

b. HVR-H2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 36; и

c. HVR-H3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37;

(b) L - линкер, представляющий собой MC-VC-PAB;

(c) D - молекула препарата, представляющая собой MMAE; и

(d) p = от 1 до 8.

59. Иммуноконъюгат по п.58, отличающийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

Фиг. 1

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА 7D11 К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА (ДНК)

CACTCCAGCTCCAAGTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTA
GTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCCTGCTGACACAATCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGA
AAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGTCCAGTCAGAGCATGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTT
CTCCAAGGCTTCTCATAAAGTTTGCTTCTGAGTCTCTCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTTTACTCTTAGCATCAATAGTGTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGATTACTACTGTCAACAAGTAATAGCTG
GCCACTCACGTTTCGGTGTGGTACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAAC
TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACT
GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC (SEQ
ID NO:10)

Фиг. 2

**ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА 7D11 К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА
(АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ)**

DILLTQSPAILSVPGERVVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFAESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINS
VESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:11)

Фиг. 3

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА 7D11 К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА (ДНК)

TCGGTTCTATCGATTGAATTCACCAATGGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAAGTGCAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGACAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGTTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAC
CATTACTAGAAATGGTGGTACCACCTATTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGCCA
AGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGTCCCTATC
TACTATGATTACGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACACAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTGTC
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACA
CATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGGG
TGGTCAGCGTCCCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCC
CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCC
ATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGAC
CTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT (SEQ ID NO:12)

Фиг. 4

**ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА 7D11 К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА
(АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMWVRQTPDKRLELVATITRNGGTTYLDSVKGRFTISRDN
AKN
TLYLQMSSSLKSEDTAMYYCARGPIYYDYGYAMDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVV
SVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 13)

Фиг. 6

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА (MAB10A8)
DIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKASQDVSTAVAWYQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFT
FTISSVQAEDLAVYYCQQHFSSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:15)

Фиг. 7

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА (MAV10A8)

CACSTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCAATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA
ACTGGAGCGTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA
AATCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGCCGTGTCTTGGGTTTCGCCAGACTCCGGAGA
AGAGGCTGGAGTGGGTCGCTACCATTAGCAGTGGTGGTAGTTTGACCTTCTATTTAGACAGTGTGAGGGGT
CGATTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGA
CACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCCCATTCGGATTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGGACGGTGTCTGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
AGCACCTGAACCCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGG
GTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCC
CGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAATGAAGTGCAGCGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGT
TATTGCAG (SEQ ID NO:16)

Фиг. 8

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА К FCRH5 ЧЕЛОВЕКА (MAB10A8)
EVQLVESGGGLVKPGGSLKISCAASGFTFSSYAVSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSLTFYLDVSRGRFTIS
RDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARPIPDYYALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

Фиг. 9

Легкие цепи
Мышиное антитело 10A8 = SEQ ID No:18
Гуманизированное антитело 10A8v1 = SEQ ID No:19

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Мышиное антитело 10A8	D	I	V	M	T	Q	S	H	K	F	M	S	T	S	V	R	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
Гуманизированное антитело 10A8v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
hum k1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
	Contact-CDRL1																																							
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Мышиное антитело 10A8	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V	Q	A
Гуманизированное антитело 10A8v1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
hum k1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	Contact-CDR-L2																																							
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108												
Мышиное антитело 10A8	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	H	F	S	S	P	R	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R														
Гуманизированное антитело 10A8v1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	F	S	S	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R													
hum k1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R												
	Contact-CDR-L3																																							

Фиг. 10 Тяжелые цепи (мышинное антитело 10A8 = SEQ ID No:20, Гуманизированное антитело 10A8v1 = SEQ ID No:21)

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Мышное антитело 10A8	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	I	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	V	S	W	V	R	Q	T	
Гуманизированное антитело 10A8v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	V	S	W	V	R	Q	A	
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
Мышное антитело 10A8	P	E	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	L	T	F	Y	L	D	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y
Гуманизированное антитело 10A8v1	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	L	T	F	Y	L	D	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
hum III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y

Kabat#	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113			
Мышное антитело 10A8	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	P	I	P	D	Y	Y	A	L	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
Гуманизированное антитело 10A8v1	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	P	I	P	D	Y	Y	A	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
hum III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	X	G	X	G	S	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	

Фиг. 11

hu 10A8 легкая цепь

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:22)
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:23)
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:24)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:25)
 HVR1-LC: KASQDVSTAVA (SEQ ID NO:26)
 HVR2-LC: SASYRYT (SEQ ID NO:27)
 HVR3-LC: QQHFSSPRT (SEQ ID NO:28)

CL: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
 SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

LC-вариабельный домен

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:30)

LC-вариабельный домен + CH1 + Fc disclosed as SEQ ID NO: 66

hu 10A8 тяжелая цепь

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:32)
 FR3-HC: RGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)
 FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34)
 HVR1-HC: AASGFTFSSYAVS (SEQ ID NO:35)
 HVR2-HC: ATISSGGSLTFYLDV (SEQ ID NO:36)
 HVR3-H3: ARPIDYYALDY (SEQ ID NO:37)

CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)

Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39)

HC-вариабельный домен

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
 LDSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIDYYALDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:40)

HC-вариабельный домен + CH1 + Fc disclosed as SEQ ID NO: 67

12/13

Фиг. 12

**Тяжелая цепь тиоМАТ А118С huMA10А8 к FcRH5 с введенным в
ходе рекомбинации цистеином**

А. Последовательность легкой цепи
Thio-huMA10A8-HC-A118C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSP
RFSGSGSGTDFTLTIISSLPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

В. Последовательность тяжелой цепи
Thio-huMA10A8-HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFYLDVSRGRFTISRDNKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGLTVTVSSCSTKGPSTVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVL
DSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSHHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

Фиг. 13

Тяжелая цепь тимоMAT V205C huMA10A8 к FcRH5 с введенным в ходе рекомбинации цистеином

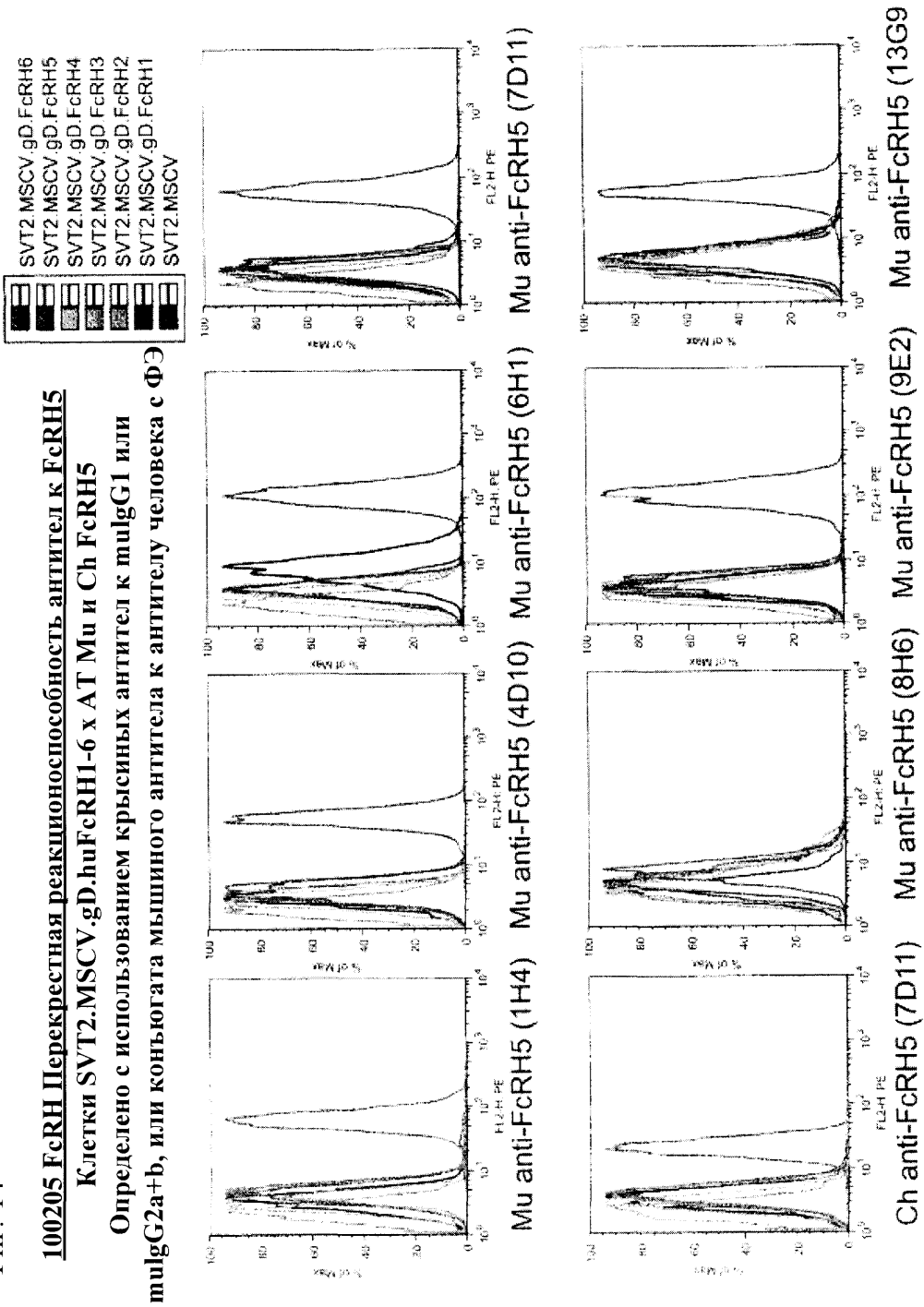
А. Последовательность легкой цепи
Thio-huMAb10A8-LC-V205C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
RFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

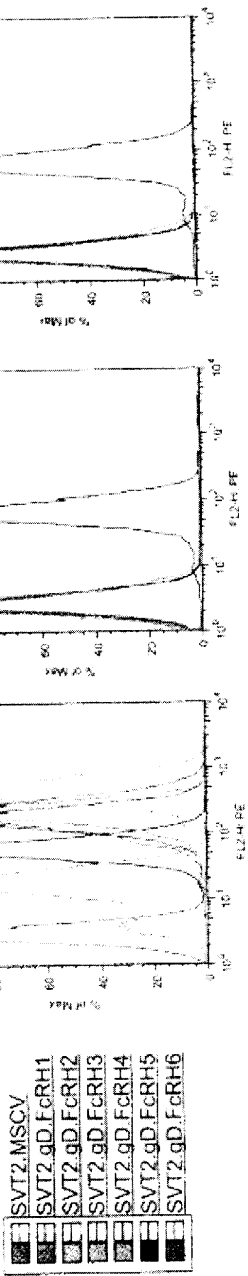
В. Последовательность тяжелой цепи
Thio-huMA10A8-LC-V205C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
LDVSRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

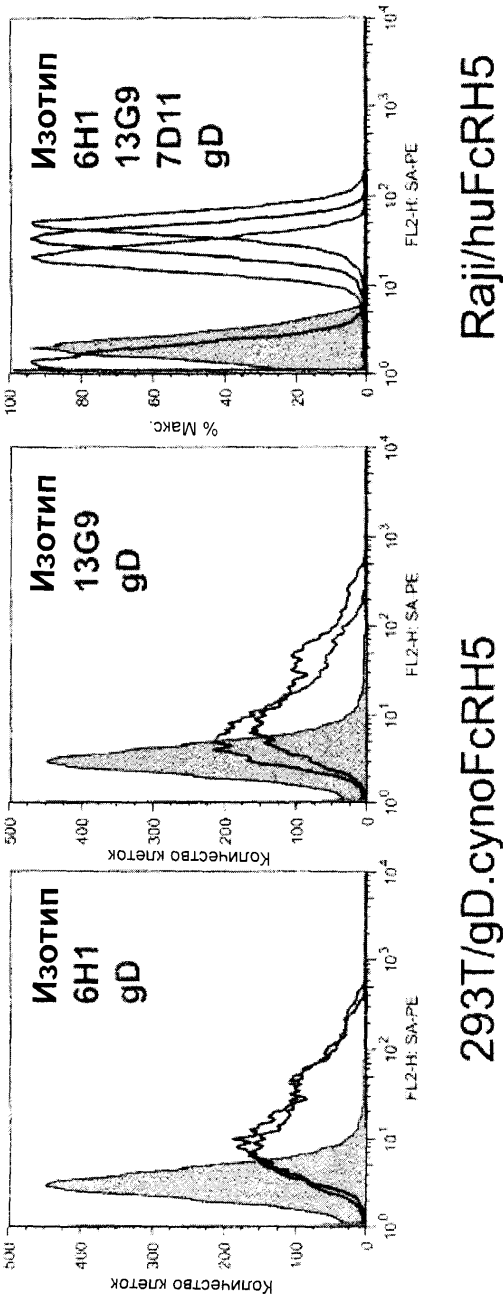
Фиг. 14



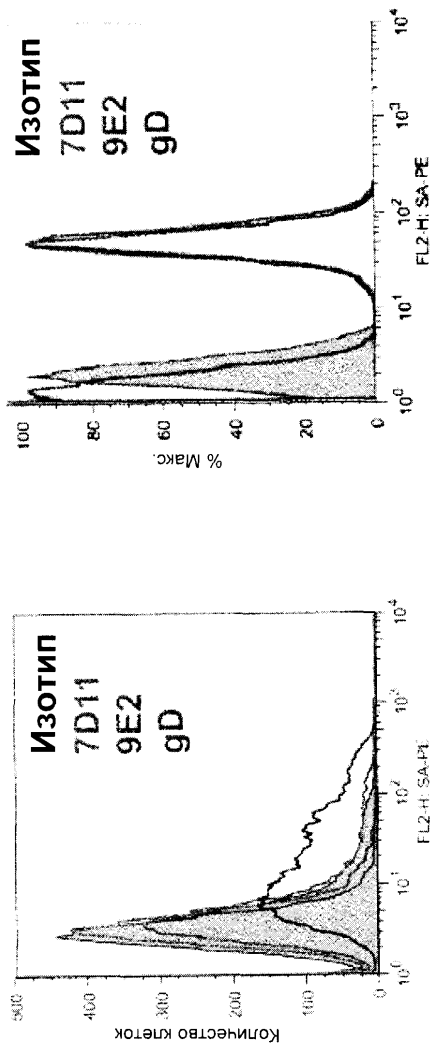
100205 FcRH Перекрестная реакционная способность антител к FcRH5
Фиг. 15 Клетки SVT2.MSCV.gD.huFcRH1-6 х супернатанты AT Mu FcRH5
Определено с использованием конъюгата крысиных антител к mAbG1 с
ФЭ



Фиг. 16 - Мышиное антитело 6H1 и 13G9 реагируют перекрестным образом с cynoFcRH5



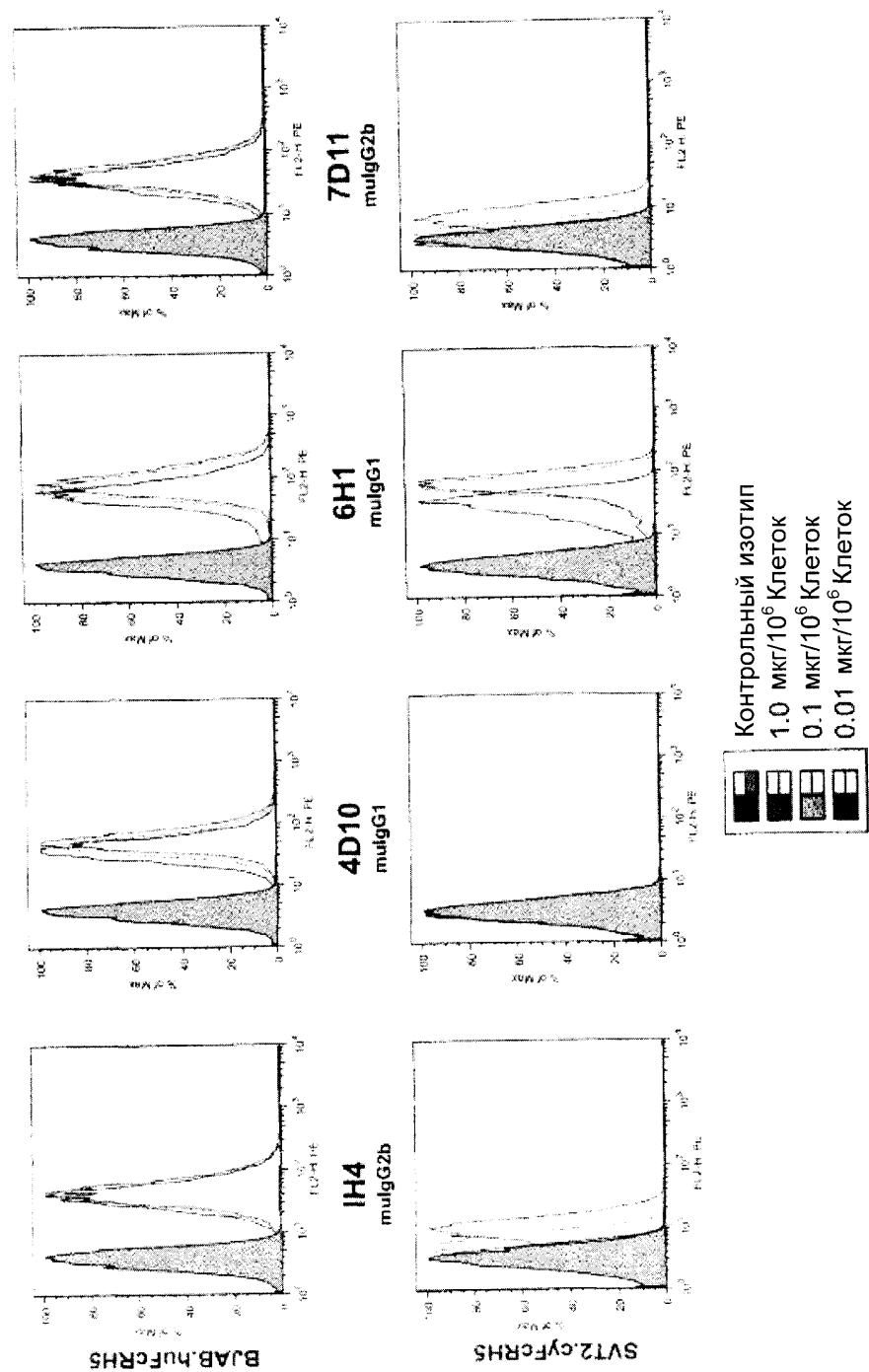
Фиг. 17



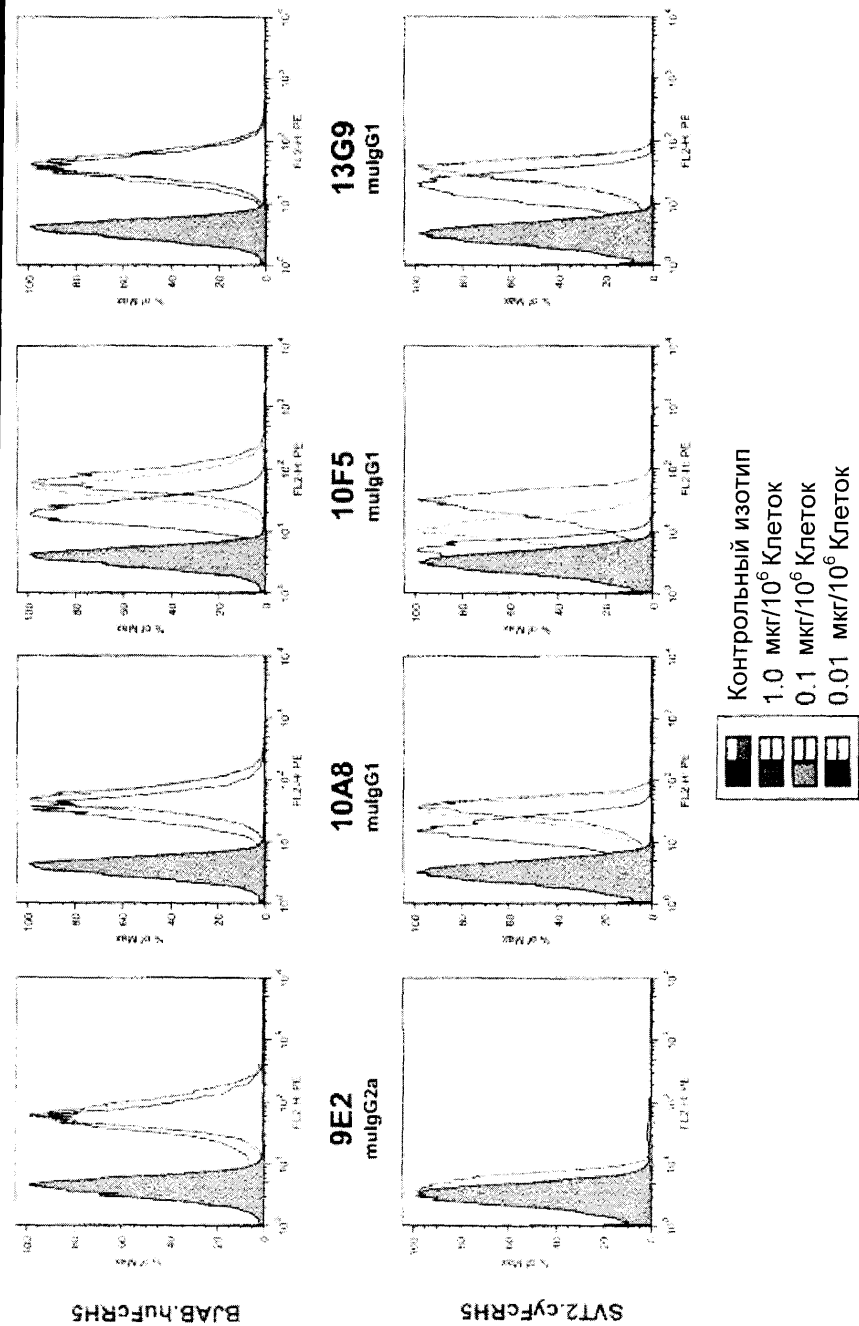
293T/gD.cynoFcRH5

Raji/huFcRH5

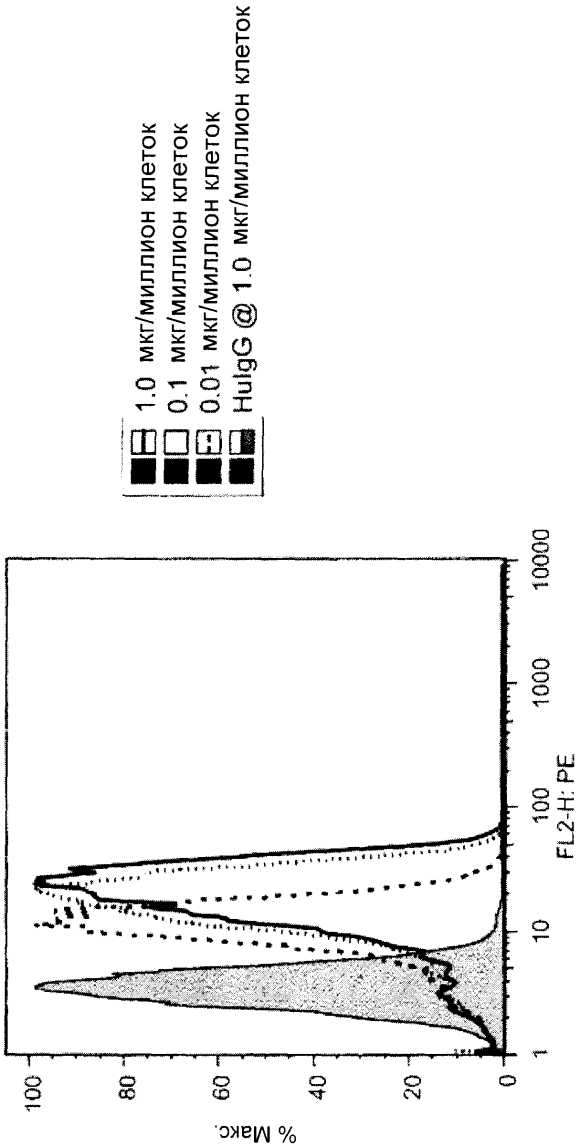
Фиг. 18 012207 Титрация антител к Fc γ RH5
ВJAB.Fc γ RH5.D10 & SVT2.cyFc γ RH5.SP x все мышиные АТ к Fc γ RH5 выявлены с помощью
крысиного антитела к mslgG1 или конъюгата mslgG2s+b с ФЭ



Фиг. 19 012207 Титрация антител к Fc γ RH5
BJAB.Fc γ RH5.D10 & SVT2.c γ Fc γ RH5.SP х все мышинные АТ к Fc γ RH5 выявлены с помощью
крысиного антитела к mIgG1 или конъюгата mIgG2s+b с ФЭ



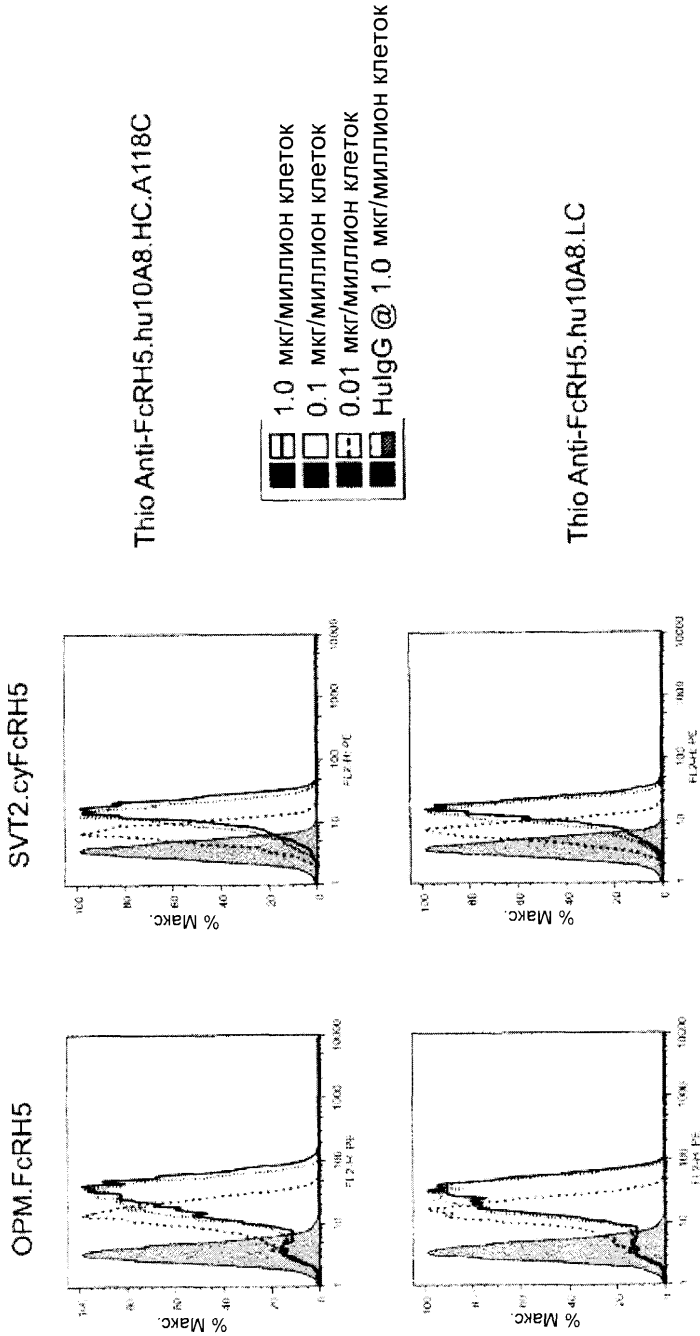
OPM2.FcRH5 x Thio Anti-FcRH5.ch10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE
Фиг. 20



Фигура ? является графиком анализа FACS, указывающим связывание конъюгата препарата с OPM2.FcRH5 x Thio Anti-FcRH5.ch10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE (КАП) по изобретению с FcRH5, экспрессируемым на поверхности трансфицированных клеток OPM2. Определение проводилось с крысиными антителами mIgG1-ФЗ

OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Thio Anti-FcRH5.hu10A8.HC.A118C
OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Thio Anti-FcRH5.hu10A8.LC.V205C

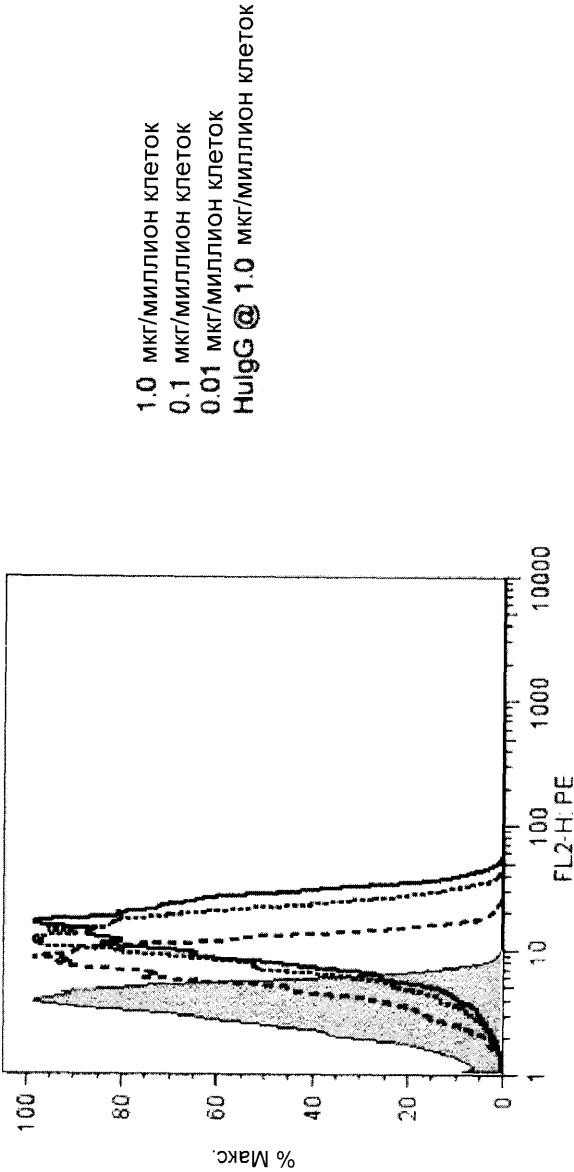
Фиг. 21



Фигура ? является графиками анализа FACS, указывающими связывание несвязанного тимо-гуманизированного антитела к FcRH5 10A8.HC.A118C и тимо-гуманизированного антитела к FcRH5 10A8.LC.V205C с клетками OPM2, трансфицированными huFcRH5, и клетками SVT2, трансфицированными супоFcRH5

OPM2.FcRH5 x Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE

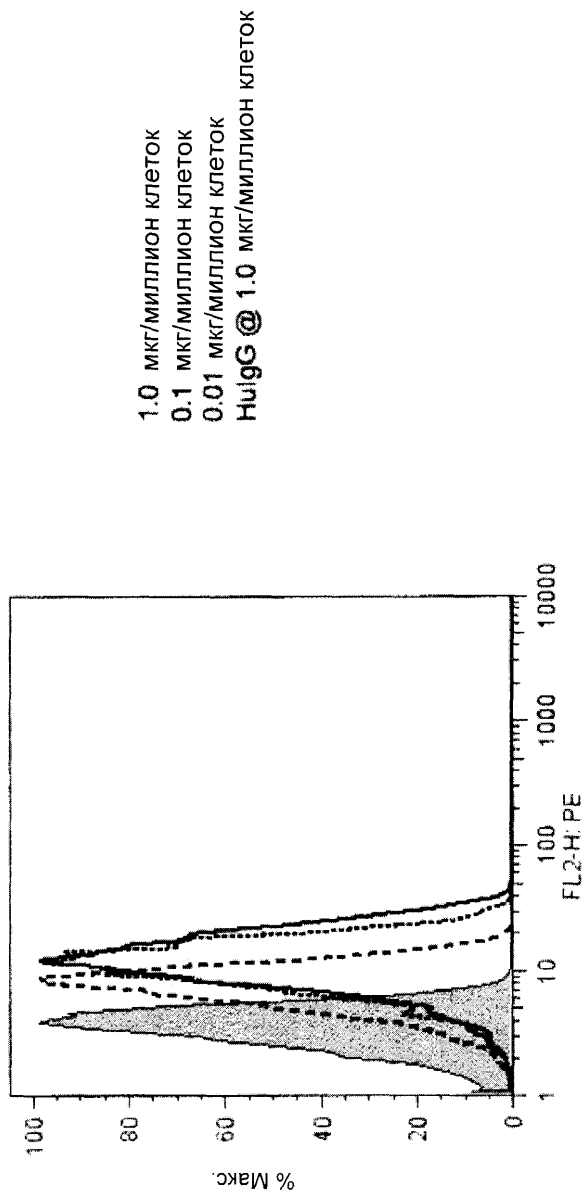
Фиг. 22



Фигура 2 является графиком анализа FACS, указывающим связывание Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE (КАП) по избранию с FcRH5, экспрессируемым на поверхности трансфицированных FcRH5 клеток OPM2. Определение проводилось с крысиными антителами к конъюгату IgG-ФЭ человека.

OPM2.FcRH5 x Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.LC.V205C.MC vs PAB MMAE

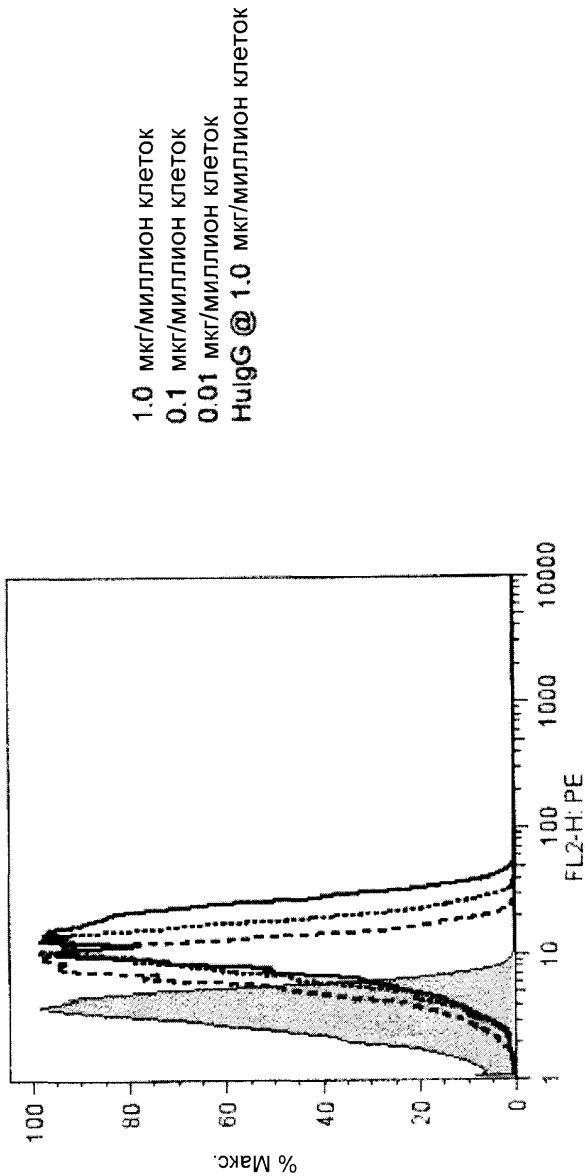
Фиг. 23



Фигура ? является графиком анализа FACS, указывающим связывание Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.LC.V205C.MC vs PAB MMAE (КАП) по изобретению с FcRH5, экспрессируемым на поверхности трансфицированных FcRH5 клеток OPM2. Определение проводилось с крысиными антителами к конъюгату IgG-ФЗ человека.

OPM2.FcRH5 x Ch Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4

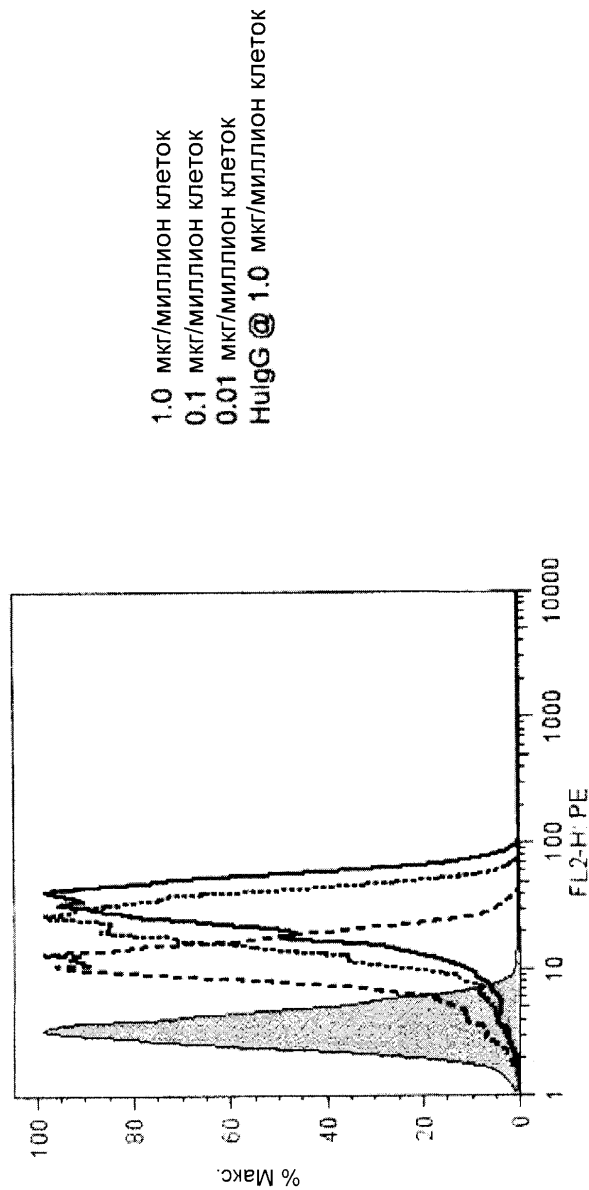
Фиг. 24



Фигура ? является графиком анализа FACS, указывающим связывание Ch Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4 (КАП) по изобретению с FcRH5, экспрессируемым на поверхности трансфицированных FcRH5 клеток OPM2. Определение проводилось с крысиными антителами к конъюгату IgG-ФЗ человека.

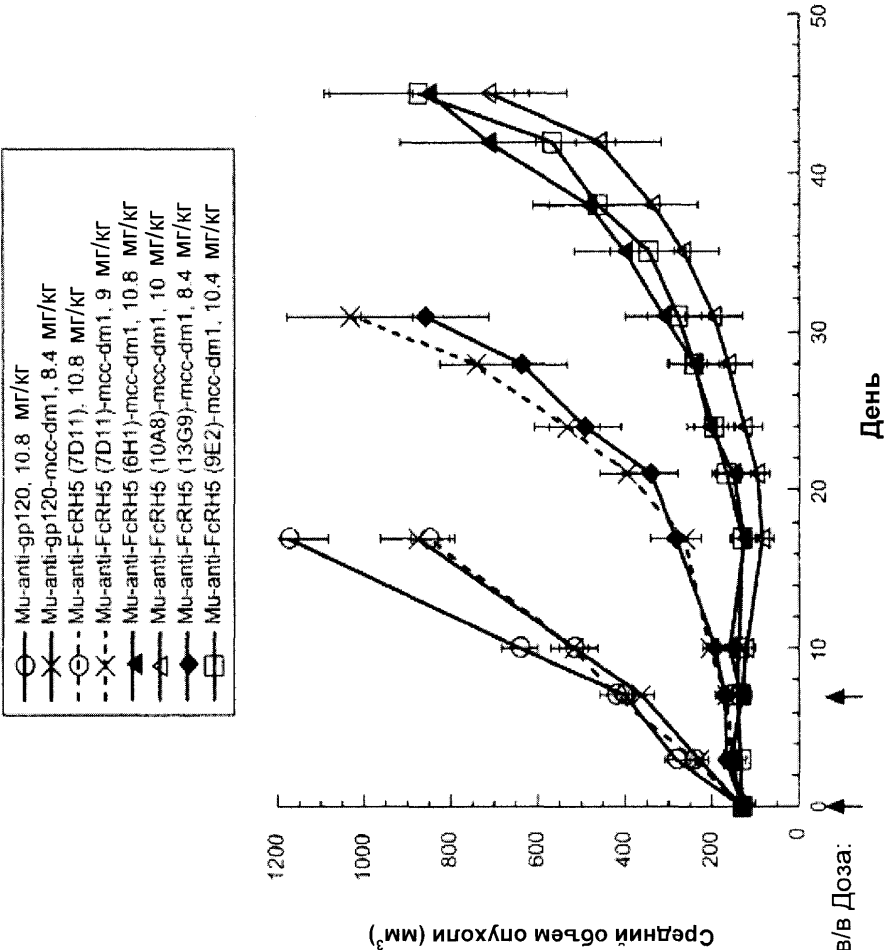
OPM2.FcRH5 x Hu Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4

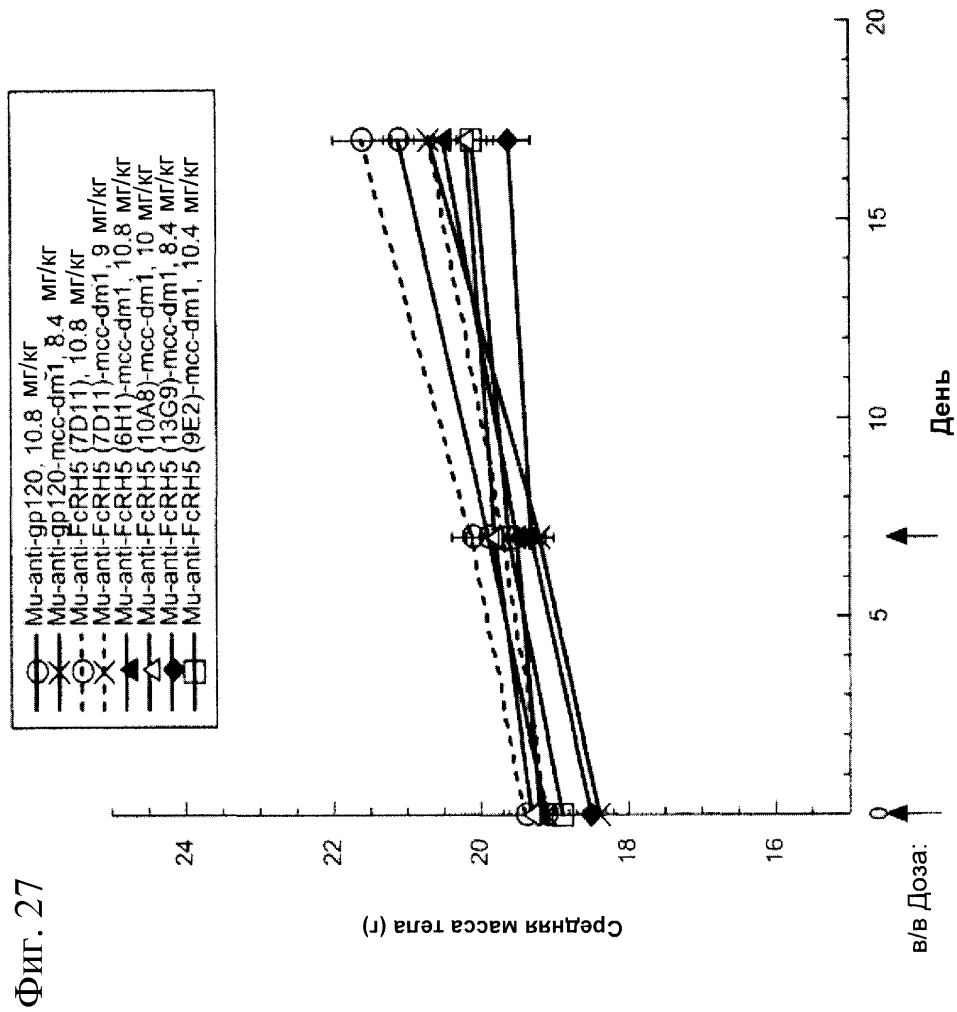
Фиг. 25



Фигура ? является графиком анализа FACS, указывающим связывание Hu Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4 (КАП) по изобретению с FcRH5, экспрессируемым на поверхности трансфицированных FcRH5 клеток OPM2. Определение проводилось с крысиными антителами к конъюгату IgG-ФЭ человека.

Фиг. 26

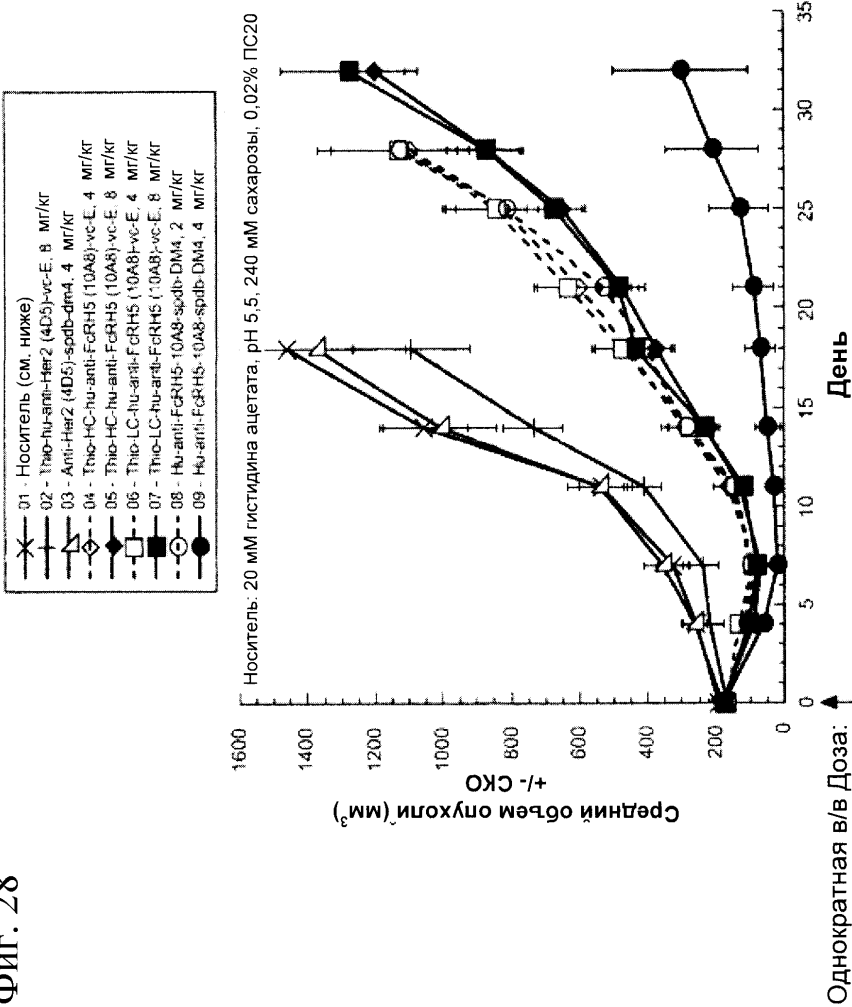




Thio-HC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, thio-LC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE и anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в сравнении с ксенотрансплантатом множественной миеломы OPM2-FcRH5 у мышей CB17 Scid

Протокол №08-1184

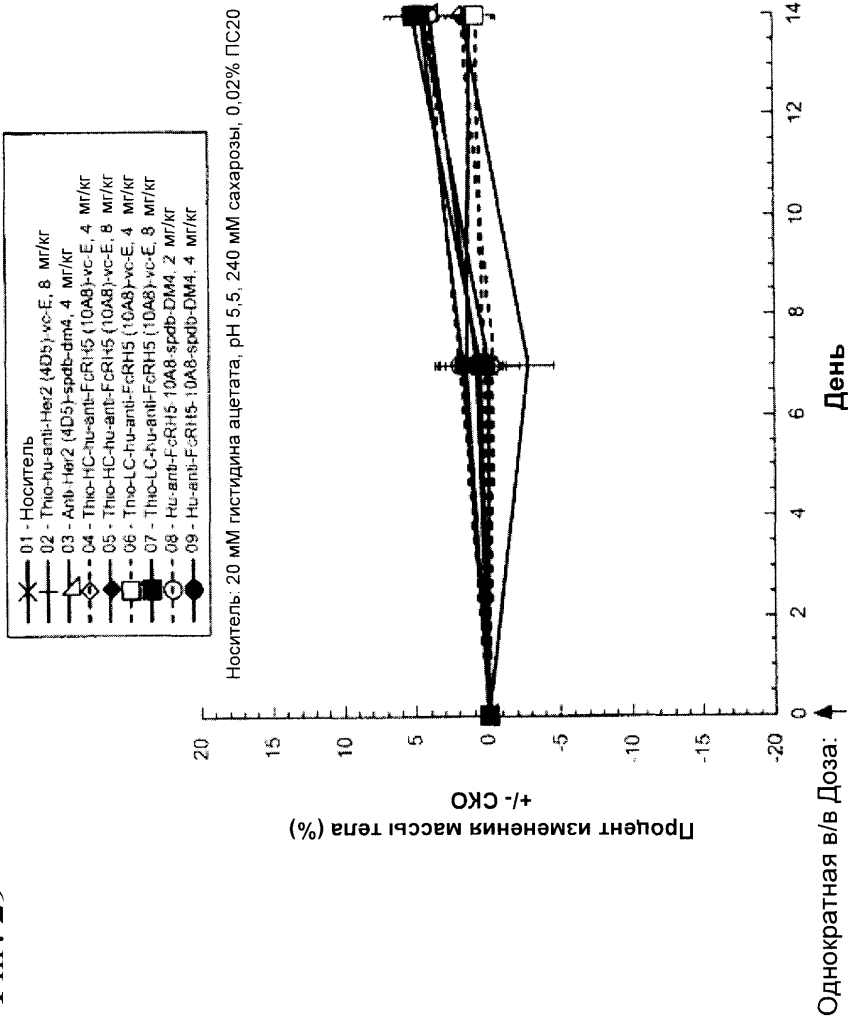
Фиг. 28



Thio-HC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, thio-LC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE и anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в сравнении с ксенотрансплантатом множественной миеломы OPM2-FcRH5 у мышей CB17 Scid

Протокол №08-1184

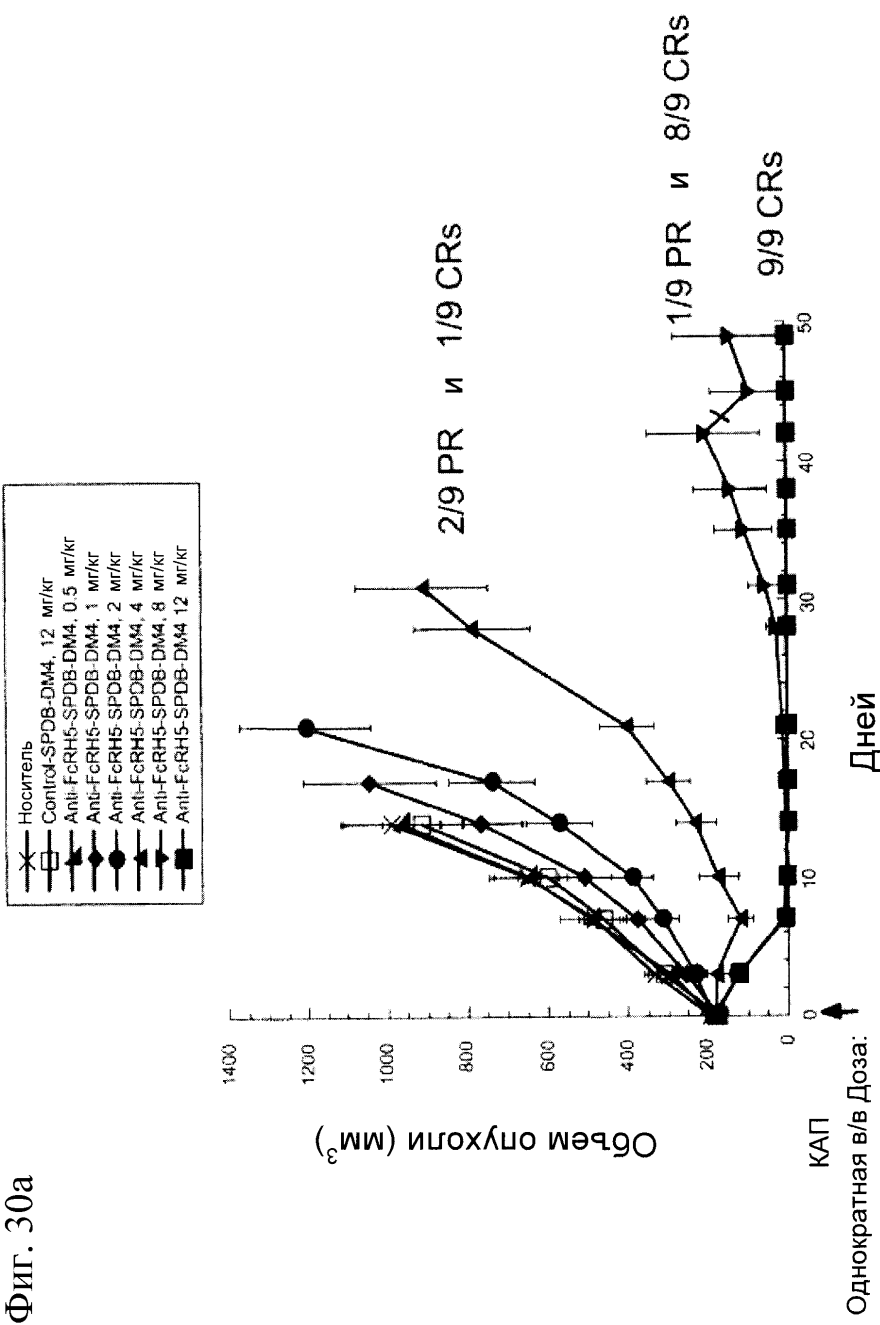
Фиг. 29



30/50

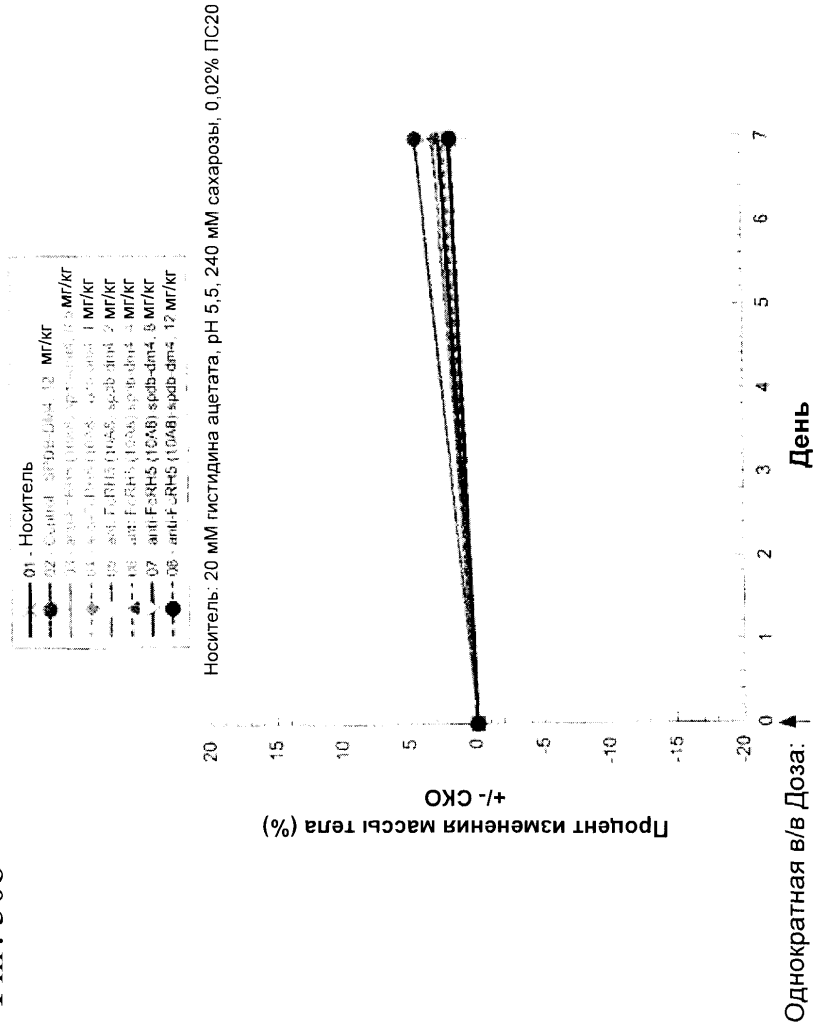
Антитела FcRH5-SPDB-DM4 в модели OPM2-FcRH5

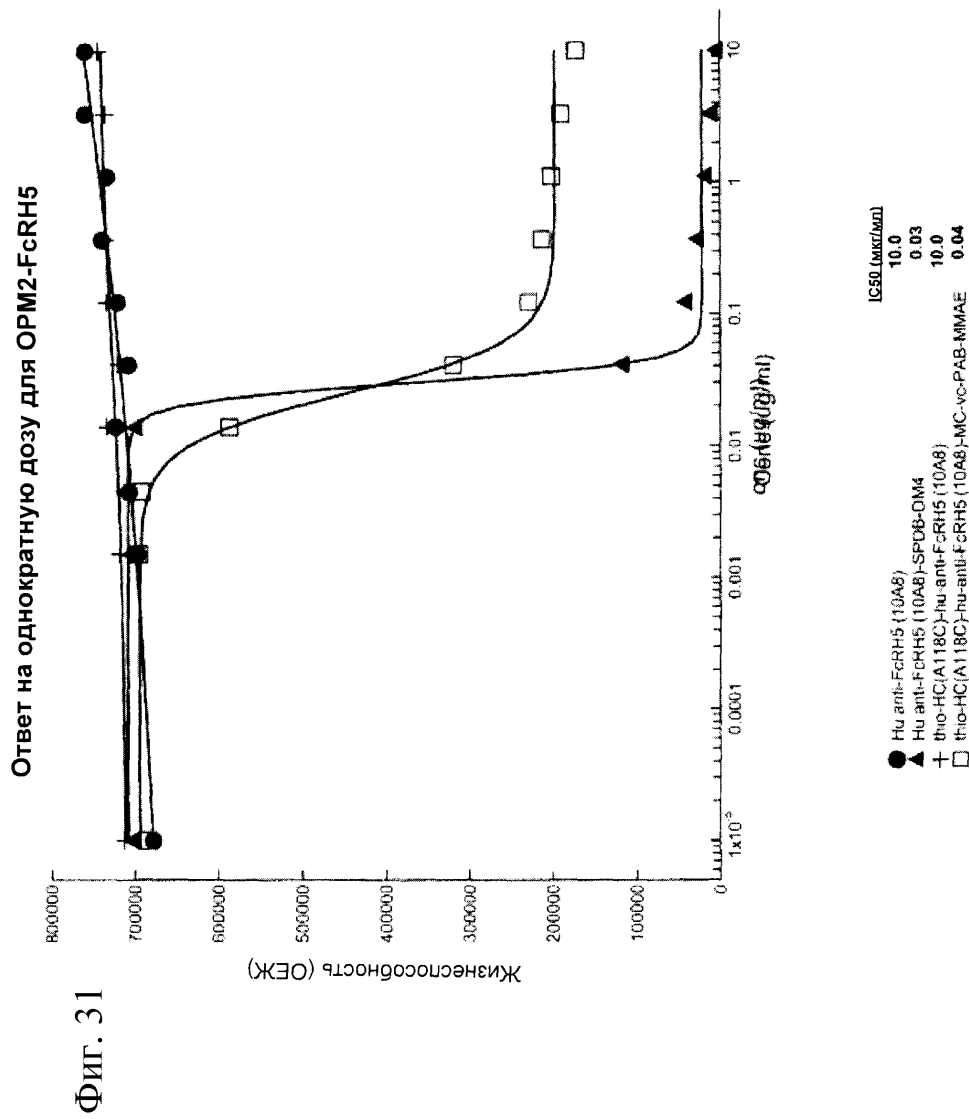
Фиг. 30а

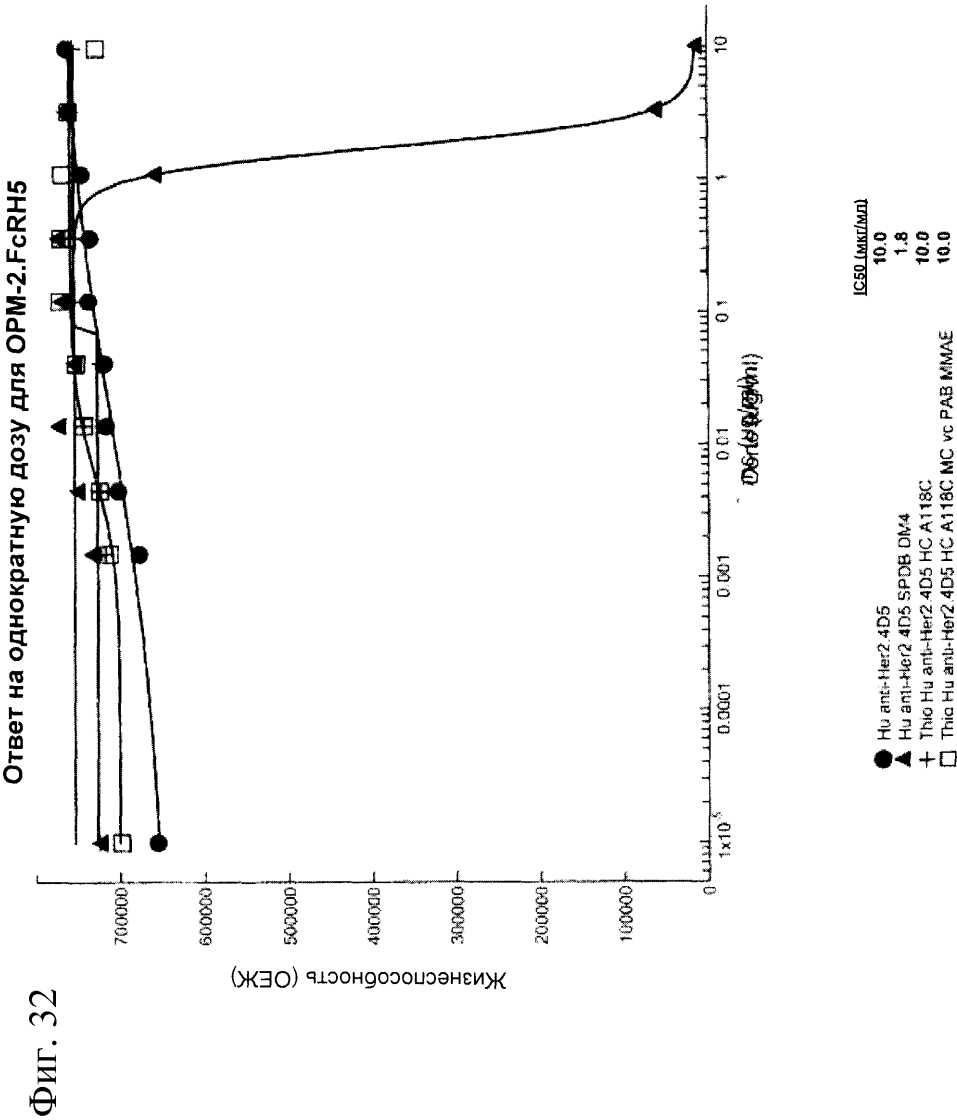


Антитела FcRH5-SPDB-DM4 в модели OPM-2-FcRH5
Исследование варьирования дозы антитела FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в сравнении с ксеногraftантатом
множественной миеломы OPM2-FcRH5 у мышей CB17 Scid
Протокол №08-1184 D

Фиг. 30b







GATGTGCTCCTTGGAGCTGGTGTGCAGTGTCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTITT
GGAATTGAGGAAACITCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCATGCTCTGTGG
GTGATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTTCAGTGGACAGTITGCAAGGACACCCAGGCCCATAT
TTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGAACCTCACTTGCAAGG
GATTTGGCTTCTACTCACACAGAAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTTGGGAAAGAAAT
ACTAAGAGAAACCCAGACAATATCCTTGAGGTTTCAAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAG
GCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTCTTCAGAGATGGGATTTCT
CATGCTGCCCAGGCTAATGTTGAACTCCTGGGCTCAAGTGATCTGCTCACCCTAGGCCCTCTCA
AAGCGCTGGGATTACAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACT
CTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAGGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAA
TGATAATGTCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAA

Фиг. 33

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPHFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLGKE
ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDIFSSEMGFPHAAQANVELLGSSDLLT

Фиг. 34

36/50

AATTCTACTAATGCATTCTGCTCTTTTGGAGAGCACAGCTTCTCAGATGTGCTCCTTGGAGCTG
 GTGTGCAGTGTCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTCTTGGGAATTGAGGAAAACCTCTC
 TTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCATGCTGCTGTGGGTGATATTACTGGTCTCTG
 GCTCCTGTCAAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATTAATTTCTCCAGCCCTCCATG
 GACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCTCACTTGCAAGGGATTTCCGTCTCTACTCAC
 CACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTCGGGAAAGAAATACTAAGAGAAAACCCAG
 ACAATATCCTTGAGGTTTCAAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCAGGGCTCCCTCTC
 AGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTCTTCAAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTG
 TTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATA
 CTATTTACAAGAATGATAATGTCTGGCATTCCTTAATAAAAAGAAGTGAATTCATATTCCTC
 ATGCATGTCTCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAAGTTGTTGCCCT
 GTTTCTTCCAATACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGCCATTTACACGTCCAGTGTGAGAGC
 CAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAACCCAGTGACCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTC
 TAGAGAGGTCAAGTGTCCCGCTCCGGTTCGGCTTCTTCAAGAGATGACCAGACCTGGGATTA
 GGCTGGAGTCTCTCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAAAGATTACAGGGTCTTA
 CTGGTGTAAAGGACGCAACAATGCCCTCACAGCGTCATATCTGACAGCCCGAGATCCTGGATA
 CAGGTGCAGATCCCTGCATCTCATCTGTCTCACTCTCAGCCCTGAAAAGGCTCTGAATTTT
 GAGGGAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGCGCACCTTTGTACA
 GGTTTTATCATAGGGGTGTCCCTTGAGGCACAAGTCACTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCC
 ATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGAATTCAGGGAAGTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTT
 TGGCGCCAAGCCCAAGTAAAGGCTGTGAGCTTCTCAGTCACTGTCTCCCGTGTCTCATCTGTCTC
 CAACCTCAGCTCTCCTGAGGACCTGATTTTGAAGGGAGCCAAAGGTGACACTTCACTGTGAAG
 CCCAGAGAGGTTCACTCCCATCCTGTACCAGTTTCATCATGAGGATGCTGCCCTGGAGCGT
 AGGTCCGGCAACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTGACTGCAGAGCAATCAGG
 GAAGTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTAAGGCGGTGAGCCTCT
 CCATCACTGTCCCTGTGTCTCATCTGTCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTG
 AAGGAGCCACTGTGACACTTCACTGTGAAGTCCAGAGAGGTTCCCCACAAATCCTATACCA
 GTTTTATCATGAGGACATGCCCTGTGGAGCAGCTCAACACCCCTCTGTGGGAAGAGTGTCTT
 TCAGCTTCTCTGACTGAAGGACATTCAGGGAATTAAGTACTGACAGCTGACAATGGCTTT
 GGTCCCCAGCGCAGTGAAGTGGTGAAGCTTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTC
 ACCCTCAGGGTTCCCAAGGGCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGG
 CCCCAGAGAGGCTCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGC
 AGCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGAAGCTTCTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATCTGG
 AAACCTACTCATGTGAGGCCAACAATGGCTAGTGGCCAGCACAGTGACACAATATCACTC
 AGTGTATAGTTCAGTATCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGGGCTCCCAGGGCCAGGCTGT
 GGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCAATCCTGTACT
 GGTTTTATCATGAAGATGTACCTTGGGTAAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCTCC
 TTCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCAGACAATGGTCC
 GGAGGCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCGGGTGTCTCGCCCCGTCT
 CTCACCTCAGGGCTCCCGGGACCCATGCTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGA
 GGCCCTGAGAGGCTCTCCCTGATCCTGTACCGGTTTTTTCATGAGGATGTACCTTAGGAA
 ATAGGTCTCCCCCTCTGGAGGAGCGTCTTAACCTCTCTCTGACTGCAGAGCACTCTGGA
 AACTACTCTGTGAGGCCGACAATGGCTCGGGGCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTT
 ATATCACAGGGCTGACCCGGAACAGAAGTG

Фиг. 35А

GCCCTTTTGGCCACAGGAGTGGCCGGGGGCTGCTCAGCATAGCAGGCCCTTGCTGCGGGGGC
 ACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAAGCCTGCCTCTGACCCCGCCA
 GGAGCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACCTATCACAAATGTACCAAGCCTGGGAAGA
 GCTGCAACCAGTGTACACTAATGCAAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAAAGTA
 CGGATCATCCAAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCTCTGACCCAGGCATCTCAGGAACA
 AGGGTTCCCTATCACTACTCTGAAGTTAAGGTGGCTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTG
 TTCTTGGCTTCTCAGCTCCTCAGATGAGTCCACACGCTCTCCAACTGCTGTTTACGCT
 CTGCACCCCAAAGTTCCCTTGGGGGAGAACAGCATTTGAAGTGGGAAATTTAGGCTGCC
 CCAGACCATATCTACTGGCCTTTGTTTCAATGTTCTTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGG
 GCCCTGCTGGACTGTCACCTGTTTCCAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTAAATCCAGT
 GGCAAGGTGCTCCCACTCCAGGGCCCAGCACATCTCTGGATTCCTTAGTGGGCTTCAGCTG
 TGATTGCTGTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCCACAGAGGGGGTCTTACCACACAAAAG
 GGAGAGTGGGCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCTAACAGCTCAGGTGCTCTAAACTCCG
 ACACAGAGTTCCTGCTTTGGGTGGATGCATTTCTCAATTGTCATCAGCCTGGTGGGGTACT
 GCAGTGTGCTGCCAAATGGGACAGCACAGCCTGTGCACATGGGACATGTGATGGGTCTC
 CCCACGGGGGCTGCATTTACACTCCTCCACCTGTCTCAAACCTCAAGGTCCGGCACTTGACA
 CCAAGGTAACTTCTCTCTGCTCATGTCTAGTGTCTACCTGCCCAAGTAAGTGGCTTTCATA
 CACCAAGTCCCAAGTTCTTCCATCCTAACAGAAAGTAACCCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGG
 ACCAGGGGTGCAGACAGAACACATACTGGAACACAGGAGGTGCTCAATTACTATTTGACTG
 ACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAGAAAACCTGTGGGTAACTAAACTGGCATAAAAT
 CCAGTGCACCTCCCTAGGAAATCCGGGAGGTATCTGGCTTCCCTAAGAAACAACGGAAGAG
 AAGAGCTTGGATGAGGAAACTGTTCAGCAAGAGGAAGGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTT
 GTGGATCACCTGAGGATCCTGTGAAAATACAGATACTGATTCAGTGGGTCTGTGTAGAGCCT
 GAGACTGCCATTCTAACATGTTCCAGGGGATGCTGATGCTGCTGGCCCTGGGACTGCACTG
 CATGCATGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGAATGTGTGGCTCTG
 GCTGCCCAGGGCCCAACTCGGTTACACGGATCGTGCTGCTCCCTGGCCAGCCTTTGGCCAC
 AGCACCCAGCTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTGTGACATGTTGGCTTTTCATCAGCC
 ACCCTGGGAAGCGGAAAAGTAGCTGCCACTATCTTTGTTTCCCACTCAGGCCTCACACTTT
 CCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCCATTGAGAGTTGTTCTCCCATCT
 CTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCATCACATCTTATCTTGATCTTTGC
 TCCCACTGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAAGCCCCACGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAA
 GGGCATTGGAAAGCTCTCTCCACCTGAACCATGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTACAGGCCCT
 GCCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGCTGCCCAACCTTTCAAGGAGGAAAACAGACACCTG
 AGACAGGAGCCTGTATGCAGCCAGTGCAGCCTTGCAGAGGACAAGGCTGGAGGCATTTGT
 CATCACTACAGATATGCAACTAAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCACCGAGG
 CCGCTTTTTTAGGCCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTA
 AAGAAAAAATCTGCTCACAGTTTGTCTGGAGGTACATCACCAACAAAGCTCAGGCCCTA
 TGCAGTTCTGAGAAAGGTGGAGGCACAGGCTCAAAAGAGGAAATTTAGAAATTTCTCATTTG
 GAGAGTAAGGTACCCCATCCCAGAATGATAACTGCACAGTGGCAGAACAACTCCACCT
 AATGTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCTGAGTGTAAACAAAAGGGCTTATCTTC
 CTCAAGTAAGGGGAACTCCTGCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTCTGCTTTCAGACGCAA
 ACTGAAAAATGGCTCTTCTGGGTCTTGAGCTTGTGGCATATGGACTGAAAGAACTATGC
 TATTGGATCTCTGGATCTCCAGCTTGTGACTGCAGATCTTGAGATATGTCAGCCTCTACAG
 TCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATCTTCTGAAA

Фиг. 35B

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIHFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLGKE
 ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCRAKAEVTL
 NNTIYKNDNVLAFLNKRITDFHIPHACIKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNTVKIQVQEPFTRPVLR
 ASSFQPISGNPVTLTCTETQI.SLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWSLSPNFQITAMWSKDSGFYWC
 KAATMPHSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEGTKVTLHCETQEDSLRTLRYFYHEG
 VPLRHKSVRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNGLGAKPSKAVSLSVTVPVSHPVNLSSPEDLI
 FEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAALERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFG
 PQRSKAVSLSITVPVSHPVLTLSAEALTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPS
 VGRVSFSFSLTEGHSNYYCTADNGFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDILLEI.H
 CEAPRGSPPILYWIFYHEDVTLGSSSAPSGGEASFNL.SLTAEHSGNYSCEANGLVAQHSDTISLSV
 IVPVSRPILTFRAPRAQAVVGDILLEHCEALRGSSPILYWIFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNL.SLT
 TEHSGIYSCEADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPGTHAAVGDILLEHCEALRGSPIL
 YRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNL.SLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYITGLTANRSGPF
 ATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWL.SRKAGRKPASDPARSPPDSQDEPTYHNVPaweELQPV
 YTNANPRGENVVYSEVRHIEKKKHAVASDPRHLRNKGSPHIEVKVASTPVSGLFLASSAPHR

Фиг. 36

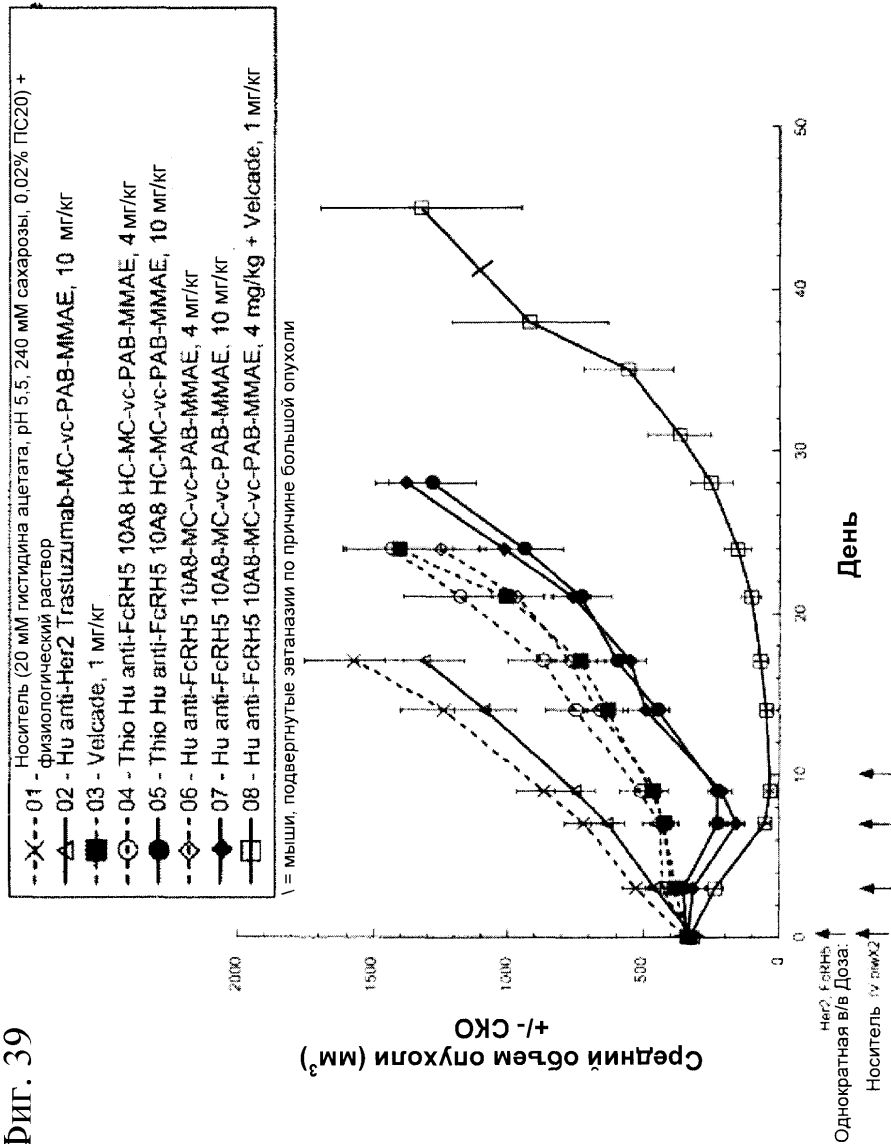
ATGCTGCTGTGGGTGATACTACTGGTCTTGGCTCCTGTCACTGGACAGTTTGTAAAGGACATACAAGTC
 CATTATTTCTTCAGCTTCCATGGACACAGTCTTCCGAGGAGAGAGAGTGAATCTGACTTGCAAGG
 GATTTGGCTTCTACTCATCACAAAAAACAATGGTACTATCGGCACCTTGGGAAAGAAATATCGAGA
 GAAACCCAAAAAATACCCCTTGAAGGTTCAAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCAGGGCTCCC
 CTCTCAGTAGCCCTGTGTCTTGGACTTTCTTCAAGCTTCGGTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGT
 TGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAGGCCGGAAGTAACACTGAAGACTACTATTTAC
 AAGAATGAAAAATGTCTGGCATTTCTTAATAAAICAAGTGAATTCATATTTCTCATGCAAGTCTCAAG
 GACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAACTTGTGTGCTTGTTCCTCCAACACAGTCAA
 AATCCAAGTCCAAGAGTCAATTAACAGTCCAGTGTGTGAGAGTCAAGTCCCTCCAGGCCATCAGCGGGA
 GCCCAGTGAACCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTAGAGAGGTCAAGATGTCCCGCTCCAGTTCTGC
 TTCTTCAGAAATGACCAGATGCTGGGATCAGGCTGCAGCTCTCCCCGAAGTCCGGATTACTGCCAT
 GTGGAGTAAAGATTCAGGATCTACTGGTGTAAAGGCAGCAACAATGTGTTATGACACACATCTAACA
 GCTTGAGATCCTGGATACAGGTGCTGATCCCCGATCTCATCCTGTCTCACTCTCAGCCCTGAAAAAG
 GCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGAAACTTCCTGTGAAACCCAGGAAGATTCCTGCGCACTTT
 GTACAAGTTTATCATGACGGTGTCTCCCCTGAGGTACAAGTCAAGTCCGCTGTGAAAAGGGAGCATCCA
 TCAGCTTCTCACTGACTACAGAGCATTCAGGGAAGTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCATGGTCCC
 AAGCCCAAGTGAAGCTGTAGCTCACTGTCCCTGTGTCTCGCCCTGTCTCACCCCTGAACTCT
 GCAGAGGACCTGATTTCTGAGGGAGCCAAAGTTGACACTTCACTGTGAAGCCCAGAGAGGTTCACTCCC
 CATCGTGTACCAAGTTTATCATGAGAAATGCCCTCCCTGGGGAATAGGTCCGGCCACTCTGCAGGAGGAG
 TGGCCATCAGCTTCTCTGACTGCAGACCATTCGGGGAAGTACTACTGCACAGCTAAACAATGGCTTT
 GGCCCCCAGCGCAGTGAAGGAGTGAGCCTCTCCATCACTGTACCCGTGTCTCGTCCCTGCTCACCCCTC
 AGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTGAAGGAGCCACGGTGACACTTTACTGTGAGGTCCAGAGAGGTTT
 CCCACGAATCCCTATACCAAGTTTATCATGAGGACGTGCCCTTGGGGAGCAACTCAACACCCCTCTGTGG
 GAAAAGTGTCTTCACTTCTCTGACTGCAGCACATTCAAGGAATTACTACTGCACAGCTGACAAC
 GGCCTTGGTCCCCAGCGCAGTGAAGGCGGTGAGCCTCTTGTCACTGTTCAGTGTCTCGCCCCATCTCT
 ACCCTCAGGGTTCACAGGGCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTTCTGGAGCTTCCGTGTGAGGCCCTGAG
 AGGCTCTCCCCGATCATGTACTGGTTTATCATGAGGATGTACCCCTGGGGAGCAGCTCAGTCCCTCT
 TGGAGGAGAAGCCTCTTCAACCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAACTACTCATGTGAGGCCA
 ACAATGGCCTGGTGGCCAGCACAGTGATACAATAICACTCAGTGTATAGTTCCAGTGTCTCTGTCCC
 ATCCTCACCTTCAGAGCTCCCAGGGCCAGGCTGTAGTGGGGGACCTGTCTGGAAGCTTCACTGTGAGGC
 CTTGAGAGGCTCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTATCATGAAGATGTACCCCTGGGTAAAGATCTAGC
 CCCCCTTGGAGGAGGAGCCTACTTCAACCTCTCTTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCTGTGA
 GGCGGACAATGGTCTGGAGGCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTCAGTTCGGGTGTCT
 CGCCCCGTCTCACCTCAGGGCTCCCAGGGCCAGGTTGGGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTG
 TGAGGCCCTGAGAGGCTCTCCCTGATCCTGTACCAGTTTATCATGAGGATGTACCCCTAGGAAATA
 GCTCAGCCCTCTCTGGAGGAGCGTTCTTCAACCCTCTCTGACTGCAGAACACTCTGGAACTACTCCT
 GTGAGGCCGACAATGGTCTGGGGGCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTATCTCACAGGGCTGAC
 CGAGAACAGAAGTGGCCCTGTGTCCACGGGTGTACCCGGGGGTCTGCTCAGCCATGCAAGCCCTTGGT
 CTGTGGCACTGTCTCTACTGCTGGCTCTCAAGAAAAGCAGGGAGAGAGCCCTGCCCTTGACCCCTGC
 AGGAGCCCTTCAGACTTGGACTCCAGGAGCCACCTACCACAATGTACCAGCTTGGGAAGAGCTGC
 AACCAGTGTACAGTAATGTGAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAAAGTACGGATCATCCG
 AGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCTCTAACCCCAAGCATCTCAGGAACAAGGGTTCCTGTATCATC
 TACTCTGAAGTGAAGGTGGCATCAACCCCAAGCTCCAGATGCCCTGTCTTGGCTTCCCTCAGCTCCTCAC
 AGATGA

Фиг. 37

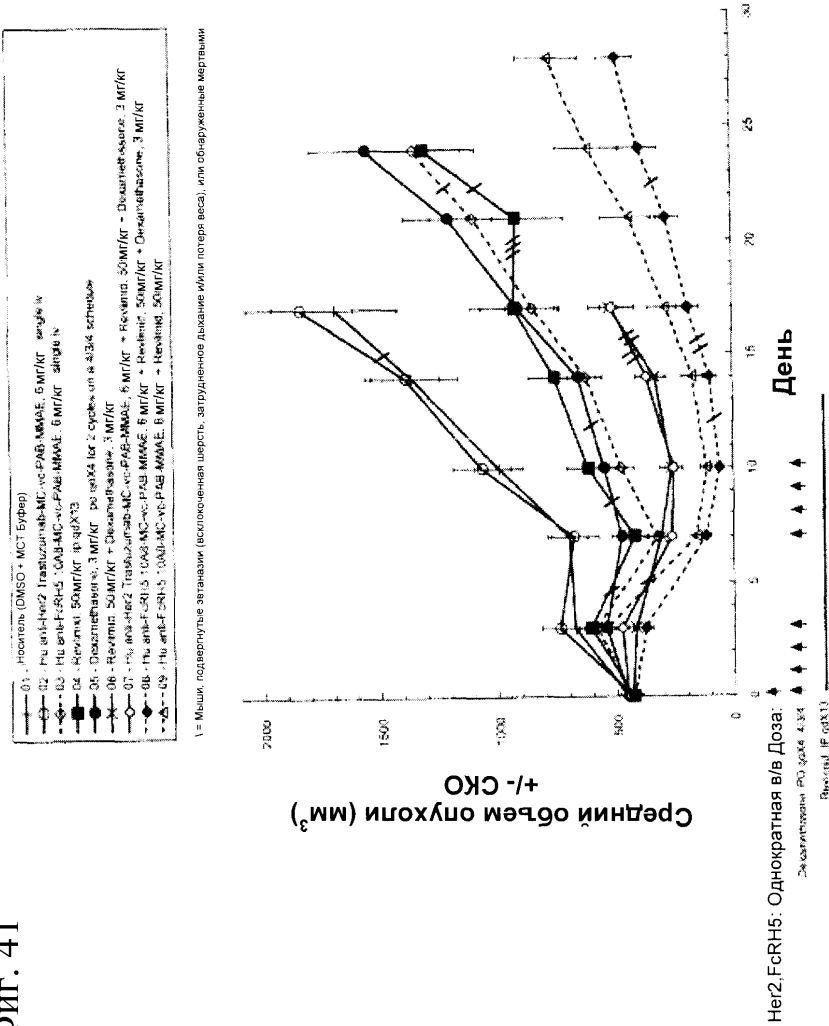
MLLWVILVLAPVSGQFVRTYKSHFLQPPWTTVFRGERVNLTKGFGFYSSQKTKWYYRHLGK
 EISRETQKNTLEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVSLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCAKAEVT
 LKTTIYKNENVLAFLNKSTDFHISHASLKDNGAYRCTGYKETCCLVSSNTYKIQVQESFTRPVLR
 VSSFQPISGSPVTLTCETQLSLERSDVPLQFCFFRNDQMLGSGCSLSPKFRITAMWSKDSGSYWC
 KAATMCYDITSNLSRSWJQVLPASHPVLTLSPEKALNIEGTVKVLHCETQEDSLRTLYKFYHDG
 VPLRYKSVRCEKGASISFSLTTEHSGNYCTADNGHGAKPSEAVSLSVTPVSRPVLTLSSAEDLI
 SEGAKLTLHCEAQRGSLPIVYQFHENASLGNRSAHSAGGVAISFSLTADHSGNYCTANNGFG
 PQRSEAVSLITVPVSRPVLTLSSAEALTFEGATVTLYCFVQRGSPRIYQFYHEDVPLGSNSTPSV
 GKVSFSFSLTAAHSGNYCTADNGFGPQRSEAVSLFVTVPVSRPILTLRVAPRAQAVVGDLELRC
 EALRGSPPIYWFYHEDVTLGSSSVPSGGEASENLSLTAHSGNYSCEANGLVAQHSDTISLSVI
 VPVSRPILTFRAPRAQAVVGDLELHCEALRGSSPIYWFYHEDVTLGKISAPSGGGAYFNLSLIT
 EHSIYSCEADNGLEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPRAQAVVGDLELHCEALRGSPIL
 YQFYHEDVTLGNSSALSGGAFTNLSLTAHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYLTGLTENRSGP
 VATGVTGGLLSLAGLAVALLLYCWLSRKAGREPASDPCRSPSILDSQEPTYHNVPaweELQP
 VYSNVNPRGENVVYSEVRIIREKKKHAVASNPRHLRNKGSCIHYSEVKVASTPASRCLFLASSAP
 HR

Фиг. 38

Фиг. 39

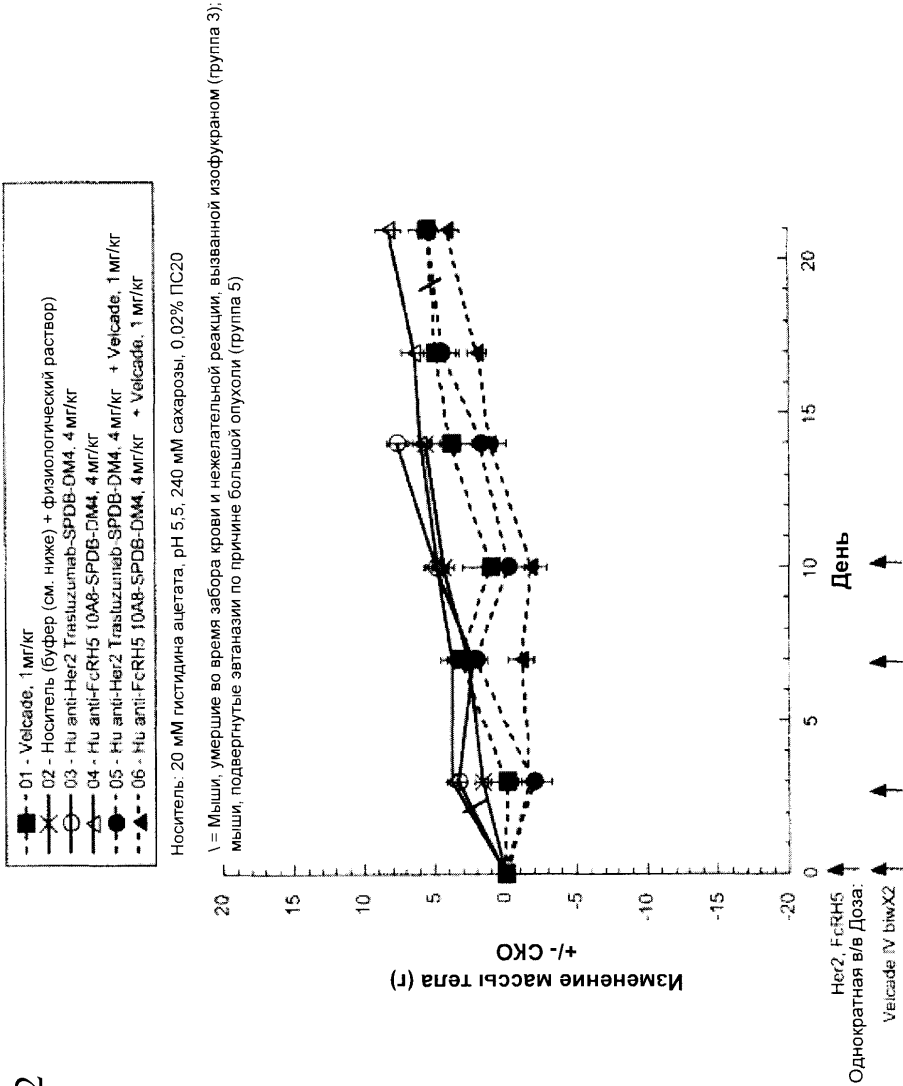


Фиг. 41



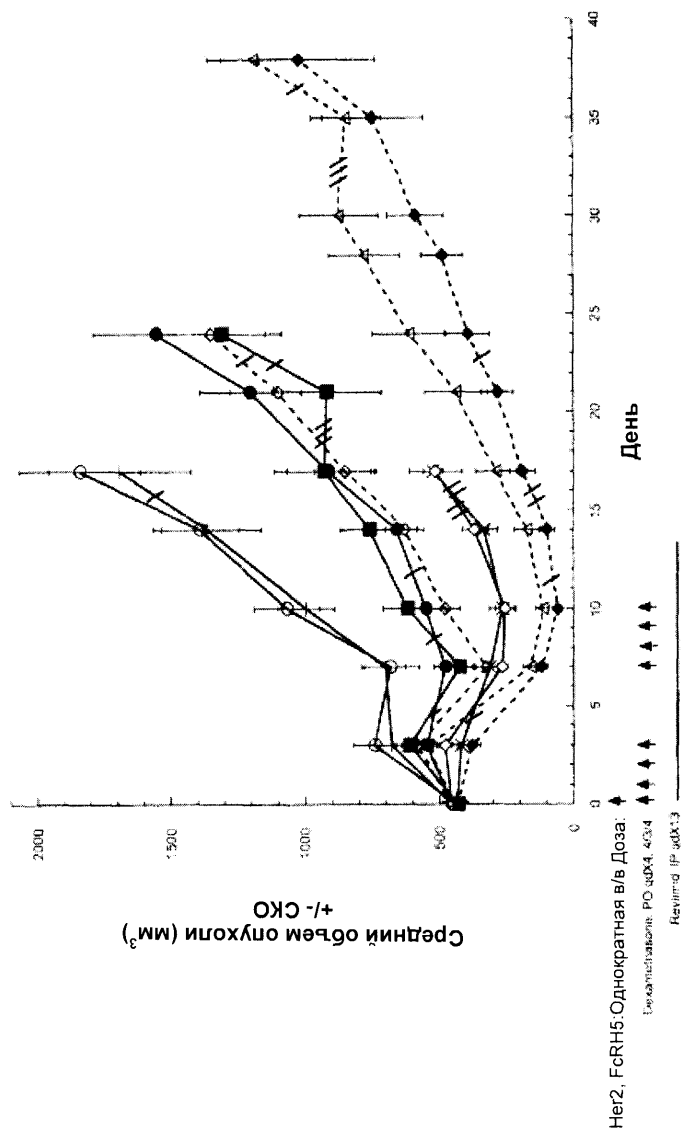
1 = Мыши, подвергнутые аттазации (использованная шерсть, затрудненное дыхание и/или потеря веса), или обнаруженные мертвыми

Фиг. 42

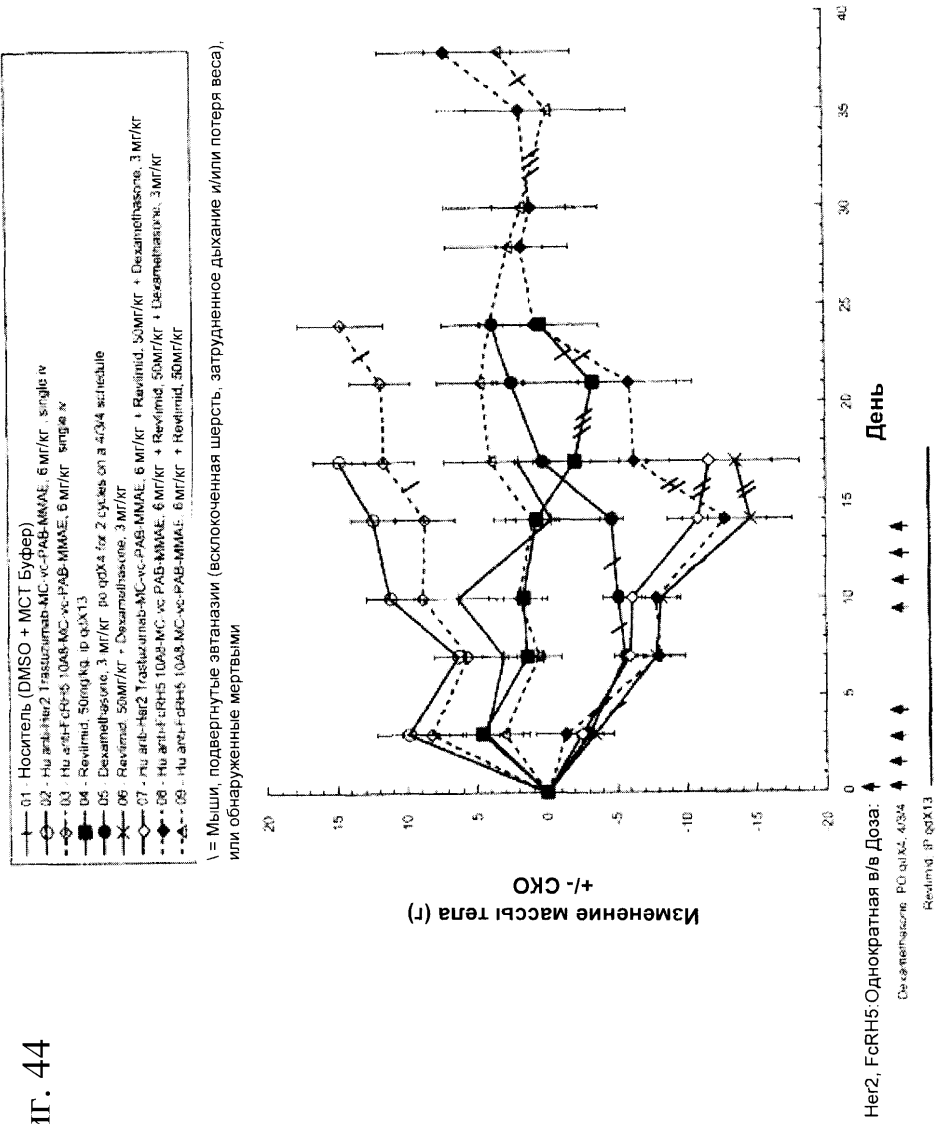


01	+	Хоситель (DMSO + MCT Буфер)
02	○	Hu anti-Hc2 Trasluzimab-MC vc-PAB-NMAE 6 Mf/Kr single w
03	○	Hu anti-FcRH5 10A8-MC vc-PAB-NMAE 6 Mf/Kr single w
04	■	Revised 50Mf/Kr ip qdX13
05	■	Revised 50Mf/Kr ip qdX4 for 2 cycles on a 4/3/4 schedule
06	×	Desazamethasone 3 Mf/Kr + Desazamethasone 3 mg/kg
07	○	Hu anti-Hc2 Trasluzimab-MC vc-PAB-NMAE 6 Mf/Kr + Revised 50Mf/Kr
08	○	Hu anti-FcRH5 10A8-MC vc-PAB-NMAE 6 Mf/Kr + Revised 50Mf/Kr
09	△	Hu anti-FcRH5 10A8-MC vc-PAB-NMAE 6 Mf/Kr + Revised 50Mf/Kr

= Мыши, подвергнутые эктаназии (всколоченная шерсть, затрудненное дыхание и/или потеря веса), или обнаруженные мертвыми

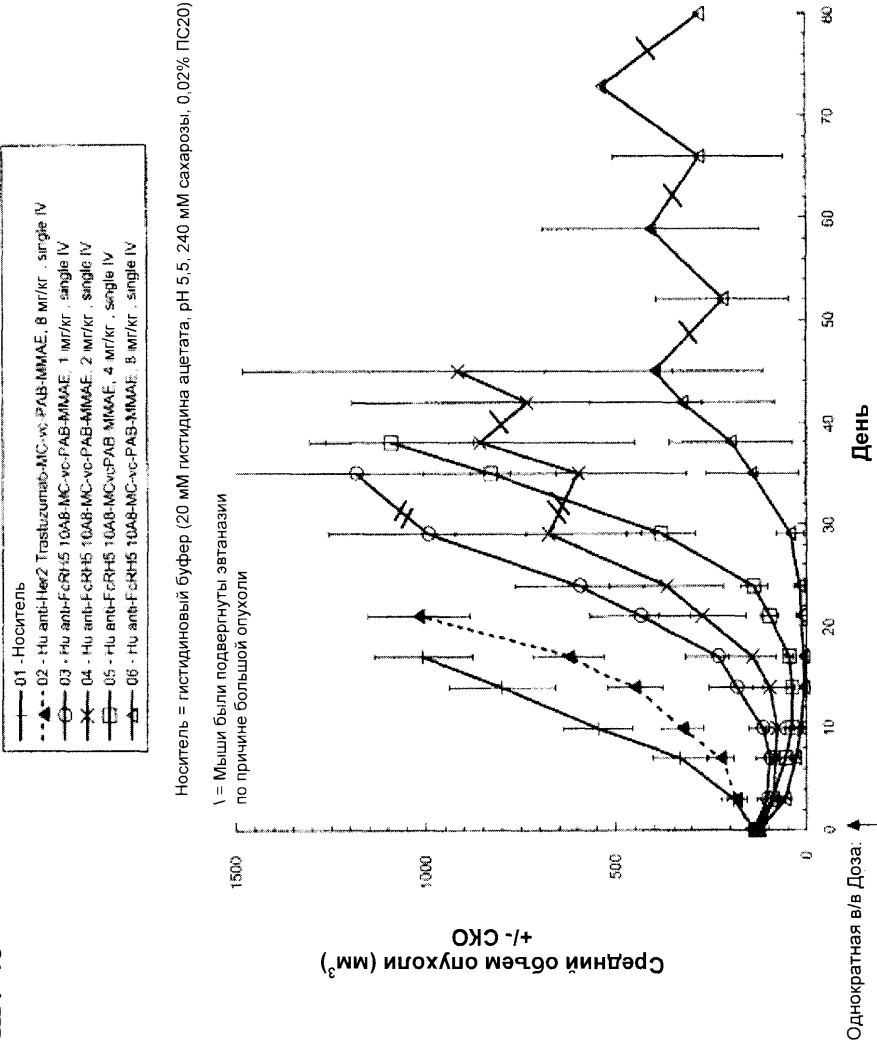


Фиг. 44

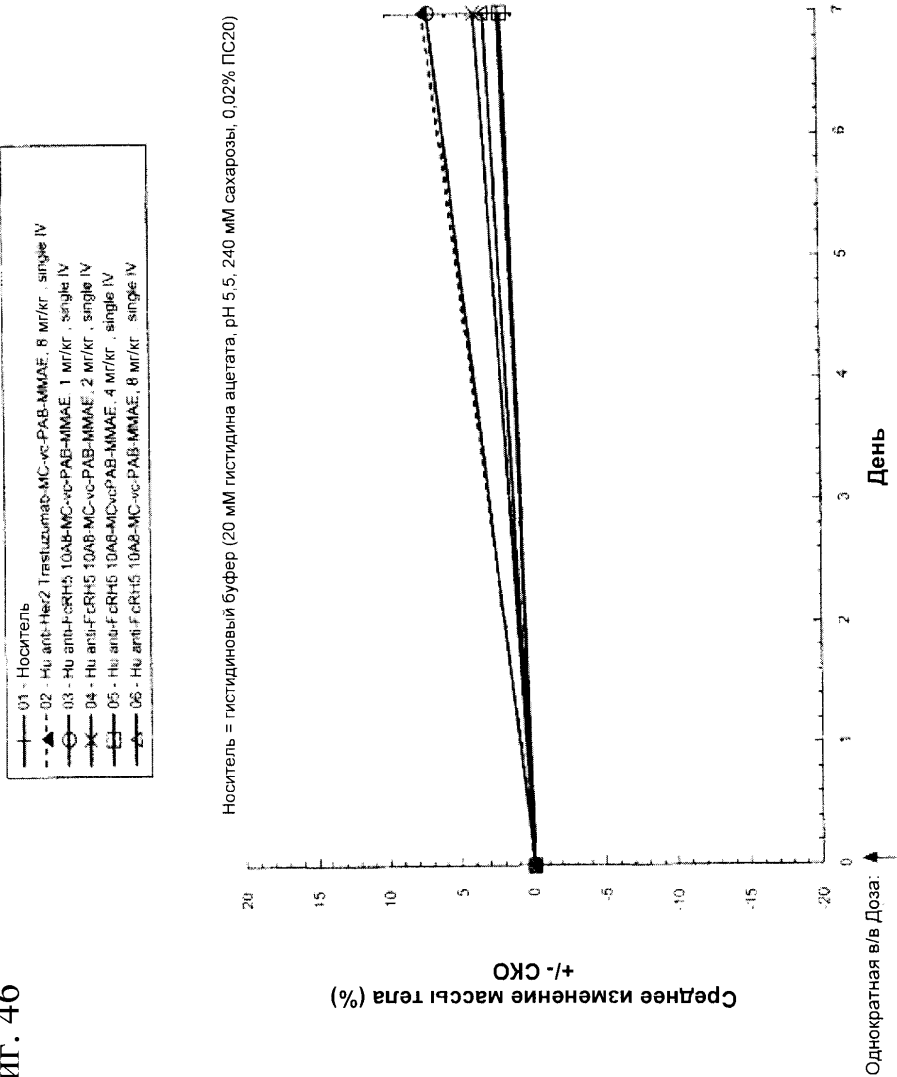


↓ = Мыши, подвергнутые эктаназии (всклоченная шерсть, затрудненное дыхание и/или потеря веса), или обнаруженные мертвыми

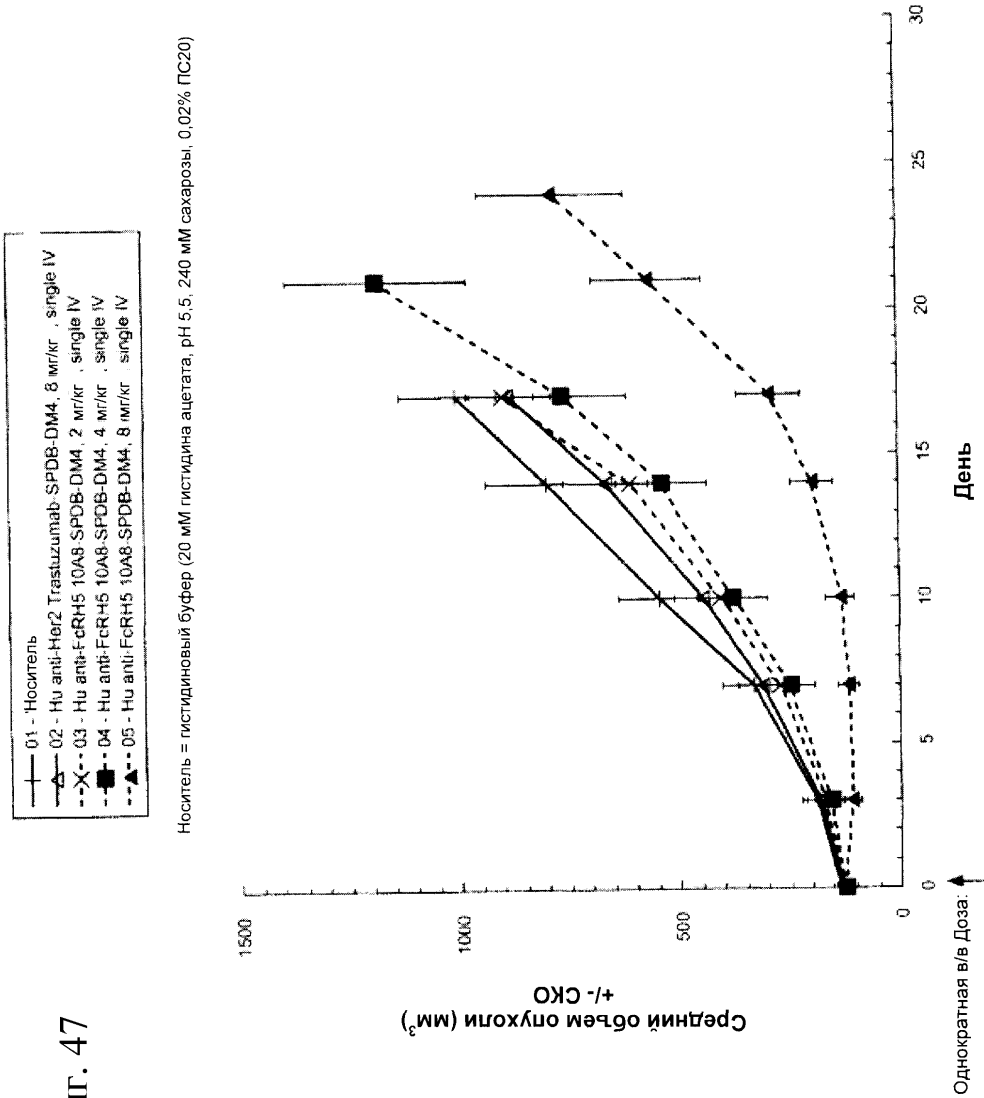
Фиг. 45



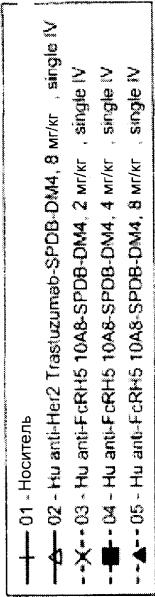
Фиг. 46



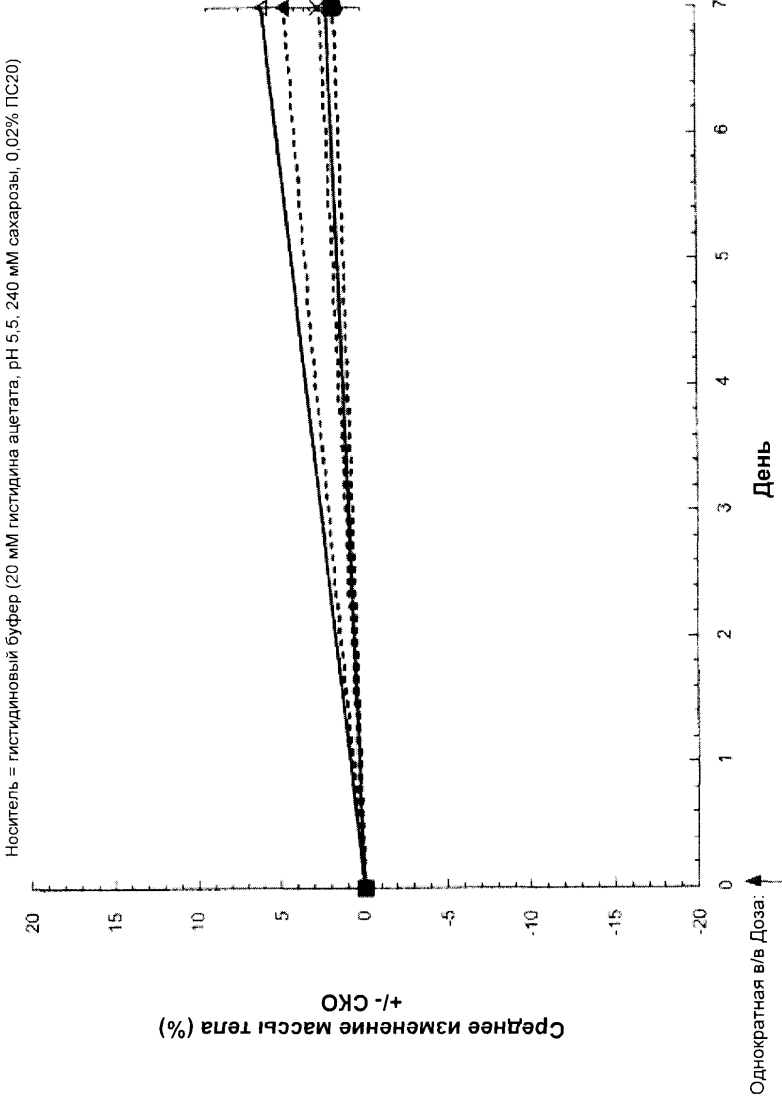
Фиг. 47



50/50



Фиг. 48



СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.

<120> АНТИТЕЛА К FcγR5, ИХ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> GNE-0350

<140> PCT/US2010/029516

<141> 2010-03-31

<150> 61/266,972

<151> 2009-12-04

<150> 61/166,217

<151> 2009-04-02

<150> 61/211,695

<151> 2009-04-01

<160> 68

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1

<211> 53

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: синтезированный
тэг qD и сигнальная последовательность

<400> 1

Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Val	Val
1					5				10					15	

Ile	Val	Gly	His	Gly	Val	Arg	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Ser
		20					25						30		

Leu	Lys	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Arg	Phe	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Pro	Val
		35					40					45			

Leu	Asp	Gln	Leu	Leu
	50			

<210> 2

<211> 30

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотидный праймер

<400> 2 gatcgatatc ytgctsacmc artgtccagc	30
<210> 3 <211> 21 <212> ДНК <213> искусственная последовательность	
<220> <221> источник <223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 3 tttdakytcc agcttggtac c	21
<210> 4 <211> 37 <212> ДНК <213> искусственная последовательность	
<220> <221> источник <223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 4 gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg	37
<210> 5 <211> 43 <212> ДНК <213> искусственная последовательность	
<220> <221> источник <223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 5 acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt	43
<210> 6 <211> 30 <212> ДНК <213> искусственная последовательность	
<220> <221> источник <223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 6 gatcgatatc gtgatgaccc artctcayaa	30

<210> 7	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 7	
tttdakytcc agcttggtac c	21
<210> 8	
<211> 37	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 8	
gacgcagcgtta cgctgargtg carytggtgg artctgg	37
<210> 9	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотидный праймер	
<400> 9	
ctggwcaggg mtccagagtt cca	23
<210> 10	
<211> 917	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая легкая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch7D11)	
<400> 10	
cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg ggatgggtcat	60
gtatcatcct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca ttcagatatc ctgctgacac	120
aatctccagc catcctgtct gtgagtccag gagaagaggt cagttttctcc tgcagggtcca	180
gtcagagcat tggcacaac atacactggt atcagcaaag aacaaatggt tctccaaggc	240


```

ttctcataaa gtttgcttct gagtctctct ctgggatccc ttccaggttt agtggcagtg      300
gatcagggac agattttact cttagcatca atagtgtgga gtctgaagat tttgcagatt      360
actactgtca acaaagtaat agctggccac tcacgttcgg tgctggtacc aaggtggaga      420
tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat gagcagttga      480
aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaaag     540
tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc     600
aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagaccctt gacgctgagc aaagcagact     660
acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca     720
caaagagctt caacagggga gagtgttaag cttggccgcc atggcccaac ttgtttattg     780
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatacaciaa tttcacaaat aaagcatttt     840
tttcaactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga     900
tcgggaatta attcggc                                           917

```

<210> 11
 <211> 214
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая
 легкая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch7D11)

<400> 11
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Phe Ala Ser Glu Ser Leu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

5

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 12

<211> 1484

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
тяжелая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch7D11)

<400> 12

tcgggttctat cgattgaatt ccaccatggg atgggtcatgt atcatccttt ttctagtagc	60
aactgcaact ggagcgtacg ctgaagtgca gttgggtggag tctgggggag gcttagtgca	120
gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagctatgg	180
catgtcttgg gttcgccaga ctccagacaa gaggctggag ttggtcgcaa ccattactag	240
aaatggtggt accacctatt atctagacag tgtgaagggc cgattcacca tctccagaga	300
caatgccaag aacaccctgt acctgcaaat gagcagtctg aagtctgagg acacagccat	360
gtattactgt gcaagaggtc ctatctacta tgattacggc tatgctatgg actactgggg	420
tcaaggaacc acagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct	480
ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga	540
ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca	600

```

caccttcccg gctgtectac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgactgt      660
gccctctagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa      720
caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc      780
gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa      840
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca      900
cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa      960
gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg tcctcaccgt     1020
cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aagggtctcca acaaagccct     1080
cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt     1140
gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct     1200
ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga     1260
gaacaactac aagaccagc ctcccgctgt ggactccgac ggctccttct tcctctacag     1320
caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat     1380
gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg     1440
agtgcgacgg ccctagagtc gacctgcaga agcttggccg ccat                        1484

```

<210> 13
 <211> 452
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 тяжелая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch7D11)

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						
Ala	Arg	Gly	Pro	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
				100					105						
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				115					120						
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
				130					135						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
				145					150						
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170						
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180					185						
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
				195					200						
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
				210					215						
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				225					230						
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250						
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265						
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275					280						
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				290					295						
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				305					310						

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 14
<211> 800
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
легкая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch10A8)

<400> 14
acctcgggttc tatcgattga attccacccat gggatgggtca tgtatcatcc tttttctagt 60
agcaactgca actggagtac attcagatat cgtgatgacc cagtctcata aattcatgtc 120
cacatcagta agagacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc agtcaggatg tgagtactgc 180
tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa ctactgattt attcggcatc 240
ctaccggtac actggagtcc ctgatcgctt cactggcagt ggatctggga cggatttcac 300
tttcaccatc agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt tattactgtc agcaacattt 360
tagtagtcct cggacgttcg gtggaggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 420

```

accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcttctgt      480
tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa      540
cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac      600
ctacagcctc agcagcaccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta      660
cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg      720
agagtgttaa gcttgccgc catggcccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa      780
ataaagcaat agcatcaca                                  800

```

<210> 15
 <211> 214
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 легкая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch10A8)

<400> 15
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16

<211> 1499

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 тяжелая цепь химерного антитела к FcRH5 человека (ch10A8)

<400> 16

cacctcgggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc ctttttctag	60
tagcaactgc aactggagcg tacgctgaag tgcagttggt ggagtctggg ggaggcttag	120
tgaagcctgg aggggtccctg aaaatctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagct	180
atgccgtgtc ttgggttcgc cagactcccg agaagaggct ggagtgggtc gctaccatta	240
gcagtgggtg tagtttgacc ttctatttag acagtgtgag gggtcgattc accatctcca	300
gagacaatgc caagaacacc ctgtacctgc aaatgagcag tctgaggtct gaagacacgg	360
ccatgtatta ctgtgcaagg ccatttcccg attactatgc ttgggactac tggggtcaag	420
gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac	480
cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact	540
tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct	600
tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct	660
ctagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca	720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc	780
cagcacctga accctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac	840

11

```

cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcggtggtg gtggacgtga gccacgaaga      900
ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcggtggag gtgcataatg ccaagacaaa      960
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta cggggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca     1020
ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc     1080
ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac     1140
cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa     1200
aggcttctat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa     1260
ctacaagacc acgcctcccc tgctggactc cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct     1320
caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga     1380
ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg     1440
acggccctag agtcgacctg cagaagcttg gccgccatgg cccaacttgt ttattgcag      1499

```

```

<210> 17
<211> 449
<212> белок
<213> искусственная последовательность

```

```

<220>
<221> источник
<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
        тяжелая цепь химерного антитела к FcRH5 (ch10A8) человека

```

```

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1              5              10              15

```

```

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

```

```

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
              35              40              45

```

```

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
              50              55              60

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
              100              105              110

```


Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

13

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 18

<211> 108

<212> белок

<213> Mus musculus

<220>

<221> источник

<223> Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного антитела
 (mu10A8)

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
 85 90 95

14

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 19
 <211> 108
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 переменный домен легкой цепи
 гуманизированного антитела(hu10A8.v1)

<400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20
 <211> 119
 <212> белок
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> источник
 <223> Описание искусственной последовательности: Вариабельный домен
 тяжелой цепи гуманизированного антитела (mu10A8)

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

15

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

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 119

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический
вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного антитела
(hu10A8.v1)

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

16

85

90

95

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 23
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR1-LC легкой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)
 <400> 22
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 23
 <211> 15
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR2-LC легкой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 23
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 32
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR3-LC легкой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 24
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 25
 <211> 11
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR4-LC легкой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 25
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид

<400> 26
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид

<400> 27
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид

<400> 28

Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 29

<211> 106

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
последовательность CL1-LC гуманизированного антитела
(hu10A8.v1)

<400> 29

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

<210> 30

<211> 108

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический
вариабельный домен легкой цепи гуманизированного антитела
(hu10A8.v1)

<400> 30

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

19

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 31
 <211> 25
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR1-НС тяжелой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 32
 <211> 13
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность FR2-НС тяжелой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 32
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 33
 <211> 32
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая последовательность FR3-НС тяжелой цепи гуманизированного антитела (hu10A8.v1)

 <400> 33
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 1 5 10 15

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 34
 <211> 11
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая последовательность FR4-НС тяжелой цепи гуманизированного антитела (hu10A8.v1)

 <400> 34
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 35
 <211> 13
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 35
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val Ser
 1 5 10

 <210> 36
 <211> 16
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический пептид
 <400> 36

21

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

<210> 37
 <211> 12
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид

<400> 37
 Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 38
 <211> 108
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Ситетическая
 последовательность CH1-НС гуманизированного антитела
 (hu10A8.v1)

<400> 38
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 100 105

<210> 39
 <211> 222

22

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Ситетическая последовательность Fc-НС гуманизированного антитела (hu10A8.v1)

<400> 39

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

23

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 40
 <211> 119
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Ситетический
 переменный домен тяжелой цепи гуманизированного
 антитела (hu10A8.v1)

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 <211> 214
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетическая
 последовательность ThioMab-hu10A8.v1-NC(A118C)-легкой цепи

<400> 41
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```
<210> 42
<211> 449
<212> белок
<213> искусственная последовательность
<220>
```

25

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетическая последовательность ThioMab-hu10A8.v1-HC(A118C) -тяжелой цепи

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

26

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 43

<211> 214
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: синтетическая
 последовательность ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C)-легкой цепи

 <400> 43
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 44
<211> 449
<212> белок
<213> искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> описание искусственной последовательности: синтетическая
последовательность ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C) -тяжелой цепи

<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

29

180

185

190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 45
 <211> 23
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 46
 <211> 15
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 32
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 48
 <211> 11
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 49
 <211> 25
 <212> белок

31

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 50

<211> 13

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 51

<211> 30

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 52

<211> 11

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 52

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 53

<211> 30

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 альбуминсвязывающий пептид

<400> 53

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
 1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe

32

20

25

30

<210> 54
 <211> 20
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 альбуминсвязывающий пептид

<400> 54
 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 альбуминсвязывающий пептид

<400> 55
 Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
 20

<210> 56
 <211> 18
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 альбуминсвязывающий пептид

<400> 56
 Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15

Asp Asp

<210> 57

<211> 11
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический
 альбуминсвязывающий пептид

<400> 57
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

<210> 58
 <211> 684
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 gatgtgctcc ttggagctgg tgtgcagtgt cctgactgta agatcaagtc caaacctgtt 60
 ttggaattga ggaaacttct cttttgatct cagcccttgg tgggccaggt cttcatgctc 120
 tgtgggtgat attactgggc ctggctcctg tcagtggaca gtttgcaagg acaccaggc 180
 ccattatctt cctccagcct ccatggacca cagtcttcca aggagagaga gtgaccctca 240
 cttgcaaggg atttcgcttc tactcaccac agaaaacaaa atgggtaccat cggtagcctt 300
 ggaaagaaat actaagagaa accccagaca atatccttga gggtcaggaa tctggagagt 360
 acagatgcca ggcccagggc tcccctctca gtagccctgt gcacttgatg ttttcttcag 420
 agatgggatt tcctcatgct gccaggcta atgttgaact cctgggctca agtgatctgc 480
 tcacctaggc ctctcaaagc gctgggatta cagcttcgct gatcctgcaa gctccacttt 540
 ctgtgtttga aggagactct gtggttctga ggtgccgggc aaaggcggaa gtaacactga 600
 ataatactat ttacaagaat gataatgtcc tggcattcct taataaaaaga actgacttcc 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 684

<210> 59
 <211> 124
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
 20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
 35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

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

His Leu Asp Phe Ser Ser Glu Met Gly Phe Pro His Ala Ala Gln Ala
100 105 110

Asn Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Thr
115 120

<210> 60
<211> 5392
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 60
aattcactaa tgcattctgc tctttttgag agcacagctt ctcagatgtg ctccttggag 60
ctggtgtgca gtgtcctgac tgtaagatca agtccaaacc tgttttggaa ttgaggaaac 120
ttctcttttg atctcagccc ttggtggtcc aggtcttcat gctgctgtgg gtgatattac 180
tggtcctggc tectgtcagt ggacagtttg caaggacacc caggccatt atttctctcc 240
agcctccatg gaccacagtc ttccaaggag agagagtgc cctcacttgc aagggatttc 300
gcttctactc accacagaaa acaaaatggt accatcggtc cctcgggaaa gaaatactaa 360
gagaaacccc agacaatatt cttgaggttc aggaatctgg agagtacaga tgccaggccc 420
agggctcccc tctcagtagc cctgtgcact tggatttttc ttcagcttcg ctgatcctgc 480
aagctccact ttctgtgttt gaaggagact ctgtggttct gaggtgccgg gcaaaggcgg 540
aagtaacact gaataatact atttacaaga atgataatgt cctggcattc cttaataaaa 600
gaactgactt ccatattcct catgcatgtc tcaaggacaa tgggtcatat cgctgtactg 660
gatataagga aagttgttgc cctgttttctt ccaatacagt caaaatccaa gtccaagagc 720
catttacacg tccagtgtcg agagccagct ccttccagcc catcagcggg aaccagtgga 780
ccctgacctg tgagaccag ctctctctag agaggtcaga tgtcccgtc cggttccgct 840
tcttcagaga tgaccagacc ctgggattag gctggagtct ctccccgaat ttccagatta 900
ctgccatgtg gagtaaagat tcagggttct actggtgtaa ggcagcaaca atgcctcaca 960
gcgtcatatc tgacagcccc agatcctgga tacagggtgca gatccctgca tctcatcctg 1020

tcctcactct cagccctgaa aaggctctga attttgaggg aaccaaggtg acacttcact	1080
gtgaaacca ggaagattct ctgcgcactt tgtacaggtt ttatcatgag ggtgtcccc	1140
tgaggcaciaa gtcagtcctc tgtgaaaggg gagcatccat cagcttctca ctgactacag	1200
agaattcagg gaactactac tgcacagctg acaatggcct tggcgccaag cccagtaagg	1260
ctgtgagcct ctgagtcact gttcccggtg ctcactcctg cctcaacctc agctctcctg	1320
aggacctgat ttttgagggg gccaaaggtga cacttcactg tgaagcccag agagggtcac	1380
ttcccatcct gtaccagttt catcatgagg atgctgccct ggagcgtagg tcggccaact	1440
ctgcaggagg agtggccatc agcttctctc tgactgcaga gcattcaggg aactactact	1500
gcacagctga caatggcttt ggccccagc gcagtaaggc ggtgagcctc tccatcactg	1560
tcctgtgtc tcactcgtc ctcacctca gctctgctga ggccctgact tttgaaggag	1620
ccactgtgac acttcactgt gaagtccaga gaggttcccc acaaatccta taccagtttt	1680
atcatgagga catgcccctg tggagcagct caacacctc tgtgggaaga gtgtccttca	1740
gcttctctct gactgaagga cattcaggga attactactg cacagctgac aatggctttg	1800
gtccccagcg cagtgaagtg gtgagccttt ttgtcactgt tccagtgtct cgccccatcc	1860
tcacctcag gggtcccagg gccagggctg tgggtgggga cctgctggag cttcactgtg	1920
aggccccgag aggcctctcc ccaatcctgt actggtttta tcatgaggat gtcacctg	1980
ggagcagctc agccccctct ggaggagaag cttctttcaa cctctctctg actgcagaac	2040
attctggaaa ctactcatgt gaggccaaca atggcctagt ggcccagcac agtgacaciaa	2100
tatcactcag tgttatagtt ccagtatctc gtcccatcct caccttcagg gctcccagg	2160
cccaggctgt ggtgggggac ctgctggagc ttcactgtga ggccctgaga ggctcctccc	2220
caatcctgta ctgggtttat catgaagatg tcacctggg taagatctca gccccctctg	2280
gaggaggggc ctcttcaac ctctctctga ctacagaaca ttctggaatc tactcctgtg	2340
aggcagaciaa tgggtccggg gccagcgca gtgagatggt gacactgaaa gttgcagttc	2400
cgggtgtctc cccggctctc accctcaggg ctcccgggac ccatgctgct gtgggggacc	2460
tgtctgagct tctactgtgag gccctgagag gctctcccct gatcctgtac cggttttttc	2520
atgaggatgt caccctagga aataggctcgt cccctctctg aggagcgtcc ttaaacctct	2580
ctctgactgc agagcactct gaaaactact cctgtgaggc cgacaatggc ctcggggccc	2640
agcgagctga gacagtgaca ctttatatca cagggtgac cggaacaga agtggccctt	2700
ttgccacagg agtcgccggg ggctgctca gcatagcagg ccttgctgct ggggactgc	2760
tgctctactg ctggctctcg agaaaagcag ggagaaagcc tgcctctgac cccgccagga	2820

gccctccaga ctcggactcc caagagccca cctatcacaa tgtaccagcc tgggaagagc 2880
 tgcaaccagt gtacactaat gcaaactcta gaggagaaaa tgtgggtttac tcagaagtac 2940
 ggatcatcca agagaaaaag aaacatgcag tggcctctga cccagggcat ctcaggaaca 3000
 agggttcccc tatcatctac tctgaagtta aggtggcgctc aaccccggtt tccggatccc 3060
 tgttcttggc ttcctcagct cctcacagat gagtccacac gtctctccaa ctgctgtttc 3120
 agcctctgca ccccaaagt ccccttgggg gagaagcagc attgaagtgg gaagatttag 3180
 gctgccccag accatatcta ctggcctttg tttcacatgt cctcattctc agtctgacca 3240
 gaatgcaggg cctgctgga ctgtcacctg tttccagtt aaagccctga ctggcaggtt 3300
 ttttaatcca gtggcaaggt gctcccactc cagggcccag cacatctcct ggattcctta 3360
 gtgggcttca gctgtgattg ctgttctgag tactgtcttc atcacacccc cacagagggg 3420
 gtcttaccac acaaaggagg agtgggcctt caggagatgc cgggctggcc taacagctca 3480
 ggtgctccta aactccgaca cagagttcct gctttgggtg gatgcatttc tcaattgtca 3540
 tcagcctggg ggggctactg cagtgtgctg ccaaattggga cagcacacag cctgtgcaca 3600
 tgggacatgt gatgggtctc cccacggggg ctgcatttca cactcctcca cctgtctcaa 3660
 actctaaggt cggcacttga caccaaggta acttctctcc tgctcatgtg tcagtgtcta 3720
 cctgccaag taagtggctt tcatacacca agtcccaagt tcttccatc ctaacagaag 3780
 taaccagca agtcaaggcc aggaggacca ggggtgcaga cagaacacat actggaacac 3840
 aggaggtgct caattactat ttgactgact gactgaatga atgaatgaat gaggaagaaa 3900
 actgtgggta atcaaaactg cataaaatcc agtgcactcc ctaggaaatc cgggaggtat 3960
 tctggcttcc ctaagaaaca acggaagaga aggagcttgg atgaggaaac tgttcagcaa 4020
 gaggaagggc ttctcacact ttcatgtgct tgtggatcac ctgaggatcc tgtgaaata 4080
 cagatactga ttcagtgggt ctgtgtagag cctgagactg ccatttctaac atgttcccag 4140
 gggatgctga tgctgctggc cctgggactg cactgcatgc atgtgaagcc ctataggtct 4200
 cagcagaggc ccatggagag ggaatgtgtg gctctggctg cccagggccc aactcggttc 4260
 acacggatcg tgctgctccc tggccagcct ttggccacag caccaccagc tgctgttgct 4320
 gagagagctt cttctctgtg acatgttggc tttcatcagc caccctggga agcggaaagt 4380
 agctgccact atctttgttt cccacacctc ggctcacac tttcccatga aaagggtgaa 4440
 tgtatataac ctgagccctc tccattcaga gttgttctcc catctctgag caatgggatg 4500
 ttctgttccg cttttatgat atccatcaca tcttatcttg atctttgctc ccagtggatt 4560
 gtacagtgat gacttttaag cccacggcc ctgaaataaa atccttccaa gggcattgga 4620
 agctctctcc acctgaacca tggttttca tgcttccaag tgcagggcc ttgccagat 4680

```

agacagggct gactctgctg cccaacctt tcaaggagga aaccagacac ctgagacagg 4740
agcctgtatg cagcccagtg cagccttgca gaggacaagg ctggaggcat ttgtcatcac 4800
tacagatatg caactaaaat agacgtggag caagagaaat gcattccac cgaggccgct 4860
tttttaggcc tagttgaaag tcaagaagga cagcagcaag cataggctca ggattaaaga 4920
aaaaaatctg ctcacagttt gttctggagg tcacatcacc aacaaagctc acgccctatg 4980
cagttctgag aaggtggagg caccaggctc aaaagaggaa atttagaatt tctcattggg 5040
agagtaaggt acccccatcc cagaatgata actgcacagt ggcagaacaa actccaccct 5100
aatgtgggtg gaccccatcc agtctgttga aggcctgagt gtaacaaaag ggcttattct 5160
tcctcaagta agggggaact cctgctttgg gctgggacat aagtttttct gctttcagac 5220
gcaaactgaa aaatggctct tcttgggtct tgagcttgct ggcataatgga ctgaaagaaa 5280
ctatgctatt ggatctctg gatctccagc ttgctgactg cagatcttga gatatgtcag 5340
cctctacagt cacaagagct aattcattct aataaaccaa tctttctgta aa 5392

```

<210> 61
 <211> 977
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 61
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1          5          10          15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20          25          30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
35          40          45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys
50          55          60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65          70          75          80

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

His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
100         105         110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu

```

38

115

120

125

Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe
 130 135 140

Leu Asn Lys Arg Thr Asp Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp
 145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val
 165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro
 180 185 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr
 195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
 210 215 220

Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
 225 230 235 240

Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
 245 250 255

Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile Ser Asp
 260 265 270

Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val
 275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
 290 295 300

Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg
 305 310 315 320

Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu
 325 330 335

Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn
 340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu
 370 375 380

Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His
 385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His
 405 410 415

Glu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val
 420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
 435 440 445

Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu
 450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
 465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val
 485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met
 500 505 510

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser
 515 520 525

Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
 530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr
 545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
 565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly
 580 585 590

Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
 595 600 605

Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
 610 615 620
 Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
 625 630 635 640
 Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
 645 650 655
 Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
 660 665 670
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
 675 680 685
 Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
 690 695 700
 Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
 705 710 715 720
 His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala Gln
 725 730 735
 Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
 740 745 750
 Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu
 755 760 765
 Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
 770 775 780
 Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser
 785 790 795 800
 Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
 805 810 815
 Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
 820 825 830
 Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe
 835 840 845

41

Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala
850 855 860

Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys
865 870 875 880

Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
900 905 910

Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
915 920 925

Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 62

<211> 2934

<212> ДНК

<213> макака яванский

<400> 62

```

atgctgctgt gggtgatact actggtcctg gtcctgtca gtggacagtt tgtaaggaca      60
tacaagtcca ttattttcct ccagcctcca tggaccacag tcttccgagg agagagagtg      120
aatctgactt gcaagggatt tggcttctac tcatcacaaa aaacaaaatg gtactatcgg      180
caccttgga aagaaatatt gagagaaacc caaaaaata cccttgaggt tcaggaatct      240
ggagagtaca gatgccaggc ccagggtcc cctctcagta gccctgtgtc cttggacttt      300
tcttcagctt cgctgaccc gcaagctcca ctttctgtgt ttgaaggaga ctctgtggtt      360
ctgaggtgcc gggcaaaggc ggaagtaaca ctgaagacta ctatttaca gaataaaaat      420
gtcctggcat ttcttaataa atcaactgac ttccatattt ctcatgcaag tctcaaggac      480

aatggtgcat atcgctgtac tggatataag gaaacttggt gccttggttc ttccaacaca      540

```

gtcaaaatcc aagtccaaga gtcatttaca cgtccagtgt tgagagtcag ctccttccag	600
cccatcagcg ggagcccagt gaccctgacc tgtgagaccc agctctctct agagagggtca	660
gatgtcccg ctcagtctctg cttcttcaga aatgaccaga tgctgggagc aggctgcagc	720
ctctccccga agttccggat tactgccatg tggagtaaag attcaggatc ctactgggtg	780
aaggcagcaa caatgtgtta tgacaccaca tctaacagct tgagatcctg gatacagggtg	840
ctgatccccg catctcatcc tgcctcact ctcagccctg aaaaggctct gaattttgag	900
ggaaccaagg tgaaacttca ctgtgaaacc caggaagatt ctctgcgcac tttgtacaag	960
ttttatcatg acggtgttcc cctgaggtag aagtcagtcc gctgtgaaa gggagcatcc	1020
atcagcttct cactgactac agagcattca gggaactact actgcacagc tgacaatggc	1080
catggtgcc aagccagtga ggctgtaagc ctgtcagtca ctgtccctgt gtctcgccct	1140
gtcctcacc tcagctctgc agaggacctg atttctgagg gagccaagtt gacacttcac	1200
tgtgaagccc agagagggtc actccccatc gtgtaccagt ttcacatga gaatgcctcc	1260
ctggggaata ggctcgccca ctctgcagga ggagtggcca tcagcttctc tctgactgca	1320
gaccattcgg ggaactacta ctgcacagct aacaatggct ttggcccca gcgcagttag	1380
gcagttagcc tctccatcac tgtaccctg tctcgtcctg tcctcaccct cagctctgct	1440
gaggccctga cttttgaagg agccacggtg acactttact gtgagggtcca gagagggtcc	1500
ccacgaatcc tataccagtt ttatcatgag gacgtgcccc tggggagcaa ctcaacacc	1560
tctgtgggaa aagtgtcctt cagcttctct ctgactgcag cacattcagg gaattactac	1620
tgcacagctg acaacggctt tgggtcccag cgcagttagg cggtagacct ctttgtcact	1680
gttccagtgt ctgccccat cctcaccctc agggttccca gggccaggc tgtggtgggg	1740
gaccttctgg agcttcgctg tgaggccctg agaggctctc ccccgatcat gtactggttt	1800
tatcatgagg atgtcaccct ggggagcagc tcagtcacct ctggaggaga agcctctttc	1860
aacctctctc tgactgcaga acattctgga aactactcat gtgaggccaa caatggcctg	1920
gtggcccagc acagtgatac aatatcactc agtggttatag ttccagtgtc tcgtcccatc	1980
ctcaccttca gagctcccag ggcccaggct gtagtggggg acctgctgga gcttactgt	2040
gaggccctga gaggctcctc cccaatcctg tactgggttt atcatgaaga tgtcaccctg	2100
ggtaagatct cagccccctc tggaggagga gcctacttca acctctctct gactacagaa	2160
cattctggaa tctactcctg tgaggcggac aatgggtctg aggccagcg cagttagatg	2220
gtgacactga aagttgcagt tccggtgtct cgcctcctc tcacctcag ggctcccagg	2280
gccaggttg cgggtgggga cctgctggag cttcactgtg aggcctgag aggtctctcc	2340
ctgatcctgt accagtttta tcatgaggat gtcaccctag gaaatagctc agccctctct	2400

```

ggaggagcgt tcttcaacct ctctctgact gcagaacct ctggaaacta ctctgtgag      2460
gccgacaatg gtctgggggc ccagcgagcgt gagacagtga cactttatct cacagggctg      2520
accgagaaca gaagtggccc tgttgccacg ggtgtcaccc ggggtctgct cagcctagca      2580
ggccttgctg ctgtggcact gctgctctac tgctggctct caagaaaagc agggagagag      2640
cctgcctctg acccctgcag gagcccttca gacttggact cccaggagcc cacctaccac      2700
aatgtaccag cctgggaaga gctgcaacca gtgtacagta atgtgaatcc tagaggagaa      2760
aatgtggttt actcagaagt acggatcatc cgagagaaaa agaacaatgc agtggcctct      2820
aaccgccaggc atctcaggaa caagggttcc tgtatcatct actctgaagt gaaggtggca      2880
tcaaccccag cctccagatg cctgttcttg gcttcctcag ctctcacag atga              2934

```

<210> 63

<211> 977

<212> белок

<213> макака яванский

<400> 63

```

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

```

```

Phe Val Arg Thr Tyr Lys Ser Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
              20              25              30

```

```

Thr Val Phe Arg Gly Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Lys Gly Phe Gly
              35              40              45

```

```

Phe Tyr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Trp Tyr Tyr Arg His Leu Gly Lys
50              55              60

```

```

Glu Ile Ser Arg Glu Thr Gln Lys Asn Thr Leu Glu Val Gln Glu Ser
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Ser Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
100              105              110

```

```

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
115              120              125

```

```

Val Thr Leu Lys Thr Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Val Leu Ala Phe
130              135              140

```


Leu Asn Lys Ser Thr Asp Phe His Ile Ser His Ala Ser Leu Lys Asp
145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Thr Cys Cys Leu Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Ser Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Val Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Ser Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asn Asp Gln Met Leu Gly Ser Gly Cys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Lys Phe Arg Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
245 250 255

Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Cys Tyr Asp Thr Thr Ser Asn
260 265 270

Ser Leu Arg Ser Trp Ile Gln Val Leu Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
290 295 300

Lys Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Lys
305 310 315 320

Phe Tyr His Asp Gly Val Pro Leu Arg Tyr Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Lys Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly His Gly Ala Lys Pro Ser Glu Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
370 375 380

45

Ser Ser Ala Glu Asp Leu Ile Ser Glu Gly Ala Lys Leu Thr Leu His
 385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Val Tyr Gln Phe His His
 405 410 415

Glu Asn Ala Ser Leu Gly Asn Arg Ser Ala His Ser Ala Gly Gly Val
 420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Asp His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
 435 440 445

Thr Ala Asn Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu
 450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
 465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu Tyr Cys Glu Val
 485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Arg Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val
 500 505 510

Pro Leu Gly Ser Asn Ser Thr Pro Ser Val Gly Lys Val Ser Phe Ser
 515 520 525

Phe Ser Leu Thr Ala Ala His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
 530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu Phe Val Thr
 545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
 565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu Arg Cys Glu Ala Leu Arg Gly
 580 585 590

Ser Pro Pro Ile Met Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
 595 600 605

Ser Ser Ser Val Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
 610 615 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu

46

625		630		635		640									
Val	Ala	Gln	His	Ser	Asp	Thr	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ile	Val	Pro	Val
				645					650					655	
Ser	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Ala	Val	Val
			660					665					670		
Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Pro
		675					680					685			
Ile	Leu	Tyr	Trp	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Lys	Ile	Ser
	690					695					700				
Ala	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu
705					710					715					720
His	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Leu	Glu	Ala	Gln
			725						730					735	
Arg	Ser	Glu	Met	Val	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Pro
			740					745					750		
Val	Leu	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Val	Ala	Val	Gly	Asp	Leu
		755					760					765			
Leu	Glu	Leu	His	Cys	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Leu	Ile	Leu	Tyr
	770					775					780				
Gln	Phe	Tyr	His	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Ala	Leu	Ser
785				790						795					800
Gly	Gly	Ala	Phe	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	His	Ser	Gly	Asn
			805						810					815	
Tyr	Ser	Cys	Glu	Ala	Asp	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Glu	Thr
			820					825					830		
Val	Thr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Glu	Asn	Arg	Ser	Gly	Pro	Val
		835					840					845			
Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala
	850					855					860				
Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Tyr	Cys	Trp	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Gly	Arg	Glu
865					870					875					880

Pro Ala Ser Asp Pro Cys Arg Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ser Gln Glu
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
900 905 910

Ser Asn Val Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
915 920 925

Ile Ile Arg Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asn Pro Arg His
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Cys Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Ala Ser Arg Cys Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 64
<211> 108
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

47-1

```

<210> 65
<211> 119<212> белок
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> любая аминокислота
<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> любая аминокислота

<400> 65
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

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

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

Ala Arg Gly Arg Xaa Gly Xaa Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```