



(51) МПК

*C07K 16/18* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2007115040/10, 22.09.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**22.09.2005**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

**23.09.2004 US 60/612,468****30.06.2005 US 60/696,353**(43) Дата публикации заявки: **27.10.2008** Бюл. № 30(45) Опубликовано: **27.02.2011** Бюл. № 6(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RENARD M et al: "Deriving topological constraints from functional data for the design of reagentless fluorescent immunosensors" J Mol Biol. 2003 Feb 7; 326 (1), реферат. RU 2221809 C2, 20.01.2004.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **23.04.2007**(86) Заявка РСТ:  
**US 2005/034353 (22.09.2005)**(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2006/034488 (30.03.2006)**

Адрес для переписки:

**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):

**ЭЙГЕНБРОТ Чарльз В. (US),  
ДЖУНУТУЛА Джагат Редди (US),  
ЛОУМЭН Генри (US),  
РААБ Хельга Е. (US),  
ВАНДЛЕН Ричард (US)**

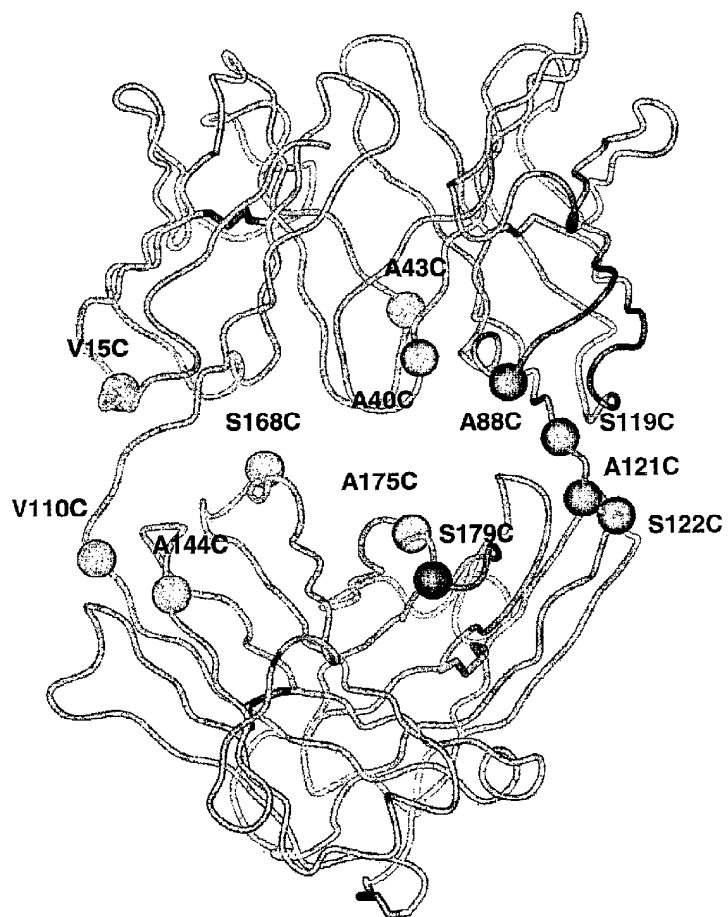
(73) Патентообладатель(и):

**ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)****(54) АНТИТЕЛА, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИНОВ, И ИХ КОНЬЮГАТЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Были сконструированы антитела путем замены одной или нескольких аминокислот родительского антитела высокореактивными цистеиновыми аминокислотными остатками, не являющимися перекрестноспшитыми. Описанные антитела были конъюгированы с одной или несколькими молекулами лекарственного средства (D) посредством линкера (L), в

результате чего были получены конъюгаты, имеющие формулу: Ab-(L-D)<sub>p</sub>, где p равно 1-4. Также описано диагностическое и терапевтическое применение соединений в фармацевтических композициях. Изобретение может быть использовано в целях in vitro, in situ и in vivo диагностики или обработки клеток млекопитающих или лечения ассоциированных с ними патологических состояний. 7 н. и 44 з.п. ф-лы, 25 ил., 7 табл.



ФИГ.1А

RU 2 4 1 2 9 4 7 C 2

RU 2 4 1 2 9 4 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007115040/10, 22.09.2005**(24) Effective date for property rights:  
**22.09.2005**

Priority:

(30) Priority:

**23.09.2004 US 60/612,468****30.06.2005 US 60/696,353**(43) Application published: **27.10.2008 Bull. 30**(45) Date of publication: **27.02.2011 Bull. 6**(85) Commencement of national phase: **23.04.2007**

(86) PCT application:

**US 2005/034353 (22.09.2005)**

(87) PCT publication:

**WO 2006/034488 (30.03.2006)**

Mail address:

**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**EhJGENBROT Charl'z V. (US),  
DZhUNUTULA Dzhagat Reddi (US),  
LOUMEHn Genri (US),  
RAAB Khel'ga E. (US),  
VANDLEN Richard (US)**

(73) Proprietor(s):

**DZhENENTEK, INK. (US)**(54) **ANTIBODIES, CONSTRUCTED ON CYSTEINE BASIS AND THEIR CONJUGATES**

(57) Abstract:

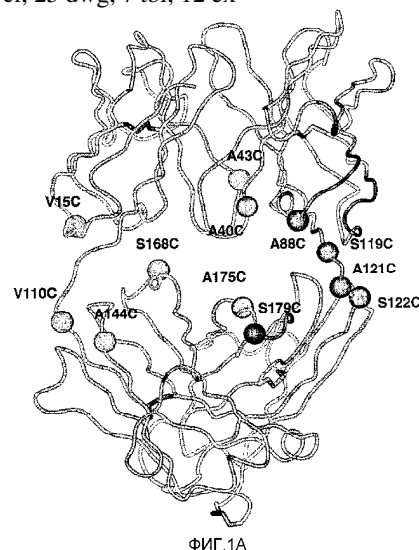
FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.

Antibodies have been constructed by substitution of one or several amino acids of parent antibody with highly reactive cysteine amino acid residues, which are not crosslinked. Described antibodies have been conjugates with one or several molecules of drug (D) by means of linker (L), which resulted in obtaining conjugates of formula: Ab-(L-D)<sub>p</sub>, where p equals 1-4. Also described is diagnostic and therapeutic application of compounds in pharmaceutical compositions.

EFFECT: invention can be used for aims of in vitro, in situ and in vivo diagnostics or for processing of mammalian cells or treatment of associated with them pathological conditions.

51 cl, 25 dwg, 7 tbl, 12 ex



Текст описания приведен в факсимильном виде.

По настоящей действительной заявке, поданной в соответствии со статьей 37, §1.53(b) Свода Федеральных Правил (CFR), испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США рег. № 60/612468, поданной 23 сентября 2004, и предварительной заявки на патент США рег. № 60/696353, поданной 30 июня 2005 в соответствии со статьей 35, §119(e) Кодекса законов США, описание которых во всей своей полноте вводится в настоящую заявку посредством ссылки.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

В общих чертах, настоящее изобретение относится к антителам, сконструированным на основе реакционноспособных цистеиновых остатков, а более конкретно, к антителам, которые могут быть использованы в терапевтических или диагностических целях. Антитела, сконструированные на основе цистеинов, могут быть конъюгированы с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, аффинными лигандами, такими как биотин, и детектируемыми метками, такими как флуорофоры. Настоящее изобретение также относится к способам применения антител и конъюгатов "антитело-лекарственное средство" в целях *in vitro*, *in situ* и *in vivo* диагностики, либо в целях обработки клеток млекопитающих или лечения ассоциированных с ними патологических состояний.

#### **Предшествующий уровень техники**

Была разработана терапия с использованием антител для целенаправленного лечения пациентов, страдающих раком, а также



иммунологическими и ангиогенными расстройствами. В целях обнаружения эффективных клеточных мишеней для диагностики и  
лечения рака с применением антител, исследователями были  
предприняты попытки идентифицировать трансмембранные или какие-  
либо другие опухолеассоциированные полипептиды, которые  
специфически экспрессируются на поверхности раковых клеток, в  
отличие от нормальных не раковых клеток. Идентификация таких  
опухолеассоциированных полипептидов антигена клеточной  
поверхности, то есть, опухолеассоциированных антигенов (ТАА),  
дала возможность осуществлять специфическую деструкцию раковых  
клеток-мишеней посредством терапии с применением антител.

Использование конъюгатов "антитело-лекарственное средство"  
(ADC), то есть, иммуноконъюгатов, в целях локальной доставки  
цитотоксических или цитостатических агентов, например,  
лекарственных средств, для уничтожения или подавления 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  
& Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-  
Duvaz & Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172; патент  
США № 4975278), теоретически позволяет осуществлять направленную  
доставку лекарственного средства в опухоли и обеспечивать их  
аккумуляцию внутри клеток, тогда как системное введение этих  
неконъюгированных лекарственных средств может приводить к  
продуцированию уровней токсичности, которые являются  
неприемлемыми для нормальных клеток, но недостаточными для  
уничтожения опухолевых клеток (Baldwin et al., 1986, Lancet pp.

(Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, 1985, "Antibody Carriers Of  
Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal  
Antobodies 84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera  
et al. (eds.), pp. 475-506). Таким образом, желательно, чтобы  
максимальная эффективность сочеталась с минимальной  
токсичностью. В попытках конструирования ADC и улучшения его  
свойств, все усилия были направлены на повышение селективности  
моноклональных антител (mAb), а также на улучшение таких  
свойств, как связывание с лекарственным средством и  
высвобождение лекарственных средств (Lambert J. (2005) Curr.  
Opinion in Pharmacology 5:543-549). Сообщалось, что в этих  
стратегиях могут быть использованы как поликлональные, так и  
моноклональные антитела (Rowland et al. (1986), Cancer Immunol.  
Immunother. 21:183-87). Лекарственными средствами, используемыми  
в этих способах, являются дауномицин, доксорубицин, метотрексат  
и виндезин (Rowland et al. (1986), см. выше). Токсинами,  
используемыми в конъюгатах "антитело-токсин", являются  
бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин,  
растительные токсины, такие как рицин, и небольшие молекулы-  
токсины, такие как 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), майтанзиноиды (EP  
1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-  
8623) и калихеамицин (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928;  
Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Токсины могут  
оказывать свое цитотоксическое и цитостатическое действие в

соответствии с механизмами, включающими связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства, при их конъюгировании с крупными антителами или лигандами белков-рецепторов, имеют тенденцию к потере или уменьшению активности.

Конъюгат "антитело-радиоизотоп" был разрешен к применению. Зевалин (Zevalin®) (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idex) состоит из мышиного моноклонального антитела IgG1-каппа, направленного против антигена CD20, присутствующего на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и радиоактивных изотопов  $^{111}\text{In}$  или  $^{90}\text{Y}$ , связанных с хелатообразующим комплексом "тиомочевина-линкер" (Wiseman et al. (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Хотя зевалин® обладает активностью, направленной против В-клеточной не ходжкинской лимфомы (НХЛ), однако, его введение приводит к тяжелой и хронической цитопении у большинства пациентов. В 2000 г. было дано разрешение на применение препарата милотарг<sup>TM</sup> (Mylotarg®) (гемтузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceuticals), то есть, конъюгата "антитело-лекарственное средство", состоящего из антитела против человеческого CD33, связанного с калихеамицином, для лечения острого миелоидного лейкоза путем инъекции указанного препарата (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенты США №№ 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), конъюгат "антитело-лекарственное средство", состоящий из антитела против

человеческого C242, связанного посредством дисульфидного линкера  
SPP с майтанзиноидным лекарственным средством, DM1 (Xie et al.  
5 (2004) J. of Pharm. and Exp. Ther. 308(3):1073-1082) был  
использован в испытаниях фазы II для лечения CanAg-  
экспрессирующих раковых опухолей, таких как раковые опухоли  
10 толстой кишки, поджелудочной железы, желудка и т.п. Препарат  
MLN-2704 (Millenium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.),  
т.е., конъюгат "антитело-лекарственное средство", состоящий из  
15 моноклонального антитела против мембраносвязанного антигена  
предстательной железы (PSMA), присоединенного к майтанзиноидному  
лекарственному средству, DM1, находится на стадии исследования  
20 его возможного применения для лечения опухолей предстательной  
железы.

25 Ауристатиновые пептиды, ауристин Е (AE) и  
монометилауристин (MMAE), т.е., синтетические аналоги  
доластатина (WO 02/088172) были конъюгированы (i) с химерными  
30 моноклональными антителами cBR96 (специфическими к антигену  
Lewis Y на карциномах); (ii) с cAC10, которое является  
35 специфичным к CD30, присутствующему на гематологических  
злокачественных опухолях (Klussman et al. (2004) Bioconjugate  
Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al. (2003) Nature  
40 Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) Blood  
102(4):1458-1465; публикация заявки на патент США 2004/0018194);  
45 (iii) с анти-CD20 антителами, такими как ритуксан® (WO  
04/032828), используемый для лечения CD20-экспрессирующих  
раковых опухолей и иммунных расстройств; (iv) с анти-EphB2R  
50 антителом 2H9 и с анти-IL-8 антителом, используемыми для лечения

пака толстой кишки (Mao et al. (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) с антителом против Е-селектина (Bhaskar et al. (2003) Cancer Res. 63:6387-6397) и (vi) с другими анти-CD30 антителами (WO 03/043583). Варианты ауристатина Е описаны в патенте США 5767237 и в патенте США 6124431. Монометилауристатин Е, конъюгированный с моноклональными антителами, описан в работе Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, опубликованной 28 марта, 2004. Ауристатиновые аналоги MMAE и MMAF были конъюгированы с различными антителами (WO 2005/081711).

Стандартный метод присоединения, т.е., ковалентного связывания молекулы лекарственного средства с антителом, по существу, позволяет получить гетерогенную смесь молекул, в которых лекарственные средства присоединены в различных участках молекулы антитела. Так, например, цитотоксические лекарственные средства обычно конъюгируют с антителами посредством большого количества лизиновых остатков антитела с получением гетерогенной смеси конъюгата "антитело-лекарственное средство". В зависимости от условий реакции, гетерогенная смесь обычно содержит определенное число антител, к которым присоединены от 0 до 8 или более молекул лекарственного средства. Кроме того, в каждой подгруппе конъюгатов, с отношением молекул лекарственного средства к молекулам антитела, равным конкретному целому числу, может присутствовать гетерогенная смесь, в которой молекула лекарственного средства присоединена в различных участках антитела. Аналитические и препаративные методы являются неподходящими для разделения и характеристики молекул-конъюгатов

“антитело-лекарственное средство” в гетерогенной смеси, полученной в результате реакции конъюгирования. Антитела представляют собой крупные, сложные и отличающиеся по своей структуре биомолекулы, которые, в большинстве случаев, имеют множество реакционноспособных функциональных групп. Способность этих групп реагировать с линкерными реагентами и промежуточными соединениями “лекарственное средство-линкер” зависит от таких факторов, как pH, концентрация, концентрация соли и присутствие сорастворителей. Кроме того, способ многостадийного конъюгирования может оказаться невозпроизводимым, что обусловлено трудностями регуляции условий реакции и характеристики реагентов и промежуточных соединений.

В отличие от большинства аминов, которые являются протонированными и менее нуклеофильными при pH ~7, тиолы цистеинов являются реакционноспособными при нейтральном pH. Поскольку свободные тиоловые (RSH, сульфгидрильные) группы являются относительно реакционноспособными, то белки, содержащие цистеиновые остатки, часто имеют окисленную форму и представляют собой связанные с дисульфидом олигомеры, либо они содержат внутренние мостиковые дисульфидные группы. Внеклеточные белки обычно не содержат свободных тиоловых групп (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, page 55). Количество свободных тиолов в белке может быть оценено с помощью стандартного анализа Элмана. Примером связанного с дисульфидом пентамера является иммуноглобулин M, а примером белка, в котором внутренние дисульфидные мостики связаны с субъединицами, является иммуноглобулин G. В таких

белках, для получения реакционноспособного свободного тиола требуется восстановление дисульфидных связей реагентом, таким как дитиотреитол (ДТТ) или селенол (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-156). Применение такого метода может приводить к потере третичной структуры антител и специфичности их связывания с антигеном.

Тиоловые группы цистеина антител, в основном, являются более реакционноспособными, т.е. обладают большей нуклеофильностью по отношению к реагентам электрофильного конъюгирования, чем аминокислотные или гидроксильные группы антител. Цистеиновые остатки были введены в белки методами генной инженерии с образованием ковалентных связей с лигандами или с образованием новых внутримолекулярных дисульфидных связей (Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9644-9650; 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. Natl. Acad. Sci., USA, 98(15):8480-8484; патент США № 6248564). Однако, конструирование тиоловых групп цистеина путем замены различных аминокислотных остатков белка цистеиновыми остатками может быть связано с определенными проблемами, а особенно, если присутствуют несвязанные (свободные Cys) остатки или остатки, которые являются относительно доступными для реакции или окисления. В концентрированных растворах белка, независимо от того, являются ли они периплазмой *E.coli*, супернатантами культуры или частично или полностью очищенными белками,

свободные остатки Cys на поверхности белка могут связываться и окисляться с образованием межмолекулярных дисульфидов, а следовательно, и димеров или мультимеров белка. Образование димерных дисульфидов сообщает новому остатку Cys неспособность образовывать конъюгаты с лекарственным средством, лигандом или другой меткой. Кроме того, если белок в результате окисления образует внутримолекулярную дисульфидную связь между новым сконструированным Cys и уже имеющимся остатком Cys, то обе группы Cys становятся недоступными для функционирования в активном центре и к взаимодействию. Кроме того, такой белок может становиться неактивным или неспецифичным в результате неправильной укладки или потери третичной структуры (Zhang et al. (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

#### **Описание сущности изобретения**

Соединениями согласно изобретению являются сконструированные на основе цистеина антитела, в которых одна или несколько аминокислот родительского антитела заменены свободной цистеиновой аминокислотой. Сконструированное на основе цистеина антитело содержит одну или несколько свободных аминокислот цистеинов, имеющих величину реакционной способности тиола в пределах от 0,6 до 1,0. Свободная аминокислота цистеин представляет собой цистеиновый остаток, который был введен в родительское антитело методами генной инженерии и не является частью дисульфидного мостика.

В одном из своих аспектов, сконструированное на основе цистеина антитело получают способом, включающим:

(а) замену одного или нескольких аминокислотных остатков



родительского антитела цистеином; и

(b) определение реакционной способности тиоловой группы сконструированного на основе цистеина антитела путем проведения реакции взаимодействия указанного сконструированного на основе цистеина антитела с реагентом, взаимодействующим с тиолом.

Указанное сконструированное на основе цистеина антитело, в отличие от родительского антитела, может лучше реагировать с реагентом, взаимодействующим с тиолом.

Свободные цистеиновые аминокислотные остатки могут присутствовать в тяжелых или в легких цепях, либо они могут присутствовать в константных или в переменных доменах. Фрагменты антител, например, Fab, могут быть также сконструированы путем замены аминокислот фрагмента антитела одним или несколькими цистеиновыми аминокислотными остатками с получением сконструированных на основе цистеина фрагментов антител.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения (создания) сконструированного на основе цистеина антитела, включающему:

(a) введение одного или нескольких аминокислот цистеинов в родительское антитело с получением сконструированного на основе цистеина антитела; и

(b) определение способности тиоловой группы сконструированного на основе цистеина антитела реагировать с реагентом, взаимодействующим с тиолом;

где указанное сконструированное на основе цистеина антитело, в отличие от родительского антитела, обладает лучшей

способностью реагировать с реагентом, взаимодействующим с тиолом.

Стадия (a) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное сконструированное на основе цистеина антитело;

(ii) экспрессию указанного сконструированного на основе цистеина антитела; и

(iii) выделение и очистку указанного сконструированного на основе цистеина антитела.

Стадия (b) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела может включать экспрессию указанного сконструированного на основе цистеина антитела на вирусной частице, выбранной из фаговой или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа получения сконструированного на основе цистеина антитела может также включать:

(i) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с реагентом, обладающим аффинностью по отношению к реакционноспособному тиолу, с получением аффинно меченного антитела, сконструированного на основе цистеина; и

(ii) определение уровня связывания указанного аффинно меченного антитела, сконструированного на основе цистеина, со средой для иммобилизации.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу скрининга сконструированных на основе цистеина антител, имеющих в высокой степени реакционноспособные несвязанные

цистеиновые аминокислотные остатки, на их тиоловую реактивность, где указанный способ включает:

5 (a) введение одной или нескольких цистеинов в родительское антитело с получением сконструированного на основе цистеина антитела;

10 (b) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с реагентом, обладающим аффинностью по отношению к реакционноспособному тиолу, с получением аффинно  
15 меченного антитела, сконструированного на основе цистеина;

(c) измерение уровня связывания указанного аффинно  
20 меченного антитела, сконструированного на основе цистеина, со средой для иммобилизации; и

25 (d) определение способности тиоловой группы сконструированного на основе цистеина антитела реагировать с реагентом, взаимодействующим с тиолом.

30 Стадия (a) способа скрининга сконструированных на основе цистеина антител может включать:

(i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты,  
35 кодирующей указанное сконструированное на основе цистеина антитело;

40 (ii) экспрессию указанного сконструированного на основе цистеина антитела; и

(iii) выделение и очистку указанного сконструированного на  
45 основе цистеина антитела.

Стадия (b) способа скрининга сконструированных на основе цистеина антител может включать экспрессию указанного  
50 сконструированного на основе цистеина антитела на вирусной

частице, выбранной из фаговой или фагмидной частицы.

Стадия (b) способа скрининга сконструированных на основе цистеина антител может также включать:

(i) реакцию взаимодействия сконструированного на основе цистеина антитела с реагентом, обладающим аффинностью по отношению к реакционноспособному тиолу, с получением аффинно меченного антитела, сконструированного на основе цистеина; и

(ii) измерение уровня связывания аффинно меченного антитела, сконструированного на основе цистеина, со средой для иммобилизации.

Сконструированные на основе цистеина антитела могут быть использованы для лечения рака и представляют собой антитела, специфичные к клеточной поверхности и к трансмембранным рецепторам, а также к опухолеассоциированным антигенам (ТАА). Такие антитела могут быть использованы в виде "оголенных" антител (неконъюгированных с лекарственным средством или с меткой) или в виде конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) формулы I.

Варианты способов получения и скрининга сконструированных на основе цистеина антител включают способы, в которых указанным родительским антителом является фрагмент антитела, такой как hu4D5Fabv8. Таким родительским антителом может быть также гибридный белок, содержащий альбумин-связывающую пептидную последовательность (ABP). Родительским антителом может быть также гуманизованное антитело, выбранное из huMab4D5-1, huMab4D5-2, huMab4D5-3, huMab4D5-4, huMab4D5-5, huMab4D5-6, huMab4D5-7 и huMab4D5-8 (трастузумаба).

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно изобретению могут обладать способностью к сайт-специфическому и эффективному связыванию с реагентом, взаимодействующим с тиолом. Реагентом, взаимодействующим с тиолом, может быть многофункциональный линкерный реагент, реагент-метка для захвата, реагент флуорофор или промежуточное соединение "лекарственное средство-линкер".

Сконструированное на основе цистеина антитело может быть помечено детектируемой меткой, иммобилизовано на твердофазном носителе и/или конъюгировано с молекулой лекарственного средства.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к соединению-конъюгату "антитело-лекарственное средство", содержащему сконструированное на основе цистеина антитело (Ab) и молекулу лекарственного средства (D), где указанное сконструированное на основе цистеина антитело связано с молекулой D одной или несколькими свободными аминокислотами цистеинами посредством линкерной группы (L), и где указанное соединение имеет формулу I:



где p равно 1, 2, 3 или 4; и где указанное сконструированное на основе цистеина антитело получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела одной или несколькими свободными цистеинами. Молекулами лекарственных средств являются, но не ограничиваются ими, майтанзиноид, ауристатин, доластатин, трихотецен, CC1065, калихеамицин и другие энединовые

антибиотики, таксан, антрациклин и их стереоизомеры, изостеры, аналоги или производные. Репрезентативными молекулами лекарственных средств являются DM1, MMAE и MMAF.

Конъюгат "антитело-лекарственное средство" формулы I может также содержать альбумин-связывающуюся пептидную (ABP) последовательность, где указанный конъюгат имеет формулу Ia:



В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей сконструированное на основе цистеина антитело или конъюгат "сконструированное на основе цистеина антитело-лекарственное средство" и физиологически или фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Эта композиция для терапевтического применения является стерильной и может быть лиофилизирована.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к диагностическому и терапевтическому применению описанных здесь соединений и композиций. Фармацевтические композиции включают комбинации соединений формулы I и одного или нескольких химиотерапевтических средств.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу прекращения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или раковых клеток, включающему обработку указанных клеток конъюгатом "антитело-лекарственное средство" согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом в количестве, эффективном для прекращения или ингибирования пролиферации опухолевых или раковых клеток.

В других своих аспектах, настоящее изобретение относится к

способам лечения рака, аутоиммунного заболевания или  
инфекционного заболевания, где указанные способы включают  
5 введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества  
соединения-конъюгата "антитело-лекарственное средство" согласно  
изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или  
10 сольвата.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к  
способу лечения рака у млекопитающего, где указанное раковое  
15 заболевание характеризуется сверхэкспрессией рецептора ErbB. При  
этом, необязательно, чтобы млекопитающие были невосприимчивы или  
плохо восприимчивы к лечению неконъюгированным анти-ErbB  
20 антителом. Указанный способ включает введение млекопитающему  
терапевтически эффективного количества соединения-конъюгата  
25 "антитело-лекарственное средство" согласно изобретению.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к  
способу ингибирования роста опухолевых клеток, которые  
30 сверхэкспрессируют рецептор фактора роста, выбранный из группы,  
состоящей из рецептора HER2 и рецептора EGF, где указанный  
35 способ включает введение пациенту соединения-конъюгата  
"антитело-лекарственное средство", которое специфически  
связывается с указанным рецептором фактора роста, и указанного  
40 химиотерапевтического средства в количестве, эффективном для  
ингибирования роста опухолевых клеток у пациента.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к  
45 способу лечения человека, который является восприимчивым к  
расстройству, характеризующемуся сверхэкспрессией ErbB2-  
50 рецептора, или у которого было диагностировано такое

расстройство, где указанный способ включает введение  
эффективного количества комбинации соединения-конъюгата  
5 "антитело-лекарственное средство" и химиотерапевтического  
средства.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к  
10 аналитическому способу детекции раковых клеток, включающему  
обработку клеток соединением-конъюгатом "антитело-лекарственное  
средство" и определение уровня связывания указанного соединения-  
15 конъюгата "антитело-лекарственное средство" с данными клетками.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к  
20 промышленному изделию, содержащему соединение-конъюгат  
"антитело-лекарственное средство"; упаковку и вкладыш, вложенный  
в упаковку, или этикетку на упаковке, указывающие, что данное  
25 соединение может быть использовано для лечения рака.

#### **Краткое описание графического материала**

30 На фигуре 1A проиллюстрировано трехмерное представление  
фрагмента антитела hu4D5Fabv7 в координатах, определенных  
методом рентгеновской кристаллографии. Положения структуры  
35 репрезентативных сконструированных остатков Cys тяжелой и легкой  
цепей пронумерованы согласно системе последовательной нумерации.

40 На фигуре 1B проиллюстрирована последовательная схема  
нумерации для 4D5v7fabH (верхний ряд), начиная с N-конца, по  
сравнению со схемой нумерации по Кэбату (нижний ряд).  
45 Пронумерованные по Кэбату вставки обозначены a, b, c.

На фигурах 2A и 2B проиллюстрированы измерения уровня  
связывания и определение оптической плотности при 450 нм фаговых  
50 вариантов hu4D5Fabv8 и Cys-мутантов (тио-Fab) hu4D5Fabv8: (A)



небиотинилированный фаг hu4D5Fabv8 и (B) биотинилированный фаг hu4D5Fabv8 с помощью анализа PHESELECTOR на взаимодействие с BSA (незаштрихованные столбцы), с HER2 (заштрихованные столбцы) или со стрептавидином (черные столбцы).

На фигурах 3А и 3В проиллюстрированы измерения уровня связывания и определение оптической плотности при 450 нм вариантов hu4D5Fabv8 (слева) и Cys-мутантов (тио-Fab) hu4D5Fabv8: (A) небиотинилированный фаг hu4D5Fabv8 и (B) биотинилированный фаг hu4D5Fabv8 с помощью анализа PHESELECTOR на взаимодействие с BSA (незаштрихованные столбцы), с HER2 (заштрихованные столбцы) и со стрептавидином (черные столбцы). На левой стороне показаны варианты легкой цепи, а на правой стороне показаны варианты тяжелой цепи. Тиоловая реактивность (антитела) =  $OD_{450nm}$  для связывания со стрептавидином /  $OD_{450nm}$  для связывания с HER2.

На фигуре 4А представлены величины частичной доступности остатков на поверхности hu4D5Fabv8 дикого типа. На левой стороне показаны участки легкой цепи, а на правой стороне показаны участки тяжелой цепи.

На фигуре 4В проиллюстрированы измерения уровня связывания и определение оптической плотности при 450 нм биотинилированного hu4D5Fabv8 (слева) и вариантов Cys-мутантов (тио-Fab) hu4D5Fabv8 для оценки взаимодействия с HER2 (день 2), со стрептавидином (SA) (день 2), с HER2 (день 4) и SA (день 4). Фаговые Cys-варианты hu4D5Fabv8 выделяли и хранили при 4°C. Конъюгирование с биотином проводили либо на 2-й, либо на 4-й день, после чего проводили анализы PHESELECTOR для мониторинга взаимодействия

этих вариантов с HER2 и со стрептавидином, как описано в примере 2, и оценивали стабильность реакционноспособных тиоловых групп на сконструированных тιο-Fab-вариантах.

На фигуре 5 проиллюстрированы измерения уровня связывания и определение оптической плотности при 450 нм конъюгированного с биотин-малеимидом hu4D5Fabv8 (A121C) и небiotинилированного hu4D5Fabv8 дикого типа для оценки уровня связывания со стрептавидином и с HER2. Каждый Fab тестировали при 2 нг и 20 нг.

На фигуре 6 проиллюстрирован ELISA-анализ и определение оптической плотности при 450 нм биотинилированного ABP-hu4D5Fabv8 дикого типа (wt) и цистеиновых мутантов ABP-hu4D5Fabv8 V110C и A121C для оценки уровня связывания с кроличьим альбумином, стрептавидином (SA) и HER2.

На фигуре 7 проиллюстрирован ELISA-анализ и определение оптической плотности при 450 нм биотинилированных цистеиновых мутантов ABP-hu4D5Fabv8 (тιο-Fab-вариантов): (слева направо) одиночные Cys-варианты ABP-V110C, ABP-A121C и двойные Cys-варианты ABP-V110C-A88C и ABP-V110C-A121C для оценки уровня связывания с кроличьим альбумином, с HER2 и со стрептавидином (SA), и для проведения теста с использованием Fab-ПХ или SA-ПХ.

На фигуре 8 проиллюстрировано связывание биотинилированного фага тιο-Fab и ПХ-конъюгированного антитела против фагового HER2 с HER2 (вверху) и со стрептавидином (внизу).

На фигуре 9 показано репрезентативное представление конъюгата "лекарственное средство-гибридный белок ABP-тιο-Fab", связывающегося с антигеном рецептора HER2. ABP=альбумин-

связывающий белок.

На фигуре 10 проиллюстрирован *in vitro* анализ на  
 5 пролиферацию клеток SK-BR-3, обработанных -●- трастузумабом; -▲-  
 трастузумабом-SMCC-DM1; и -◆- цистеиновым (A121C)-BMPEO-DM1-  
 мутантом hu4D5Fabv8.

10 На фигуре 11 проиллюстрирован *in vitro* анализ на  
 пролиферацию клеток SK-BR-3, обработанных -○- трастузумабом, -●-  
 трастузумабом-SMCC-DM1; и -□- цистеиновым (V110C)-BMPEO-DM1-  
 15 мутантом hu4D5Fabv8.

На фигуре 12 проиллюстрировано изменение среднего объема  
 20 опухоли в зависимости от времени у бестимусных "голых" мышей с  
 аллотрансплантатами опухолей молочной железы MMTV-HER2 Fo5,  
 которым на день 0 вводили: † носитель (буфер), -■- цистеиновый  
 25 (V110C-легкая цепь)-DM1-мутант ABP-hu4D5Fabv8 и -●- цистеиновый  
 (A121C-тяжелая цепь)-DM1-мутант ABP-hu4D5Fabv8.

30 На фигуре 13A графически представлено связывание  
 биотинилированного антитела с иммобилизованным HER2 и связывание  
 с ПХ-меченным "вторым" антителом для детекции оптической  
 35 плотности.

На фигуре 13B показаны измерения уровня связывания и  
 40 определение оптической плотности при 450 нм конъюгированных с  
 биотин-малеимидом вариантов тио-трастузумаба и уровня связывания  
 небитинилированного трастузумаба дикого типа с иммобилизованным  
 45 HER2. Слева направо: V110C (с одним cys), A121C (с одним cys),  
 V110C/A121C (с двумя cys) и трастузумаб. Каждый тио-IgG вариант  
 и трастузумаб тестировали при 1, 10 и 100 нг.

50 На фигуре 14A схематически проиллюстрировано связывание

биотинилированного антитела с иммобилизованным HER2 и связывание биотина с ПХ-меченным анти-IgG антителом для детекции оптической плотности.

На фигуре 14В показаны измерения уровня связывания и определение оптической плотности при 450 нм конъюгированных с биотин-малеимидом вариантов тио-трастузумаба и уровня связывания неботинилированного трастузумаба дикого типа с иммобилизованным стрептавидином. Слева направо: V110C (с одним cys), A121C (с одним cys), V110C/A121C (с двумя cys) и трастузумаб. Каждый тио-Fab-вариант и трастузумаб тестировали при 1, 10 и 100 нг.

На фигуре 15 проиллюстрирован общий способ получения сконструированного на основе цистеина антитела (тио-Mab), экспрессируемого из клеточной культуры и используемого для конъюгирования.

На фигуре 16 проиллюстрирован анализ Fc-варианта тио-Mab 2H9 (слева направо, дорожки 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; V273C и 2H9 дикого типа, проводимый с помощью электрофореза в невозстанавливающем (вверху) и в восстанавливающем (внизу) денатурирующем полиакриламидном геле после очистки на иммобилизованном белке А. На дорожке справа показаны маркеры размеров в убывающем порядке, указывающие на то, что интактные белки имеют размер примерно 150 кДа, фрагменты тяжелой цепи имеют размер примерно 50 кДа, а фрагменты легкой цепи имеют размер примерно 25 кДа.

На фигуре 17А проиллюстрирован анализ вариантов тио-Mab 2H9 (слева направо, дорожки 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C, проводимый с помощью электрофореза в невозстанавливающем (слева)

и в восстанавливающем (+DTT) (справа) денатурирующем полиакриламидном геле после очистки на иммобилизованном белке А.

На фигуре 17В проиллюстрирован анализ вариантов тио-Mab 2H9 и 3A5, проводимый с помощью электрофореза в невосстанавливающем (слева) и в восстанавливающем (+DTT) (справа) денатурирующем полиакриламидном геле после очистки на иммобилизованном белке А.

На фигуре 18 проиллюстрирован Вестерн-блот-анализ биотинилированных тио-IgG-вариантов. Варианты тио-Mab 2H9 и 3A5 анализировали с помощью электрофореза в восстановленном денатурирующем полиакриламидном геле, и белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Присутствие антитела и конъюгированного биотина подтверждали с использованием ПХ-связанного анти-IgG антитела (вверху) и стрептавидина-ПХ (внизу), соответственно. Дорожка 1: 3A5 H-A121C. Дорожка 2: 3A5 L-V110C. Дорожка 3: 2H9 H-A121C. Дорожка 4: 2H9 L-V110C. Дорожка 5: 2H9 дикого типа.

На фигуре 19 проиллюстрированы ELISA-анализ на связывание биотинилированных вариантов 2H9 со стрептавидином, проводимый путем зондирования ПХ-конъюгированным анти-IgG-антителом, и измерения оптической плотности при 450 нм (верхняя гистограмма). Нижняя схематическая диаграмма иллюстрирует экспериментальное конструирование, которое было применено в ELISA-анализах.

На фигуре 20 проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток SK-BR-3, обработанных -●- трастузумабом; -▲- конъюгатом трастузумаб-SMCC-DM1 с лекарственным средством 3,4 DM1/Ab; и -◆- тио-трастузумабом (A121C)-BMPEO-DM1 с лекарственным средством 1,6 DM1/Ab.

На фигуре 21 проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток HT 1080EphB2, обработанных -о- родительским  
 5 анти-EphB2R антителом 2H9 и -□- тио-2H9 (A121C)-BMPEO-DM1.

На фигуре 21B проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток BT 474, обработанных -о- родительским анти-  
 10 EphB2R антителом 2H9 и -□- тио-2H9 (A121C)-BMPEO-DM1.

На фигуре 22 проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток PC3/neo, обработанных -◆- антителом 3A5  
 15 против MUC16-SMCC-DM1 и -■- тио-3A5 (A121C)-BMPEO-DM1.

На фигуре 23 проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток PC3/MUC16, обработанных -◆- антителом 3A5  
 20 против MUC16-SMCC-DM1 и -■- тио-3A5 (A121C)-BMPEO-DM1.

На фигуре 24 проиллюстрирован *in vitro* анализ на пролиферацию клеток OVCAR-3, обработанных -◆- антителом 3A5  
 25 против MUC16-SMCC-DM1 и -■- тио-3A5 (A121C)-BMPEO-DM1.

На фигуре 25 проиллюстрировано изменение среднего объема опухоли в течение 21 дня у бестимусных "голых" мышей с аллотрансплантатами опухолей молочной железы MMTV-HER2 Fo5,  
 30 которым на день 0 вводили: † носитель (буфер), -●- трастузумаб-SMCC-DM1, 10 мг/кг, с загрузкой лекарственного средства 3,4 DM1/Ab;  
 35 -■- тио-трастузумаб-(A121C)-SMCC-DM1, 21 мг/кг, с загрузкой лекарственного средства 1,6 DM1/Ab; и -□- тио-трастузумаб-(A121C)-SMCC-DM1,  
 40 10 мг/кг, с загрузкой лекарственного средства 1,6 DM1/Ab.  
 45

#### **Подробное описание репрезентативных вариантов осуществления изобретения**

В настоящей заявке подробно описаны некоторые варианты

осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы прилагаемыми структурами и формулами. Хотя настоящее изобретение описано на представленных здесь вариантах его осуществления, однако, следует отметить, что оно не ограничивается указанными вариантами. Напротив, настоящее изобретение охватывает все альтернативные варианты, модификации и эквиваленты, которые могут входить в его объем, определенный в прилагаемой формуле изобретения.

Специалистам в данной области известны многие методы и материалы, аналогичные и эквивалентные описанным здесь методам и материалам, которые могут быть применены для осуществления настоящего изобретения. При этом настоящее изобретение не ограничивается описанными здесь методами и материалами.

Используемые здесь технические и научные термины, если они не определены иначе, имеют общепринятые значения, понятные среднему специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение, и определенные в публикациях Singleton et al. (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY and Janeway C., Travers P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York.

#### **Определения**

Если это не оговорено особо, то используемые здесь термины и выражения имеют следующие значения:

Используемый заявителями термин "торговые знаки" независимо означает защищенный торговым знаком готовый продукт, непатентованное лекарственное средство и активный(е)

фармацевтический(ие) ингредиент(ы) продукта, защищенный(ые) торговым знаком.

Используемый здесь термин "антитело" применяется в самом широком смысле, а в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают нужной биологической активностью (Miller et al., (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Такими антителами могут быть мышинные, человеческие, гуманизованные и химерные антитела, либо антитела, происходящие от других видов. Антитело представляет собой белок, который генерируется иммунной системой, и который способен распознавать специфический антиген и связываться с этим антигеном. (Janeway C. Travers, P., Walport M. Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антиген-мишень обычно имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемыми CDR на множестве антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом, имеет структуру, отличающуюся от структуры другого антитела. Таким образом, один антиген может иметь более, чем одно соответствующее ему антитело. Термин "антитело" включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, то есть, молекулы, содержащей антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с антигеном представляющей интерес мишени или ее части, где указанными мишенями являются, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые



продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Описанными здесь иммуноглобулинами  
5 могут быть молекулы иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Эти иммуноглобулины могут  
10 происходить от животных любых видов. Однако, в одном из аспектов изобретения, иммуноглобулином является человеческий, мышинный или кроличий иммуноглобулин.

Термин "фрагменты антител" означает часть полноразмерного антитела, а обычно, его антигенсвязывающую или вариабельную  
20 область. Примерами фрагментов антител являются Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты; диантитела; линейные антитела; миниантитела (Olafsen et al. (2004), Protein Eng. Design & Sel.  
25 17(4):315-323), фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессируемых Fab-фрагментов, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (комплементарность-определяющая область) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных антител,  
30 которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами; одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела,  
35 происходящие от фрагментов антитела.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" означает антитело, полученное от популяции, в основном,  
45 гомогенных антител, то есть, отдельных антител, входящих в данную популяцию и являющихся идентичными за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в  
50 небольших количествах. Моноклональные антитела являются в

высокой степени специфическими и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо своей специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы так, чтобы они не содержали примесей других антител. Термин "моноклональный" указывает на тип антитела, полученного, по существу, от гомогенной популяции антител, но этот термин не означает, что данное антитело должно быть продуцировано каким-либо конкретным методом. Так, например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или методами рекомбинантных ДНК (см., например, патенты США № 4816567; 5807715). "Моноклональные антитела" могут быть также выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными, например, Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 и Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

Используемые здесь моноклональные антитела включают, в частности, "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, происходящих от

другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они  
5 обладают нужной биологической активностью (патент США № 4816567 и Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851-6855). Химерными антителами, представляющими интерес с точки  
10 зрения настоящего изобретения, являются "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности  
вариабельного домена, происходящие от приматов, не являющихся  
15 человеком (например, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п.), и последовательности человеческой константной области.

20 Описанное здесь "интактное антитело" представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и  
25 CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены  
30 человеческой нативной последовательности) или их варианты аминокислотных последовательностей. Интактное антитело может  
иметь одну или несколько "эффекторных функций", которые означают  
35 биологические активности, приписываемые константной Fc-области (Fc-области нативной последовательности или Fc-области варианта  
40 аминокислотной последовательности) антитела. Примерами  
эффекторных функций антител являются связывание с C1q;  
комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание с Fc-  
45 рецептором; антитело-зависимая клеточно-опосредуемая  
цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и ингибирование рецепторов  
клеточной поверхности, таких как B-клеточный рецептор и BCR.

50 Интактные антитела, в зависимости от аминокислотной

последовательности константного домена их тяжелых цепей, могут  
быть отнесены к различным "классам". Существует пять основных  
5 классов интактных иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и  
некоторые из этих классов могут быть также разделены на  
"подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и  
10 IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют  
различным классам антител, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ ,  
15 соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации  
иммуноглобулинов различных классов хорошо известны специалистам.  
Ig-формами являются формы, имеющие модификации в шарнирной  
20 области, или формы, не включающие шарнирную область (Roux et al.  
(1998) J. Immunol. 161:4803-4090; Lund et al. (2000) Eur. J.  
Biochem. 267:7246-7256; заявка на патент США 2005/0048572;  
25 заявка на патент США 2004/0229310).

"Рецептор ErbB" представляет собой тирозинкиназный белок,  
30 принадлежащий к семейству рецепторов ErbB, члены которого  
являются важными медиаторами роста, дифференцировки и выживания  
клеток. Это семейство рецепторов ErbB содержит четыре отдельных  
35 члена, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR,  
ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 или p185neu), HER3 (ErbB3) и HER4  
40 (ErbB4 или tyro2). Панель анти-ErbB2 антител была  
охарактеризована с использованием клеточной линии человеческой  
опухоли молочной железы SCBR3 (Hudziak et al. (1989) Mol. Cell.  
45 Biol. 9(3):1165-1172. Максимальное ингибирование достигалось с  
использованием антитела, называемого 4D5, которое на 56%  
50 ингибировало пролиферацию клеток. В проводимом анализе, другие  
антитела в данной панели антител снижали пролиферацию клеток в

меньшей степени. Кроме того, было обнаружено, что антитело 4D5  
сенсibiliзирует ErbB2-сверхэкспрессирующие клеточные линии  
5 опухоли молочной железы с продуцированием цитотоксических  
эффектов TNF- $\alpha$  (патент США № 5677171). Анти-ErbB2 антитела,  
обсуждаемые Hudziak et al., были дополнительно охарактеризованы  
10 Fendly et al. (1990), Cancer Research 50:1550-1558; Kotts et al.  
(1990) In vitro 26(3):59A; Sarup et al. (1991) Growth Regulation  
1:72-82; Shepard et al. J. (1991) Clin. Immunol. 11(3):117-127;  
15 Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986; Lewis et al.  
(1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263; Pietras et al.  
20 (1994) Oncogene 9:1829-1838; Vitetta et al. (1994) Cancer  
Research 54:5301-5309; Silwowski et al. (1994) J. Biol. Chem.  
269(20):14661-14665; Scott et al. (1991) J. Biol. Chem.  
25 266:14300-5; D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994)  
91:7202-7206; Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465 и  
30 Schafer et al. (1997) Oncogene 15:1385-1394.

Рецептор ErbB обычно содержит внеклеточный домен, который  
может связываться с лигандом ErbB; липофильный трансмембранный  
35 домен; консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен; и  
карбокси-концевой домен передачи сигнала, содержащий несколько  
40 тирозиновых остатков, которые могут быть фосфорилированы.  
Рецептором ErbB может быть рецептор ErbB с "нативной  
последовательностью" или его "вариант аминокислотной  
45 последовательности". Предпочтительным рецептором ErbB является  
человеческий рецептор ErbB с нативной последовательностью. В  
50 соответствии с этим, "членом семейства рецепторов ErbB" является  
рецептор EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4 или любой другой

рецептор ErbB, который уже известен специалистам, или который может быть идентифицирован в будущем.

5           Используемые здесь термины "ErbB1", "рецептор эпидермального фактора роста", "EGFR" и "HER1" являются взаимозаменяемыми и означают EGFR, описанный, например, в  
10 публикации Carpenter et al. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:881-914, включая его природные мутантные формы (например, делеционный мутант EGFR, описанный в публикации Humphrey et al.  
15 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:4207-4211). Термин "erbB1" означает ген, кодирующий продукт белка EGFR. Антитела против HER1 описаны, например, у Murthy et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560 и в WO 95/25167.

25           Используемые здесь термины "ERRP", "белок, родственный рецептору EGF", "EGFR-родственный белок" и "белок, родственный рецептору эпидермального фактора роста" являются  
30 взаимозаменяемыми и означают ERRP, описанный, например, в патенте США № 6399743 и в публикации заявки на патент США № 2003/0096373.

35           Используемые здесь термины "ErbB2" и "HER2" являются взаимозаменяемыми и означают человеческий белок HER2, описанный, например, в публикации Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 82:6497-6501 и Yamamoto et al. (1986) Nature, 319:230-  
40 234 (регистрационный номер Genbank X03363). Термин "erbB2" означает ген, кодирующий человеческий ErbB2, а термин "neu" означает ген, кодирующий крысиный p185neu. Предпочтительным  
45 ErbB2 является человеческий ErbB2 с нативной последовательностью.

Термины "ErbB3" и "HER3" означают полипептид рецептора, описанный, например, в патентах США №№ 5183884 и 5480968, а также в публикации Kraus et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197. Антитела против ErbB3 известны специалистам и описаны, например, в патентах США №№ 5183884 и 5480968, а также в WO 97/35885.

Используемые здесь термины "ErbB4" и "HER4" означают полипептид рецептора, описанный, например, в заявке на Европейский патент № 599274; Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:1746-1750 и Plowman et al. (1993) Nature 366:473-475, включая его изоформы, описанные, например, в WO 99/19488. Антитела против HER4 описаны, например, в WO 02/18444.

Антитела против рецепторов ErbB являются коммерчески доступными и могут быть получены из различных источников, включая, например, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.

Термин "вариант аминокислотной последовательности" означает полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности, которые до некоторой степени отличаются от нативных полипептидных последовательностей. Обычно, варианты аминокислотных последовательностей, по меньшей мере, примерно на 70% идентичны, по меньшей мере, одному связывающемуся с рецептором домену нативного лиганда ErbB, или, по меньшей мере, одному связывающемуся с лигандом домену нативного рецептора ErbB, а предпочтительно, они могут быть, по меньшей мере, примерно на 80%, а более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 90% гомологичны последовательности доменов, связывающихся с таким

рецептором или с лигандом. Варианты аминокислотных последовательностей имеют замены, делеции и/или инсерции в некоторых положениях нативной аминокислотной последовательности. Аминокислоты имеют стандартные однобуквенные и трехбуквенные обозначения.

"Идентичность последовательностей" определяется как процент остатков в варианте аминокислотной последовательности, которые являются идентичными после выравнивания последовательностей и включения в них пробелов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Методы и компьютерные программы для такого выравнивания хорошо известны специалистам. Одной из таких компьютерных программ является "Align 2", разработанная Genentech, Inc., и поданная вместе с документацией для пользователя в Ведомство по охране авторского права США, Вашингтон, DC 20559, 10 декабря 1991.

"Антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность" и "ADCC" означает клеточно-опосредуемую реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcRs) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени, что приводит к лизису данной клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие ADCC, то есть, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные экспрессии FcR на гемопозитических клетках систематизированы в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch & Kinet (1991) "Annu. Rev. Immunol." 9:457-92. Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы может



быть проведен анализ на ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патентах США №№ 5500362 и 5821337. Подходящими эффекторными клетками для таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животном-модели, такой как модель, описанная Clynes et al. (1998), Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 95:652-656.

“Человеческие эффекторные клетки” представляют собой лейкоциты, экспрессирующие один или несколько рецепторов константной области (FcR) и обладающие эффекторными функциями. Предпочтительно, указанные клетки экспрессируют, по меньшей мере, FcγRIII и обладают эффекторной ADCC-функцией. Примерами человеческих лейкоцитов, опосредующих ADCC, являются моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом, предпочтительными являются МКПК и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например, из крови или из описанного здесь источника МКПК.

Термины “Fc-рецептор” или “FcR” используются для описания рецептора, который связывается с константной Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является человеческий FcR с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор), и рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы

этих рецепторов. Рецепторами FcγRII являются FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"),  
5 которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем  
10 цитоплазматическом домене активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем  
15 цитоплазматическом домене ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM). (См. обзор M. Daeron, "Annu. Rev. Immunol.", 15:203-234 (1997)). FcR описаны у Ravetch  
20 & Kinet, "Annu. Rev. Immunol". 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994) и de Haas et al., (1995) J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. Используемый здесь термин "FcR" также  
25 охватывает и другие FcR, включая FcR, которые будут идентифицированы в будущем. Этот термин также включает рецептор, имеющийся у новорожденных, FcRn, который является ответственным  
30 за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) и Kim et al. (1994), J. Immunol., 24:249).

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "CDC" означает способность молекулы подвергать лизису мишень в присутствии  
40 комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, с антителом), образующей комплекс с когнатным  
45 антигеном. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ на CDC, например, как описано Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

“Нативные антитела” обычно представляют собой  
гетеротетрамерные гликопротеины размером примерно 150000  
5 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей (L) и двух  
идентичных тяжелых цепей (H). Каждая легкая цепь связана с  
тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом,  
10 число дисульфидных связей в тяжелых цепях иммуноглобулинов  
различных изотипов варьируется. Каждая тяжелая и легкая цепь  
15 также имеет соответствующим образом расположенные внутрицепьевые  
дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь, у одного своего  
конца, имеет переменный домен ( $V_H$ ), за которым следует ряд  
20 константных доменов. Каждая легкая цепь, у одного своего конца,  
имеет переменный домен ( $V_L$ ), а у другого конца – константный  
домен. Константный домен легкой цепи соответствует первому  
25 константному домену тяжелой цепи, а переменный домен легкой  
цепи соответствует переменному домену тяжелой цепи. Очевидно,  
30 что конкретные аминокислотные остатки образуют пограничную  
область между переменными доменами легкой и тяжелой цепи.

Термин “переменный” относится к некоторым частям  
35 переменных доменов, которые имеют значительные отличия в  
последовательностях различных антител и участвуют в связывании  
каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном, а также  
40 определяют специфичность каждого конкретного антитела по  
отношению к его конкретному антигену. Однако, переменность  
45 неравномерно распределяется по всем переменным доменам  
антител. Она концентрируется в трех сегментах, называемых  
гиперпеременными областями и присутствующих в переменных  
50 доменах как легкой, так и тяжелой цепи. Наиболее

высококонсервативные части переменных доменов называются  
каркасными областями (FR). Каждый переменный домен нативной  
тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, имеющих, главным  
образом,  $\beta$ -складчатую конфигурацию и соединенных тремя  
гиперпеременными областями, которые образуют петли,  
соединяющие, а в некоторых случаях, образующие часть  $\beta$ -складчатой  
структуры. Гиперпеременные области в каждой цепи удерживаются  
в непосредственной близости друг от друга посредством FR, и,  
вместе с гиперпеременными областями другой цепи, участвуют в  
образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al.  
(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.  
Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,  
MD). Константные домены не принимают непосредственного участия в  
связывании антитела с антигеном, но обладают различными  
эффекторными функциями, такими как участие антитела в антитело-  
зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Используемый здесь термин "гиперпеременная область"  
означает аминокислотные остатки антитела, которые являются  
ответственными за связывание с антигеном. Такая  
гиперпеременная область обычно содержит аминокислотные  
остатки, происходящие от "гиперпеременной области" или "CDR"  
(комплементарность-определяющей области) (например, остатки 24-  
34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой  
цепи, и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном  
домене тяжелой цепи; Kabat et al., см. выше) и/или остатки,  
происходящие от "гиперпеременной петли" (например, остатки 26-  
32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой

цепи, и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки переменного домена, не являющиеся остатками определенной здесь гиперпеременной области.

В результате гидролиза антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и один оставшийся "Fc"-фрагмент, название которого указывает на его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к образованию  $F(ab')_2$ -фрагмента, который имеет два антигенсвязывающих сайта и способен к перекрестному связыванию с антигеном.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полноразмерный антиген-распознающий сайт и антигенсвязывающий сайт. Эта область состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, жестко связанных друг с другом нековалентной связью. Эта область имеет такую конфигурацию, при которой три гиперпеременных области каждого переменного домена взаимодействуют друг с другом таким образом, что они образуют антигенсвязывающий сайт на поверхности димера  $V_H-V_L$ . В целом, шесть гиперпеременных областей сообщают антителу специфичность связывания с антигеном. Однако, даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три гиперпеременных области, специфичные к антигену) обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним, хотя и с меньшей

аффинностью, чем весь сайт связывания.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и  
5 первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты  
отличаются от Fab-фрагментов тем, что они имеют несколько  
дополнительных остатков у карбокси-конца CH1-домена тяжелой  
10 цепи, включая один или несколько цистеинов, происходящих от  
шарнирной области антитела. Используемое здесь обозначение Fab'-  
15 SH означает Fab', в котором цистеиновый(е) остаток(ки)  
константных доменов имеет(ют), по меньшей мере, одну свободную  
тиоловую группу. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антитела по своей природе  
20 продуцируются как пары Fab'-фрагментов, между которыми  
расположены цистеины шарнирной области. Также известны и другие  
химические связи, соединяющие фрагменты антитела.

25 "Легкие цепи" антител, происходящих от позвоночных любого  
вида, могут быть отнесены к одному из двух различных типов  
цепей, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), исходя из  
30 аминокислотных последовательностей их константных доменов.

"Одноцепочечный Fv-фрагмент" или "scFv-фрагмент" антител  
35 включает домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела, где указанные домены  
присутствуют в одной полипептидной цепи. Предпочтительно,  
40 полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между  
доменами V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, который обеспечивает образование scFv со  
структурой, необходимой для связывания с антигеном. Описание  
45 scFv можно найти у Plückthun в работе The Pharmacology of  
Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg & Moore eds.,  
50 Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994). scFv-фрагменты  
анти-ErbB2 антитела описаны в WO 93/16185; в патентах США

№№ 5571894 и 5587458.

Термин "диантитела" означает небольшие фрагменты антител с  
5 двумя антигенсвязывающими сайтами, где указанные фрагменты  
включают переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с  
переменным доменом легкой цепи (VL) в одной той же  
10 полипептидной цепи (VH-VL). Если линкер является слишком  
коротким для образования пары между двумя доменами на одной и  
15 той же цепи, то домены вынуждены спариваться с комплементарными  
доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих  
сайта. Диантитела более подробно описаны, например, в EP 404097;  
20 в WO93/11161 и у Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci.,  
USA, 90:6444-6448.

25 "Гуманизированные формы" нечеловеческих антител (например,  
антител грызунов) представляют собой химерные антитела, которые  
содержат минимальную последовательность, происходящую от  
30 нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизация представляет собой  
способ передачи информации о связывании мышиного антигена  
неиммуногенному человеческому антителу-акцептору, и позволяет  
35 использовать многие терапевтически ценные лекарственные  
средства. Такой способ гуманизации обычно заключается в переносе  
40 всех шести мышиных гиперпеременных областей (CDR) в каркасную  
область человеческого антитела (Jones et al. (1986) Nature,  
321:522-525). Эти антитела с присоединенными CDR обычно не  
45 сохраняют свою природную аффинность связывания с антигеном, а  
фактически, в большинстве случаев, аффинность значительно  
50 снижается. Помимо CDR, выбранные нечеловеческие каркасные  
остатки антитела должны быть введены так, чтобы они сохраняли

правильную конформацию CDR (Chothia et al., (1989) Nature 342:877). Было показано, что перенос ключевых мышинных каркасных остатков в человеческое акцепторное антитело в целях сохранения структурной конформации присоединенных CDR, приводит к восстановлению уровня связывания с антигеном и аффинности (Riechmann et al. (1992) J. Mol. Biol. 224, 487-499; Foote & Winter (1992) J. Mol. Biol. 224, 487-499; Presta et al., (1993) J. Immunol. 151, 2623-2632; Werther et al., (1996), J. Immunol. Methods 157:4986-4995; и Presta et al., (2001) Thromb. Haemost. 85:379-389). По большей части, гуманизованные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело реципиента), в которых остатки, происходящие от гипервариабельной области данного антитела-реципиента, заменены остатками, происходящими от гипервариабельной области нечеловеческого антитела (донорного антитела), такого как мышинное антитело, крысиное антитело, кроличье антитело или антитело приматов, не являющихся человеком, где указанные антитела обладают нужной специфичностью, аффинностью и связывающей способностью. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в антителе реципиента или в антителе донора. Эти модификации вводят для улучшения свойств антитела. В общих чертах, гуманизованное антитело может содержать, в основном, все или, по меньшей мере, один, а обычно два вариабельных домена, в которых все, или почти все, гипервариабельные петли соответствуют



гипервариабельным петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все  
или почти все FR представляют собой FR с человеческой  
5 иммуноглобулиновой последовательностью. Гуманизованное антитело  
также содержит, но необязательно, по меньшей мере, часть  
константной области иммуноглобулина (Fc), обычно, области  
10 человеческого иммуноглобулина. Более подробное описание можно  
найти в патенте США 6407213; Jones et al. (1986) Nature,  
15 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332:323-329; Presta  
et al., (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596.

Термин "свободная аминокислота цистеин" означает  
20 цистеиновый аминокислотный остаток, который был введен в  
родительское антитело, и который имеет тиоловую функциональную  
группу (-SH) и не связан внутримолекулярной или межмолекулярной  
25 дисульфидной мостиковой связью.

Термин "величина тиоловой реактивности" означает  
30 количественную характеристику реакционной способности свободных  
цистеиновых аминокислотных остатков. Величина тиоловой  
реактивности представляет собой процентное содержание свободных  
35 цистеиновых аминокислотных остатков в сконструированном на  
основе цистеина антителе, которое реагирует с реагентом,  
40 взаимодействующем с тиолом, при этом, максимальную величину  
принимают равной 1. Так, например, свободная цистеиновая  
аминокислота в сконструированном на основе цистеина антителе,  
45 которое реагирует со взаимодействующим с тиолом реагентом, таким  
как биотин-малеимидный реагент, со 100% выходом с образованием  
меченного биотином антитела, имеет величину тиоловой  
50 реактивности, составляющую 1,0. Другая цистеиновая аминокислота,

введенная в то же самое или другое родительское антитело, которое реагирует со взаимодействующим с тиолом реагентом, с 80% выходом, имеет величину тиоловой реактивности, составляющую 0,8.

Другая цистеиновая аминокислота, введенная в то же самое или другое родительское антитело, которое совсем не реагирует со взаимодействующим с тиолом реагентом, имеет величину тиоловой реактивности, составляющую 0. Определение величины тиоловой реактивности конкретного цистеина может быть осуществлено с помощью ELISA-анализа, масс-спектро스코пии, жидкостной хроматографии, ауторадиографии или других количественных аналитических тестов.

"Родительское антитело" представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков заменены одним или несколькими цистеиновыми остатками. Родительское антитело может содержать нативную последовательность или последовательность дикого типа. Родительское антитело может иметь уже существующие модификации аминокислотной последовательности (такие как добавления, делеции и/или замены), по сравнению с другими нативными антителами, антителами дикого типа или модифицированными формами антитела. Родительское антитело может быть направлено против представляющего интерес антигена-мишени, например, важного с биологической точки зрения полипептида. Также рассматриваются антитела против неполипептидных антигенов (таких как опухолеассоциированные гликолипидные антигены; см., патент США № 5091178).

Репрезентативными родительскими антителами являются

антитела, обладающие аффинностью и селективностью по отношению к  
клеточной поверхности и к трансмембранным рецепторам и  
5 опухолеассоциированным антигенам (ТАА).

Другими репрезентативными родительскими антителами  
являются, но не ограничиваются ими, антитела, выбранные из  
10 группы, состоящей из антитела против рецептора эстрогена,  
антитела против рецептора прогестерона, анти-p53 антитела, анти-  
15 HER2/neu антитела, анти-EGFR антитела, антитела против катепсина  
D, антитела против Bcl-2, антитела против E-кадгерина, анти-  
CA125 антитела, анти-CA15-3 антитела, анти-CA19-9 антитела,  
20 анти-c-erbB-2 антитела, антитела против гликопротеина Р, анти-  
СЕА антитела, антитела против белка ретинобластомы, антитела  
против онкобелка ras, антитела против антигена Lewis-X, анти-Ki-  
25 67 антитела, анти-PCNA антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD4  
антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD7 антитела, анти-CD8  
30 антитела, анти-CD9/p24 антитела, анти-CD10 антитела, анти-CD11c  
антитела, анти-CD13 антитела, анти-CD14 антитела, анти-CD15  
антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD22  
35 антитела, анти-CD23 антитела, анти-CD30 антитела, анти-CD31  
антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD34 антитела, анти-CD35  
40 антитела, анти-CD38 антитела, анти-CD41 антитела, анти-LCA/CD45  
антитела, анти-CD45RO антитела, анти-CD45RA антитела, анти-CD39  
антитела, анти-CD100 антитела, анти-CD95/Fas антитела, анти-CD99  
45 антитела, анти-CD106 антитела, антитела против убихитина, анти-  
CD71 антитела, анти-c-мус антитела, антитела против  
50 цитокератинов, антитела против виментинов, антитела против  
белков HPV, антитела против легких цепей каппа, антитела против

легких цепей лямбда, антитела против меланосом, антитела против простатоспецифического антигена, анти-S-100 антитела, антитела  
5 против антигена tau, антитела против фибрина, антитела против кератинов и антитела против Tn-антигена.

“Выделенное” антитело представляет собой антитело, которое  
10 было идентифицировано и выделено и/или очищено от компонентов его природного окружения. Контаминирующими компонентами его природного окружения являются материалы, негативно влияющие на  
15 диагностическую или терапевтическую эффективность антитела, и такими компонентами могут быть ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В  
20 предпочтительных вариантах изобретения, указанное антитело может быть очищено (1) на более чем 95% по массе антитела, как может  
25 быть определено методом Лаури, а более предпочтительно, более, чем на 99% по массе антитела, (2) до степени, достаточной для введения, по меньшей мере, 15 остатков у N-концевой или  
30 внутренней части аминокислотной последовательности, с использованием секвенатора, снабженного центрифужным сосудом,  
35 или (3) до гомогенности, что может быть подтверждено с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих или в  
40 невосстанавливающих условиях с окрашиванием кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Термин “выделенное антитело” включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, если отсутствует, по  
45 меньшей мере, один природный компонент этого антитела. Однако, обычно, выделенное антитело может быть получено, по меньшей мере, в одной стадии очистки.

Антитело, которое “связывается” с представляющими интерес

молекулярной мишенью или антигеном, например, антигеном ErbB2, способно связываться с указанным антигеном с аффинностью, которая является достаточной для того, чтобы это антитело могло быть использовано для доставки в клетку, экспрессирующую этот антиген. Если указанное антитело связывается с ErbB2, то обычно, оно преимущественно связывается с ErbB2, но не с другими рецепторами ErbB, и таким антителом может быть антитело, не обладающее значительной перекрестной реактивностью с другими белками, такими как EGFR, ErbB3 или ErbB4. В таких вариантах изобретения, уровень связывания указанного антитела с белками, не являющимися ErbB2 (например, связывания клеточной поверхности с эндогенным рецептором), будет составлять менее 10% как может быть определено с помощью анализа посредством клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) или радиоиммунопреципитации (РИП). Иногда анти-ErbB2 антитело не обладает значительной перекрестной реактивностью с крысиным белком neu, как описано в публикации Schecter et al. (1984) Nature 312:513 и Drebin et al. (1984) 312:545-548.

Молекулярными мишенями для антител, входящими в объем настоящего изобретения, являются белки CD и их лиганды, такие как, но не ограничивающиеся ими, (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40, CD79 $\alpha$  (CD79a) и CD79 $\beta$  (CD79b); (ii) члены семейства рецепторов ErbB, такие как рецептор EGF, HER2, HER3 или HER4; (iii) молекулы клеточной адгезии, такие как интегрины LFA-1, Mac1, p15095, VLA-4, ICAM-1, VCAM и  $\alpha v/\beta 3$ , включая любые их альфа- или бета-субъединицы (например, анти-CD11a, анти-CD18 или анти-CD11b антитела); (iv) факторы роста, такие как VEGF;

IgE; антигены группы крови; рецептор flk2/flt3; рецептор, ответственный за ожирение (OB); рецептор *mpl*; CTLA-4; белок C, BR3; c-met, тканевый фактор,  $\beta 7$  и т.п.; и (v) антигены клеточной поверхности и трансмембранные опухолеассоциированные антигены (TAA).

Если это не указано особо, термин "моноклональное антитело 4D5" означает антитело, которое имеет антигенсвязывающие остатки мышинового антитела 4D5 (ATCC CRL 10463) или происходит от этого антитела. Так, например, моноклональное антитело 4D5 может представлять собой мышинное моноклональное антитело 4D5 или его вариант, такой как гуманизованное антитело 4D5. Примерами гуманизованных антител 4D5 являются huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 (трастузумаб, HERCEPTIN®), описанные в патенте США № 5821337.

Термины "лечить" или "лечение" означают терапевтическое лечение и профилактические или превентивные меры, которые направлены на предупреждение или замедление (ослабление) у индивидуума нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие или прогрессирование рака. В соответствии с настоящим изобретением, благоприятными или желательными клиническими эффектами являются, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов, снижение тяжести заболевания, стабильное (то есть, не ухудшающееся) состояние, задержка или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение или временное облегчение симптомов патологического состояния и ремиссия (частичная или полная), независимо от того, являются ли

эти симптомы детектируемыми или недетектируемыми. Термин "лечение" может также означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Термин "индивидуумы, нуждающиеся в лечении" относится к индивидуумам, уже страдающим данным состоянием или расстройством, а также к индивидуумам, имеющим предрасположенность к данному состоянию или расстройству, или к индивидуумам, которые нуждаются в предупреждении данного состояния или расстройства.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество лекарственного средства, эффективное для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего. В случае рака, такое терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снижать число раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (то есть, замедлять до некоторой степени, а предпочтительно, прекращать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (то есть, замедлять до некоторой степени, а предпочтительно, прекращать) развитие метастазов опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или ослаблять, до некоторой степени, один или несколько симптомов, ассоциированных с раком. Лекарственное средство, до некоторой степени, может предотвращать рост раковых клеток и/или уничтожать раковые клетки, и такое лекарственное средство может иметь цитостатическое и/или цитотоксическое действие. Эффективность противораковой терапии может быть оценена, например, путем определения времени, прошедшего до начала прогрессирования заболевания (TTP), и/или определения

скорости ответа (RR).

Термин "биологическая доступность" означает системную биологическую доступность (то есть, уровни лекарственного средства в крови/плазме) для данного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. "Биологическая доступность" является абсолютным термином, который определяет такие параметры, как время действия (скорость) и общее количество (уровень) лекарственного средства, которое высвобождается из введенной лекарственной формы и поступает в общий кровоток.

Термины "рак" и "раковый" означают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нарушением регуляции клеточного роста. Термин "опухоль" включает одну или несколько раковых клеток. Примерами рака являются, но не ограничиваются ими, карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретными примерами таких раковых опухолей являются плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких ("НМКРЛ"), аденокарцинома легких и плоскоклеточная карцинома легких, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта; рак поджелудочной железы; глиобластома; рак шейки матки; рак яичника; рак печени; рак мочевого пузыря; гепатома; рак молочной железы; рак толстой кишки; рак прямой кишки; рак ободочной кишки; карцинома эндометрия или матки; карцинома слюнной железы; рак почек; рак предстательной железы; рак вульвы; рак щитовидной железы; гепатокарцинома; карцинома



заднего прохода; карцинома пениса; а также рак головы и шеи.

“ErbB-экспрессирующая раковая опухоль” представляет собой  
5 опухоль, на поверхности клеток которой присутствует белок ErbB.

“ErbB2-экспрессирующая раковая опухоль” представляет собой  
опухоль, на поверхности клеток которой продуцируются уровни  
10 ErbB2, достаточные для того, чтобы анти-ErbB2 антитело могло  
связываться с ErbB2 и оказывало терапевтическое противораковое  
действие.

Раковая опухоль, “сверхэкспрессирующая” антигенный  
рецептор, представляет собой раковую опухоль, на клеточной  
20 поверхности которой присутствуют значительно более высокие  
уровни рецептора, такого как ErbB2, по сравнению с нераковыми  
клетками ткани того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть  
25 обусловлена амплификацией или повышенной транскрипцией или  
трансляцией гена. Сверхэкспрессия рецептора может быть  
определена в диагностическом или прогностическом анализе путем  
30 детекции повышенных уровней белка рецептора, присутствующего на  
поверхности клеток (например, с помощью иммуногистохимического  
35 анализа; ИГХ). Альтернативно или дополнительно, могут быть  
измерены уровни рецептор-кодирующей нуклеиновой кислоты в  
клетках, например, путем флуоресцентной гибридизации *in situ*  
40 (FISH; см. WO 98/45479), саузерн-блоттинга или полимеразной  
цепной реакции (ПЦР), такой как количественная ПЦР в реальном  
45 времени (RT-PCR).

Опухоли, сверхэкспрессирующие ErbB2 (HER2), оценивают по  
иммуногистохимической шкале, соответствующей числу копий  
50 экспрессируемых молекул HER2 на клетку, и такая оценка может

быть проведена с помощью биохимического анализа, где баллы этой шкалы означают: 0=0-10000 копий/клетку; 1+=по меньшей мере, примерно 200000 копий/клетку; 2+=по меньшей мере, примерно 500000 копий/клетку; 3+=примерно  $1-2 \times 10^6$  копий/клетку. Сверхэкспрессия HER2 на уровне 3+, которая приводит к лиганд-независимой активации тирозинкиназы (Hudziak et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:7159-7163), обнаруживается приблизительно у 30% пациентов с раком молочной железы, и у этих пациентов наблюдается снижение продолжительности безрецидивного периода и продолжительности жизни в целом (Slamon et al. (1989) Science, 244:707-712; Slamon et al. (1987) Science, 235:177-182).

Используемый здесь термин "цитотоксическое средство" означает вещество, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Этот термин включает радиоактивные изотопы (например,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{60}\text{Co}$  и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как небольшие молекулы токсинов или ферментативно активные токсины, происходящие от бактерий, грибов, растений или животных, включая их синтетические аналоги и производные.

Используемый здесь термин "аутоиммунное заболевание" означает заболевания или расстройства, возникающие в собственных тканях или органах индивидуума и направленные против этих тканей или органов, либо сопровождающие их заболевания или их симптомы, либо состояния, развивающиеся на основе этих заболеваний или расстройств. Для многих из этих аутоиммунных и воспалительных

расстройств могут существовать различные клинические и лабораторные показатели, включая, но не ограничиваясь ими, гипергамма-глобулинемия, высокие уровни аутоантител, отложения в тканях комплексов "антиген-антитело", благоприятный эффект лечения кортикостероидами или иммунодепрессантами и присутствие агрегатов лимфоидных клеток в пораженных тканях. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, относящейся к В-клеточно-опосредуемому аутоиммунному заболеванию, можно лишь отметить, что В-клетки, очевидно, оказывают патогенное действие при аутоиммунных заболеваниях человека посредством множества механизмов, включая продуцирование аутоантител, образование иммунных комплексов, активацию дендритных клеток и Т-клеток, синтез цитокинов, непосредственное высвобождение хемокинов и образование очага для эктопического неоплифогенеза. Каждый из этих путей может в различной степени участвовать в развитии патологии аутоиммунных заболеваний. Аутоиммунным заболеванием может быть орган-специфическое заболевание (т.е., иммунный ответ, специфически направленный против системы органов, такой как эндокринная система, гемопоэтическая система, кожа, сердечно-легочная система, системы желудочно-кишечного тракта и печени, почечная система, щитовидная железа, органы слуха, нейромышечная система, центральная нервная система и т.п.) или системное заболевание, которое может поражать множество органов (например, системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит, полимиозит и т.п.).

Термин "цитостатический" относится к эффекту ограничения функции клеток, такому как ограничение роста или пролиферации

клеток.

“Химиотерапевтическое средство” представляет собой химическое соединение, которое может быть использовано для лечения рака. Примерами химиотерапевтических средств являются эрлотиниб (TARCEVA®; Genentech/OSI Pharm.), бортезомиб (VELCADE®, Millenium Pharm.), фульвестрант (FASLODEX®, Astrazeneca), сутент (SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), мезилат иматиниба (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), оксалиплатин (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-фторурацил), лейковорин, рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (GSK572016, GlaxoSmithKline), лонафарниб (SCH 66336), сорафениб (BAY43-9006, Bayer Labs.) и гефитиниб (IRESSA™, Astra Zeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид CYTOXAN®; алкисульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметиломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его адозелизиновые, карзелизиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая его синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, экстрамустин,

ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, а в частности, калихеамицин гамма I1 и калихеамицин омега I1 (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., (1994) 33: 183-186); динемидин, включая динемидин А; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин, а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые энединовые антибиотики-хромофоры), аклациномизины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин и триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и

флорсуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат  
дромостанолонa, эпитиостанол, мепитиостан и тестолaктон;  
5 антиадренергические средства, такие как аминоглутетимид, митотан  
и трилостан; средство, восполняющее недостаток фолиевой кислоты,  
такое как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид  
10 альдофосфамида; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин;  
бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин;  
диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид;  
15 нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин;  
майтaнзиноиды, такие как мйтaнзин и анзамитоцины; митогуазон;  
митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет;  
20 пирарубицин; лозоксантрон; подофилиновая кислота;  
2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS  
25 Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран;  
спирогерманий; тенаузоновая кислота; триазихон; 2,2',2"-  
30 трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2,  
верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин;  
дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолaктол; пипоброман;  
35 гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа;  
таксоиды, например, паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb  
Oncology, Princenton, N.J.), ABRAXANE™, не содержащий кремофора  
40 препарат паклитаксела из наночастиц, полученный на основе  
альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg,  
45 Illinois) и доксетаксел TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony,  
France); хлоранбуцил; гемцитабин GEMZAR®; 6-тиогуанин;  
меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин  
50 и карбоплатин; винбластин, платина; этопозид (VP-16); ифосфамид;

митоксантрон; винкристин; винорелбин NAVELBINE®; новантрон;  
 тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода;  
 5 ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000;  
 дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноевая  
 кислота; канацитабин; и фармацевтически приемлемые соли, оксиды  
 10 или производные всех вышеуказанных соединений.

В определение термина "химиотерапевтическое средство" также  
 15 входят: (i) антигормональные средства, регулирующие или  
 ингибирующие действие гормонов на опухоли, такие как  
 антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена  
 20 (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен  
 NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен,  
 триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен  
 25 FARESTON®; (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент  
 ароматазу и регулируют продуцирование эстрогенов в коре  
 30 надпочечника, такие как, например, 4(5)-имидазолы,  
 аминоклутетимид, ацетат мегестрола MEGASE®, эксеместан  
 AROMASIN®, форместанин, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол  
 35 FEMARA® и анастрозол ARIMIDEX®; (iii) антиандрогены, такие как  
 флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также  
 40 троксацитабин (нуклеозидный цитозиновый аналог 1,3-диоксолана);  
 (iv) ингибиторы ароматазы; (v) ингибиторы протеинкиназы; (vi)  
 ингибиторы липид-киназы; (vii) антисмысловые олигонуклеотиды, а  
 45 в частности, олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию генов  
 путей передачи сигнала, участвующих в пролиферации нежелательных  
 50 клеток, такие как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; (viii)  
 рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например,

рибозим ANGIOZYME®) и ингибитор экспрессии HER2; (ix) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; rmRN ABARELIX®; (x) антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech) и (xi) фармацевтически приемлемые соли, оксиды или производные всех вышеперечисленных соединений.

Используемый здесь термин "EGFR-лекарственное средство" означает терапевтическое средство, которое связывается с EGFR и, необязательно, ингибирует активацию EGFR. Примерами таких средств являются антитела и небольшие молекулы, которые связываются с EGFR. Примерами антител, которые связываются с EGFR, являются MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB 8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (см., патент США № 4943533, Mendelsohn et al.) и их варианты, такие как химерное антитело 225 (C225 или цетуксимаб; ERBITUX®) и реконструированное человеческое антитело 225 (H225) (см. WO96/40210, Imclone Systems Inc.); антитела, которые связываются с мутантным EGFR типа II (патент США № 5212290); гуманизованные и химерные антитела, которые связываются с EGFR, как описано в патенте США № 5891996; и человеческие антитела, которые связываются с EGFR, такие как ABX-EGF (см. WO 98/50433, Abgenix). Антитело против EGFR может быть конъюгировано с цитотоксическим средством, образуя, тем самым, иммуноконъюгат (см. например, EP 659439A2, Merck Patent GmbH). Примерами небольших молекул, которые связываются с EGFR, являются ZD1839 или гефитиниб (IRESSA™, Astra Zeneca), эрлотиниб-HCl (CP-358774,



TARCEVA™; Genentech/OSI) и AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Ингибиторами протеинкиназы являются ингибиторы тирозинкиназы, которые, до определенной степени, ингибируют тирозинкиназную активность тирозинкиназы, такой как рецептор ErbB. Примерами таких ингибиторов являются "EGFR-лекарственные средства", описанные в предыдущем абзаце, а также хиназолины, такие как PD 153035, 4-(3-хлоранилино)хиназолин, пиридопиримидины, пиримидопиримидины, пирролопиримидины, такие как CGP 59326, CGP 60261 и CGP 62706, и пиразолопиримидины, 4-(фениламино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидины, куркумин (диферулоилметан, 4,5-бис(4-фторанилино)фталамид), тирфостины, содержащие нитротиофеновые группы; PD-0183805 (Warner-Lambert); антисмысловые молекулы (например, молекулы, которые связываются с ErbB-кодирующей нуклеиновой кислотой); хиноксалины (патент США № 5804396); трифостины (патент США № 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); ингибиторы пэн-ErbB, такие как CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); мезилат иматиниба (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Семаксаниб (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone) или соединения, описанные в нижеследующих публикациях патентных заявок: в WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca) и WO 96/33980 (Zeneca).

Термин "антиангиогенный агент" означает соединение, которое

блокирует развитие кровеносных сосудов, или, в некоторой степени  
препятствует такому развитию. Таким антиангиогенным фактором  
5 может быть, например, небольшая молекула или антитело, которые  
связываются с фактором роста или с рецептором фактора роста,  
участвующими в стимуляции ангиогенеза. Используемым здесь  
10 предпочтительным антиангиогенным фактором является антитело,  
которое связывается с васкулярным эндотелиальным фактором роста  
(VEGF).

Термин "цитокин" является общим термином, относящимся к  
белкам, которые высвобождаются одной клеточной популяцией и  
20 которые действуют на другие клетки как межклеточные медиаторы.  
Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и  
стандартные полипептидные гормоны. Помимо вышеуказанных  
25 определений, понятие "цитокины" также включает гормоны роста,  
такие как человеческий гормон роста, N-метионильный человеческий  
гормон роста и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон;  
30 тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин;  
гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий  
35 гормон (FSH), тиреоид-стимулирующий гормон (TSH) и  
лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста гепатоцитов, фактор  
роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор  
40 некроза опухоли- $\alpha$  и - $\beta$ ; мюллеровский ингибирующий фактор;  
пептид, ассоциированный с мышинным гонадотропином; ингибин;  
45 активин; васкулярный эндотелиальный фактор роста; интегрин;  
тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервных тканей, такие как NGF-  
50  $\beta$ ; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста

(TGF), такие как TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); факторы, индуцирующие остеогенез; 5 интерфероны, такие как интерферон- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ ; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарный-макрофагальный CSF (GM-CSF); и 10 гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; фактор некроза опухоли, такой как TNF- $\alpha$  или TNF- $\beta$ ; 15 и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). Используемый здесь термин "цитокин" включает белки, происходящие 20 от природных источников или от рекомбинантной клеточной культуры, и биологически активные эквиваленты цитокинов с 25 нативной последовательностью.

Используемый в данной заявке термин "пролекарство" означает предшественник или производные фармацевтически активного 30 вещества, которые, по сравнению с родительским лекарственным средством, являются менее цитотоксичными по отношению к опухолевым клеткам и способны ферментативно или гидролитически 35 активироваться или превращаться в более активную зрелую форму. См., например, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" 40 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 45 al., (ed.), pp.247-267, Humana Press (1985). Пролекарствами согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, фосфат- 50 содержащие пролекарства, тиофосфат-содержащие пролекарства,

сульфат-содержащие пролекарства, пептид-содержащие пролекарства, лекарственные средства, модифицированные D-аминокислотой, гликозилированные пролекарства,  $\beta$ -лактам-содержащие пролекарства; пролекарства, необязательно содержащие замещенный феноксиацетамид, или пролекарства, необязательно содержащие замещенный фенилацетамид; 5-фторцитозинового и другие 5-фторуридинового пролекарства, которые могут быть превращены в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Примерами цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть дериватизированы с получением пролекарственной формы для ее использования в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические средства, описанные выше.

“Липосома” представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которые могут быть использованы для доставки лекарственного средства (такого как описанные здесь анти-ErbB2 антитела, и, необязательно, химиотерапевтическое средство) млекопитающему. Компоненты липосомы обычно расположены так, что они образуют бислой, аналогичный липидному бислою в биологических мембранах.

Используемый здесь термин “вкладыш в упаковку” означает инструкции, которые обычно вложены в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов, и в которых имеется информация, касающаяся показаний, способа применения, дозы, способа введения, противопоказаний и/или предупреждений относительно применения таких терапевтических продуктов.

Термин "фаговое представление" означает способ, с помощью которого различные полипептиды могут быть представлены в виде гибридных белков с белком оболочки на поверхности фага, например, нитчатого фага или фаговых частиц. Ценность метода фагового представления заключается в том, что крупные библиотеки рандомизированных вариантов белков могут быть быстро и эффективно отсортированы на последовательности, которые связываются с молекулой-мишенью с высокой аффинностью. Представление пептидных и белковых библиотек на фаге было использовано в целях скрининга миллионов полипептидов на полипептиды, обладающие специфическими связывающими свойствами. Поливалентные методы фагового представления были использованы для представления небольших рандомизированных пептидов и небольших белков, обычно путем их слияния с рIII или рVIII нитчатого фага (Wells & Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 и цитируемые там работы). При моновалентном фаговом представлении, белковую или пептидную библиотеку присоединяют к белку оболочки фага или к его части, и эта библиотека экспрессируется на низком уровне в присутствии белка дикого типа. По сравнению с поливалентным фагом, эффекты авидности ослабляются, а поэтому, сортинг проводят на основе присущей данному лиганду аффинности, и используют фагмидные векторы, которые упрощают манипуляции с ДНК. Lowman & Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991). Фаговое представление включает методы продуцирования антитело-подобных молекул (Janeway C. Travers P. Walport M. Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p.627-628;

Lee et al.)).

“Фагмида” представляет собой плазмидный вектор, имеющий  
 5 бактериальный ориджин репликации, например, ColE1, и копию  
 межгенной области бактериофага. Фагмида может быть использована  
 на любом известном бактериофаге, включая нитчатый бактериофаг и  
 10 бактериофаг лямбда. Обычно, плазмида также содержит селективный  
 маркер резистентности к антибиотику. Сегменты ДНК, клонированные  
 в эти векторы, могут быть амплифицированы в виде плазмид. Если  
 15 клетки, содержащие эти векторы, имеют все гены, необходимые для  
 продуцирования фаговых частиц, то механизм репликации плазмиды  
 20 меняется на механизм репликации по типу “катящегося” кольца, в  
 результате чего образуются копии одной цепи плазмидной ДНК и  
 упаковывающих фаговых частиц. Эта фагмида может образовывать  
 25 инфекционные или неинфекционные фаговые частицы. Термин  
 “фагмида” включает фагмиды, содержащие ген белка оболочки фага  
 или его фрагмент, присоединенный к гетерологичному гену  
 30 полипептида в виде генного гибрида, так, чтобы указанный  
 гетерологичный полипептид был представлен на поверхности фаговой  
 35 частицы.

Термины “линкер”, “линкерный компонент” или “связь”  
 40 означают химическую группу, содержащую ковалентную связь или  
 цепь атомов, которые ковалентно связывают антитело с молекулой  
 лекарственного средства. В различных вариантах изобретения,  
 45 линкер обозначается L. Линкером является двувалентный радикал,  
 такой как алкилдиил, арилен, гетероарилен, такие группы, как  
 50  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , повторяющиеся звенья алкилокси (например,  
 полиэтиленокси, ПЭГ, полиметиленокси) и алкиламино (например,

полиэтиленамино, Jeffamine<sup>TM</sup>), и двухосновный сложный эфир и амиды, включая сукцинат, сукцинамид, дигликолят, малонат и капроамид.

Термин "метка" означает любую молекулу, которая может быть ковалентно присоединена к антителу, и которая имеет следующие функции: (i) способность к передаче детектируемого сигнала; (ii) взаимодействует со второй меткой для модификации детектируемого сигнала, подаваемого первой или второй меткой, например, посредством FRET (перенос резонансной энергии флуоресценции); (iii) стабилизирует взаимодействия или повышает аффинность связывания с антигеном или лигандом; (iv) воздействует на подвижность, например, электрофоретическую подвижность или клеточную проницаемость, под влиянием заряда, гидрофобности, формы или других физических параметров; или (v) обеспечивает захват молекулы с модуляцией аффинности к лиганду, связывания антитела с антигеном или образования ионных комплексов.

Определения и обозначения используемых здесь стереохимических терминов в общих чертах приводятся у S.P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel E. & Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, то есть, они способны вращать плоскость плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения, префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно его (их) хирального(ых) центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-)

используются для обозначения знака вращения плоскополяризованного света данным соединением, при этом, (-) или l означает, что данное соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для данной химической структуры, эти стереоизомеры являются идентичными, и кроме того, они являются зеркальным отображением друг друга. Специфический стереоизомер может также называться энантиомером, а смесь таких изомеров часто называется энантиомерной смесью. Смесь 50:50 энантиомеров называется рацемической смесью или рацематом, который может образовываться в том случае, если в химической реакции или в химическом процессе отсутствует стереоселективность или стереоспецифичность. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" означают эквимольную смесь двух энантиомерных молекул, не обладающих оптической активностью.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемая соль" означает фармацевтически приемлемые органические или неорганические соли ADC. Примерами таких солей являются, но не ограничиваются ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е., 1,1'-метиленис-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Термин "фармацевтически приемлемая соль" может включать и другую молекулу, такую как ион ацетата,



ион сукцината или другой противоион. Такой противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую молекулу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более чем один заряженный атом. В случае, если множество заряженных атомов является частью фармацевтически приемлемой соли, то такая соль может иметь множество противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Термин "фармацевтически приемлемый сольват" означает комплекс одной или нескольких молекул растворителя и ADC. Примерами растворителей, которые образуют фармацевтически приемлемые сольваты, являются, но не ограничиваются ими, вода, изопропанол, этанол, метанол, ДМСО, этилацетат, уксусная кислота и этаноламин.

Сокращения, используемые в настоящем описании, имеют нижеследующие значения: BME означает бета-меркаптоэтанол, Вос означает N-(трет-бутоксикарбонил), cit означает цитруллин (2-амино-5-уреидо-пентановую кислоту), dap означает долапроин, DCC означает 1,3-дициклогексилкарбодиимид, DCM (ДХМ) означает дихлорметан, DEA означает диэтиламин, DEAD означает диэтилазодикарбоксилат, DEPC означает диэтилфосфорилцианидат, DIAD означает диизопропилазодикарбоксилат, DIEA означает N,N-диизопропилэтиламин, dil означает долаизолейцин, DMA означает диметилацетамид, DMAP означает 4-диметиламинопиридин, DME означает диметиловый эфир этиленгликоля (или 1,2-диметоксиэтан),

DMF (ДМФ) означает N,N-диметилформамид, DMSO (ДМСО) означает диметилсульфоксид, doe означает долафенин, dov означает N,N-диметилвалин, DNTB означает 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту), DTPA означает диэтилентриаминопентауксусную кислоту, DTT означает дитиотреитол, EDCI означает гидрохлорид 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида, EEDQ означает 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин, ES-MS означает масс-спектрометрию электрораспылением, EtOAc означает этилацетат, Fmoc означает N-(9-флуоренилметоксикарбонил), gly означает глицин, HATU означает гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония, HOBt означает 1-гидроксibenзотриазол, HPLC (ЖХВД) означает жидкостную хроматографию высокого давления, ile означает изолейцин, lys означает лизин, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) означает ацетонитрил, MeOH означает метанол, Mtr означает 4-анизилдифенилметил (или 4-метокситритил), nor (нор) означает (1S,2R)-(+)-норэфедрин, PAB означает п-аминобензилкарбамоил, PBS означает забуференный фосфатом физиологический раствор (рН 7,4), PEG (ПЭГ) означает полиэтиленгликоль, Ph означает фенил, Pnp означает п-нитрофенил, MS означает 6-малеимидакапроил, phe означает L-фениламин, PyBrop означает гексафторфосфат бром-трис-пирролидинофосфония, SEC означает эксклюзионную хроматографию, Su означает сукцинимид, TFA означает трифторуксусную кислоту, TLC (ТСХ) означает тонкослойную хроматографию, UV (УФ) означает ультрафиолетовое излучение, а val означает валин.

#### **Антитела, сконструированные с использованием цистеинов**

Соединения согласно изобретению включают сконструированные

на основе цистеинов антитела, в которых одна или несколько аминокислот дикого типа или родительского антитела заменены цистеином. Таким образом может быть сконструирована, то есть, мутирована любая форма антитела. Так, например, Fab-фрагмент родительского антитела может быть сконструирован так, чтобы он представлял собой цистеин-содержащий Fab, называемый здесь "тио-Fab". Аналогичным образом, в форме "тио-Mab" может быть сконструировано родительское моноклональное антитело. При этом, следует отметить, что односайтовая мутация приводит к включению одного цистеинового остатка в тио-Fab, тогда как двухсайтовая мутация приводит к включению двух цистеиновых остатков в тио-Mab, что обусловлено димерной природой антитела IgG. Мутанты с замененными ("сконструированными") цистеиновыми остатками (Cys) оценивают на реакционную способность новых введенных тиоловых групп цистеина. Термин "тиоловая реактивность" означает относительную количественную величину, варьирующуюся в пределах от 0 до 1,0, которая может быть измерена для любого антитела, сконструированного на основе цистеина. Величины тиоловой реактивности в сконструированных на основе цистеина антителах согласно изобретению составляют в пределах от 0,6 до 1,0; от 0,7 до 1,0 или от 0,8 до 1,0.

Способы конструирования, отбора и получения сконструированных на основе цистеина антител согласно изобретению позволяют получать антитела, которые реагируют с электрофильными функциональными группами. Эти способы также позволяют получать соединения-конъюгаты антител, такие как соединения-конъюгаты "антитело-лекарственное средство" (ADC),

где молекулы лекарственного средства присутствуют в определенных, сконструированных селективных сайтах.

5 Реакционноспособные цистеиновые остатки, присутствующие на поверхности антитела, позволяют осуществлять их специфическое конъюгирование с молекулой лекарственного средства посредством  
10 реагирующей с тиолом группы, такой как малеимид или галогенацетил. Нуклеофильная реактивность тиоловой функциональной группы остатка Cys с малеимидной группой примерно  
15 в 1000 раз превышает реактивность с любыми другими аминокислотными функциональными группами в белке, такими как аминогруппа лизиновых остатков или N-концевая аминогруппа.  
20 Тиоловая специфическая функциональная группа в иодацетильных и малеимидных реагентах может реагировать с аминогруппами, но для этого требуется более высокий pH (>9,0) и более продолжительное время реакции (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A  
25 Practical Approach, Academic Press, London).

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно изобретению, предпочтительно, сохраняют антигенсвязывающую  
35 способность антител дикого типа и аналогов родительского антитела. Таким образом, сконструированные на основе цистеина антитела обладают способностью связываться, а предпочтительно,  
40 специфически связываться с антигенами. Такими антигенами являются, например, опухолеассоциированные антигены (ТАА);  
45 рецепторные белки клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности; трансмембранные белки; белки передачи сигнала; факторы регуляции выживания клеток; факторы регуляции  
50 пролиферации клеток; молекулы, ассоциированные с развитием или

дифференцировкой ткани (которые, как известно или  
предположительно, стимулируют указанные функции); лимфокины;  
5 цитокины; молекулы, участвующие в регуляции клеточного цикла;  
молекулы, участвующие в образовании сосудов; и молекулы,  
ассоциированные с ангиогенезом (которые, как известно или  
10 предположительно, стимулируют такой ангиогенез).  
Опухольассоциированным антигеном может быть фактор кластеров  
дифференцировки (то есть, CD-белок). Антиген, с которым может  
15 связываться сконструированное на основе цистеина антитело, может  
быть членом субпопуляции антигенов одной из вышеупомянутых  
20 категорий, где другая(ие) субпопуляция(и) антигенов указанной  
категории включает(ют) другие молекулы/антигены, имеющие  
характерные отличительные признаки (в отношении представляющего  
25 интерес антигена).

Родительским антителом может быть также гуманизованное  
30 антитело, выбранное из антител huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-  
3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8  
(трастузумаб HERCEPTIN®), описанных в таблице 3 в патенте США  
35 5821337, который во всей своей полноте вводится в настоящее  
описание посредством ссылки; гуманизованного антитела 520C9 (WO  
40 93/21319) и описанного здесь гуманизованного антитела 2C4.

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно  
изобретению могут сайт-специфически и эффективно связываться с  
45 реагентом, взаимодействующим с тиолом. Реагентом,  
взаимодействующим с тиолом, может быть многофункциональный  
линкерный реагент; реагент для захвата, то есть, аффинный  
50 реагент-метка (например, реагент "биотин-линкер"), детектируемая

метка (например, флуорофор), реагент для иммобилизации на твердой фазе (например, сефароза<sup>™</sup>, полистирол или стекло), или промежуточное соединение "лекарственное средство-линкер". Одним из примеров реагента, взаимодействующего с тиолом, является N-этилмалеимид (NEM). В репрезентативном варианте изобретения, реакция взаимодействия тио-Fab с реагентом "биотин-линкер" приводит к образованию биотинилированного тио-Fab, в котором могут быть детектированы и определены присутствие и реакционная активность сконструированного цистеинового остатка. Реакция взаимодействия тио-Fab с многофункциональным линкерным реагентом приводит к получению тио-Fab с функционализированным линкером, который может быть затем подвергнут реакции взаимодействия с молекулой лекарственного средства или с другой меткой. Реакция взаимодействия тио-Fab с промежуточным соединением "лекарственное средство-линкер" приводит к образованию конъюгата "тио-Fab-лекарственное средство".

Описанные здесь репрезентативные способы могут быть применены, в общих чертах, для идентификации и продуцирования антител, а в более широком смысле, других белков путем проведения описанных здесь стадий конструирования и скрининга.

Такой способ может быть применен для конъюгирования других реагирующих с тиолом агентов, в которых реакционноспособной группой является, например, малеимид, иодацетамид, пиридилдисульфид или другой реагирующий с тиолом партнер по конъюгированию (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  
5 Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). Указанным партнером может быть цитотоксический агент (например, токсин, такой как доксорубин или коклюшный  
10 токсин); флуорофор, такой как флуоресцентный краситель, подобный флуоресцеину или родамину; хелатообразующий агент для визуализации, или радиоактивный металл, обладающий  
15 терапевтическими свойствами, пептидильная или непептидильная метка или детектируемая метка, клиренс-модифицирующий агент, такой как различные изомеры полиэтиленгликоля, пептид, который  
20 связывается с третьим компонентом, или другой углевод или липофильный агент.

25 Сайты, идентифицированные на описанном здесь репрезентативном фрагменте антитела, hu4D5Fabv8, присутствуют, главным образом, в константном домене антитела, который является  
30 полностью консервативным для всех видов антител. Эти сайты должны найти широкое применение для других антител, поскольку их использование не требует проведения дополнительного структурного  
35 конструирования или конкретной информации о структурах антител, а также не влияет на антигенсвязывающие свойства, присущие переменным доменам антитела.

40 Сконструированными на основе цистеина антителами, которые могут быть использованы для лечения рака, являются, но не ограничиваются ими, антитела против рецепторов клеточной  
45 поверхности и опухолеассоциированных антигенов (ТАА). Указанные антитела могут быть использованы в виде "оголенных" антител

(неконъюгированных с лекарственным средством или с меткой) или в виде конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) формулы

5 I. Опухولةассоциированные антигены известны специалистам и могут быть получены для их использования в целях создания антител в соответствии со способами и данными, хорошо известными  
10 специалистам. В попытке обнаружения эффективных клеточных мишеней для диагностики и лечения рака, были проведены исследования по идентификации трансмембранных или каких-либо  
15 других опухолеассоциированных полипептидов, которые специфически экспрессируются на поверхности раковых клеток одного или нескольких конкретных типов, по сравнению с нормальными  
20 нераковыми клетками одного или нескольких типов. В большинстве случаев, такие опухолеассоциированные полипептиды более интенсивно экспрессируются на поверхности раковых клеток, чем на  
25 поверхности нераковых клеток. Идентификация таких опухолеассоциированных полипептидов антигена клеточной поверхности дает возможность подвергать специфической деструкции  
30 раковые клетки-мишени посредством терапии с применением антител.

35 Примерами ТАА являются, но не ограничиваются ими, ТАА (1)-(36), перечисленные ниже. Для удобства, вся информация, относящаяся к этим антигенам и известная специалистам,  
40 приводится ниже и включает названия, альтернативные названия, регистрационные номера Genbank и основные ссылки, в соответствии с соглашениями по идентификации последовательностей нуклеиновых  
45 кислот и белков, утвержденными Национальным Центром Биотехнологической Информации (NCBI). Последовательности нуклеиновых кислот и белков, соответствующие ТАА (1)-(36),  
50



имеются в общедоступных базах данных, таких как Genbank. Опухولةассоциированные антигены, которые являются мишенями для антител, включают все варианты и изоформы аминокислотных последовательностей, являющихся, по меньшей мере, примерно на 70%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичными последовательностям, идентифицированным в цитируемых работах, или обладающих, по существу, такими же биологическими свойствами или характеристиками, как и ТАА, имеющие последовательность, описанную в цитируемых работах. Так, например, ТАА, имеющий модифицированную последовательность, в основном, способен специфически связываться с антителом, которое специфически связывается с ТАА, имеющим соответствующую указанную последовательность. Последовательности и их описание в конкретно цитируемой здесь работе, во всей своей полноте вводятся в настоящее изобретение посредством ссылки.

#### **Опухولةассоциированные антигены (1) – (36) :**

(1) BMPR1B (рецептор белка морфогенеза кости типа IB, Genbank рег.№ NM\_001203); ten Dijke, P., et al. Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO2004063362 (пункт формулы изобретения 2); WO2003042661 (пункт формулы изобретения 12); US2003134790-A1 (стр. 38-39); WO2002102235 (пункт формулы изобретения 13; стр. 296); WO2003055443 (стр. 91-92); WO200299122 (пример 2; стр. 528-530); WO2003029421 (пункт формулы изобретения 6); WO2003024392 (пункт формулы изобретения 2; фиг.112); WO200298358 (пункт формулы изобретения 1; Стр. 183); WO200254940 (стр. 100-101); WO200259377 (стр. 349-350); WO200230268 (пункт формулы

изобретения 27; стр. 376); WO200148204 (пример; фиг.4) NP\_001194  
рецептор белка морфогенеза кости типа IB /pid=NP\_001194.1. -  
5 Перекрестные ссылки: MIM:603248; NP\_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank рег.№ NM\_003486); Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395  
10 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992) J. Biol.  
Chem. 267 (16):11267-11273); WO2004048938 (пример 2);  
15 WO2004032842 (пример IV); WO2003042661 (пункт формулы  
изобретения 12); WO2003016475 (пункт формулы изобретения 1);  
WO200278524 (пример 2); WO200299074 (пункт формулы изобретения  
20 19; стр. 127-129); WO200286443 (пункт формулы изобретения 27;  
стр. 222, 393); WO2003003906 (пункт формулы изобретения 10; стр.  
293); WO200264798 (пункт формулы изобретения 33; стр. 93-95);  
25 WO200014228 (пункт формулы изобретения 5; стр. 133-136);  
US2003224454 (фиг.3); WO2003025138 (пункт формулы изобретения  
30 12; стр. 150); NP\_003477 растворимый белок-носитель семейства 7  
(переносчик катионных аминокислот, у+ система), член 5  
/pid=NP\_003477.3 - Homo sapiens. Перекрестные ссылки:  
35 MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923; NM\_003486\_1.

(3) STEAP1 (шестидоменный трансмембранный эпителиальный  
40 антиген предстательной железы, Genbank рег.№ NM\_012449); Cancer  
Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25): 14523-14528);  
45 WO2004065577 (пункт формулы изобретения 6); WO2004027049  
(фиг.1L); EP1394274 (пример 11); WO2004016225 (пункт формулы  
изобретения 2); WO2003042661 (пункт формулы изобретения 12);  
50 US2003157089 (пример 5); US2003185830 (пример 5); US2003064397

(фиг.2); WO200289747 (пример 5; стр. 618-619); WO2003022995  
(пример 9; фиг.13A, пример 53; стр. 173, пример 2; фиг.2A);  
5 NP\_036581 шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген  
предстательной железы; Перекрестные ссылки: MIM:604415;  
NP\_036581.1; NM\_012449\_1

10 (4) 0772P (CA125, MUC16, Genbank рег.№ AF361486); J. Biol.  
Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004045553 (пункт формулы  
15 изобретения 14); WO200292836 (пункт формулы изобретения 6;  
фиг.12); WO200283866 (пункт формулы изобретения 15; стр. 116-  
121); US2003124140 (пример 16); Перекрестные ссылки: GL34501467;  
20 AAK74120.3; AF361486\_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцитарный потенцирующий  
фактор, мезотелин, Genbank рег.№ NM\_005823) Yamaguchi, N., et  
25 al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci.  
U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
30 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990  
(1995)); WO2003101283 (пункт формулы изобретения 14);  
(WO2002102235 (пункт формулы изобретения 13; стр. 287-288);  
35 WO2002101075 (пункт формулы изобретения 4; стр. 308-309);  
WO200271928 (стр. 320-321); WO9410312 (стр. 52-57); Перекрестные  
ссылки: MIM:601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1  
40

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, член 2 семейства  
растворимых носителей 34 (фосфат натрия), натрий-зависимый  
45 фосфат-переносящий белок 3b типа II, Genbank рег.№ NM\_006424);  
J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-  
284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res.  
50 Commun. 258 (3):578-582); WO2004022778 (пункт формулы

изобретения 2); EP1394274 (пример 11); WO2002102235 (пункт формулы изобретения 13; стр. 326); EP875569 (пункт формулы изобретения 1; стр. 17-19); WO200157188 (пункт формулы изобретения 20; стр. 329); WO2004032842 (пример IV); WO200175177 (пункт формулы изобретения 24; стр. 139-140); Перекрестные ссылки: MIM:604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, сема-домен, семидоменные повторы тромбоспондина (типа 1 и подобный типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B, Genbank рег.№ AB040878); Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150); WO2004000997 (пункт формулы изобретения 1); WO2003003984 (пункт формулы изобретения 1); WO200206339 (пункт формулы изобретения 1; стр. 50); WO200188133 (пункт формулы изобретения 1; стр. 41-43, 48-58); WO2003054152 (пункт формулы изобретения 20); WO2003101400 (пункт формулы изобретения 11); регистрационные номера: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, Genbank accession no. AY358628); Ross et al. (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US2003129192 (пункт формулы изобретения 2); US2004044180 (пункт формулы изобретения 12); US2004044179 (пункт формулы изобретения 11); US2003096961 (пункт формулы изобретения 11); US2003232056 (пример 5); WO2003105758 (пункт формулы изобретения 12); US2003206918 (пример 5); EP1347046 (пункт формулы изобретения 1); WO2003025148 (пункт формулы изобретения 20); Перекрестные

ССЫЛКИ: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628\_1

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа В, Genbank рег.№  
5 AY275463); Nakamuta M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.  
177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56,  
10 1303-1307, 1992; Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470,  
1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. J. Biol.  
15 Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. J. Cardiovasc.  
Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43-49,  
20 1999; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99,  
16899-16903, 2002; Bourgeois C, et al. J. Clin. Endocrinol.  
Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272,  
25 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108,  
223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5,  
30 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al. Cell 79, 1257-1266,  
1994; Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995;  
Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J.,  
35 et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al.  
Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al. Hum. Genet.  
40 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115-124, 2001;  
Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206;  
WO2004045516 (пункт формулы изобретения 1); WO2004048938 (пример  
45 2); WO2004040000 (пункт формулы изобретения 151); WO2003087768  
(пункт формулы изобретения 1); WO2003016475 (пункт формулы  
изобретения 1); WO2003016475 (пункт формулы изобретения 1);  
50 WO200261087 (фиг.1); WO2003016494 (фиг.6); WO2003025138 (пункт

формулы изобретения 12; стр. 144); WO200198351 (пункт формулы изобретения 1; стр. 124-125); EP522868 (пункт формулы изобретения 8; фиг.2); WO200177172 (пункт формулы изобретения 1; стр. 297-299); US2003109676; US6518404 (фиг.3); US5773223 (пункт формулы изобретения 1a; Col 31-34); WO2004001004;

(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, Genbank рег.№ NM\_017763); WO2003104275 (пункт формулы изобретения 1); WO2004046342 (пример 2); WO2003042661 (пункт формулы изобретения 12); WO2003083074 (пункт формулы изобретения 14; стр. 61); WO2003018621 (пункт формулы изобретения 1); WO2003024392 (пункт формулы изобретения 2; фиг.93); WO200166689 (пример 6);  
Перекрестные ссылки: LocusID:54894; NP\_060233.2; NM\_017763\_1

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестидоменный трансмембранный белок предстательной железы, Genbank рег.№ AF455138); Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); WO2003087306; US2003064397 (пункт формулы изобретения 1; фиг.1); WO200272596 (пункт формулы изобретения 13; стр. 54-55); WO200172962 (пункт формулы изобретения 1; фиг.4B); WO2003104270 (пункт формулы изобретения 11); WO2003104270 (пункт формулы изобретения 16); US2004005598 (пункт формулы изобретения 22); WO2003042661 (пункт формулы изобретения 12); US2003060612 (пункт формулы изобретения 12; фиг.10); WO200226822 (пункт формулы изобретения 23; фиг.2); WO200216429 (пункт формулы изобретения 12; фиг.10); Перекрестные

ссылки: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138\_1

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, рецептор,  
5 быстрый потенциал-зависимый катионный канал, член 4 подсемейства  
M, Genbank рег.№ NM\_017636); Xu, X.Z., et al. Proc. Natl. Acad.  
Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407  
10 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003));  
US2003143557 (пункт формулы изобретения 4); WO200040614 (пункт  
формулы изобретения 14; стр. 100-103); WO200210382 (пункт  
15 формулы изобретения 1; фиг.9A); WO2003042661 (пункт формулы  
изобретения 12); WO200230268 (пункт формулы изобретения 27; стр.  
20 391); US2003219806 (пункт формулы изобретения 4); WO200162794  
(пункт формулы изобретения 14; фиг.1A-D); Перекрестные ссылки:  
MIM:606936; NP\_060106.2; NM\_017636\_1

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста,  
происходящий от тератокарциномы, Genbank рег.№ NP\_003203 или  
30 NM\_003212); Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7):1987-1991  
(1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US2003224411  
(пункт формулы изобретения 1); WO2003083041 (пример 1);  
35 WO2003034984 (пункт формулы изобретения 12); WO200288170 (пункт  
формулы изобретения 2; стр. 52-53); WO2003024392 (пункт формулы  
изобретения 2; фиг.58); WO200216413 (пункт формулы изобретения  
40 1; стр. 94-95, 105); WO200222808 (пункт формулы изобретения 2;  
фиг.1) US5854399 (пример 2; Col 17-18); US5792616 (фиг.2);  
45 Перекрестные ссылки: MIM:187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1

(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR  
(C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или Hs.73792, Genbank рег.№  
50 M26004); Fujisaku et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-

2125); Weis J.J., et al. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore  
 M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987;  
 5 Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J.,  
 et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha  
 S.K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004045520  
 10 (пример 4); US2004005538 (пример 1); WO2003062401 (пункт формулы  
 изобретения 9); WO2004045520 (пример 4); WO9102536 (фиг.9.1-  
 9.9); WO2004020595 (пункт формулы изобретения 1);  
 15 Регистрационные номера: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004;  
 AAA35786.1

20 (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Igb (бета-белок, связанный с  
 иммуноглобулином), B29, Genbank рег.№ NM\_000626 или 11038574);  
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood  
 25 (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol.  
 22 (6): 1621-1625); WO2004016225 (пункт формулы изобретения 2,  
 30 фиг.140); WO2003087768, US2004101874 (пункт формулы изобретения  
 1, стр. 102); WO2003062401 (пункт формулы изобретения 9);  
 WO200278524 (пример 2); US2002150573 (пункт формулы изобретения  
 35 5, стр. 15); US5644033; WO2003048202 (пункт формулы изобретения  
 1, стр. 306 и 309); WO 99/558658, US6534482 (пункт формулы  
 изобретения 13, фиг.17A/B); WO200055351 (пункт формулы  
 40 изобретения 11, стр. 1145-1146); Перекрестные ссылки:  
 MIM:147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1

45 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (фосфатазный якорный белок  
 1a, содержащий домен SH2), SPAP1B, SPAP1C, Genbank рег.№  
 NM\_030764, AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003),  
 50 Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669



(2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001),  
Xu, MJ., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280  
5 (3):768-775; WO2004016225 (пункт формулы изобретения 2);  
WO2003077836; WO200138490 (пункт формулы изобретения 5; фиг.18D-  
1-18D-2); WO2003097803 (пункт формулы изобретения 12);  
10 WO2003089624 (пункт формулы изобретения 25); Перекрестные  
ссылки: MIM:606509; NP\_110391.2; NM\_030764\_1

15 (17) HER2 (ErbB2, Genbank per.№ M11730); Coussens L., et  
al. Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al.  
Nature 319, 230- 234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad.  
20 Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al. J. Cell  
Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns JJ., et al. J. Biol. Chem. 274,  
36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003;  
25 Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; WO2004048938  
(пример 2); WO2004027049 (фиг.1I); WO2004009622; WO2003081210;  
30 WO2003089904 (пункт формулы изобретения 9); WO2003016475 (пункт  
формулы изобретения 1); US2003118592; WO2003008537 (пункт  
формулы изобретения 1); WO2003055439 (пункт формулы изобретения  
35 29; фиг.1A-B); WO2003025228 (пункт формулы изобретения 37;  
фиг.5C); WO200222636 (пример 13; стр. 95-107); WO200212341  
40 (пункт формулы изобретения 68; фиг.7); WO200213847 (стр. 71-74);  
WO200214503 (стр. 114-117); WO200153463 (пункт формулы  
изобретения 2; стр. 41-46); WO200141787 (стр. 15); WO200044899  
45 (пункт формулы изобретения 52; фиг.7); WO200020579 (пункт  
формулы изобретения 3; фиг.2); US5869445 (пункт формулы  
изобретения 3; Col 31-38); WO9630514 (пункт формулы изобретения  
50 2; стр. 56-61); EP1439393 (пункт формулы изобретения 7);

WO2004043361 (пункт формулы изобретения 7); WO2004022709;  
WO200100244 (пример 3; фиг.4); Регистрационные номера: P04626;  
5 EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

(18) NCA (CEACAM6, Genbank per.№ M18728); Barnett T., et  
al. Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem.  
10 Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002;  
15 WO2004063709; EP1439393 (пункт формулы изобретения 7);  
WO2004044178 (пример 4); WO2004031238; WO2003042661 (пункт  
формулы изобретения 12); WO200278524 (пример 2); WO200286443  
20 (пункт формулы изобретения 27; стр. 427); WO200260317 (пункт  
формулы изобретения 2); Регистрационные номера: P40199; Q14920;  
EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

25 (19) MDP (DPEP1, Genbank per.№ BC017023); Proc. Natl. Acad.  
Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002)); WO2003016475 (пункт  
30 формулы изобретения 1); WO200264798 (пункт формулы изобретения  
33; стр. 85-87); JP05003790 (фиг.6-8); WO9946284 (фиг.9);  
Перекрестные ссылки: MIM:179780; AAN17023.1; BC017023\_1

35 (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, Genbank per. № AF184971);  
Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall  
40 A.J., et al. Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al. Cell  
104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al. J. Immunol. 167, 3545-  
3549, 2001; Parrish-Novak J., et al. J. Biol. Chem. 277, 47517-  
45 47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) Biochemistry 42:12617-  
12624; Sheikh F., et al. (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010;  
EP1394274 (пример 11); US2004005320 (пример 5); WO2003029262  
50 (стр. 74-75); WO2003002717 (пункт формулы изобретения 2; стр.

63); WO200222153 (стр. 45-47); US2002042366 (стр. 20-21);  
 WO200146261 (стр. 57-59); WO200146232 (стр. 63-65); WO9837193  
 5 (пункт формулы изобретения 1; стр. 55-59); Регистрационные  
 номера: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAV, Genbank per.№ AF229053); Gary  
 10 S.C., et al. Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al. Genome  
 Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl.  
 Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (пункт  
 15 формулы изобретения 11); US2003186373 (пункт формулы изобретения  
 11); US2003119131 (пункт формулы изобретения 1; фиг.52);  
 20 US2003119122 (пункт формулы изобретения 1; фиг.52); US2003119126  
 (пункт формулы изобретения 1); US2003119121 (пункт формулы  
 изобретения 1; фиг.52); US2003119129 (пункт формулы изобретения  
 25 1); US2003119130 (пункт формулы изобретения 1); US2003119128  
 (пункт формулы изобретения 1; фиг.52); US2003119125 (пункт  
 30 формулы изобретения 1); WO2003016475 (пункт формулы изобретения  
 1); WO200202634 (пункт формулы изобретения 1);

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Genbank per.№  
 35 NM\_004442) Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061  
 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci.  
 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000));  
 40 WO2003042661 (пункт формулы изобретения 12); WO200053216 (пункт  
 формулы изобретения 1; стр. 41); WO2004065576 (пункт формулы  
 45 изобретения 1); WO2004020583 (пункт формулы изобретения 9);  
 WO2003004529 (стр. 128-132); WO200053216 (пункт формулы  
 изобретения 1; стр. 42); Перекрестные ссылки: MIM:600997;  
 50 NP\_004433.2; NM\_004442\_1

(23) ASLG659 (B7h, Genbank рег.№ AX092328); US20040101899  
(пункт формулы изобретения 2); WO2003104399 (пункт формулы  
5 изобретения 11); WO2004000221 (фиг.3); US2003165504 (пункт  
формулы изобретения 1); US2003124140 (пример 2); US2003065143  
(фиг.60); WO2002102235 (пункт формулы изобретения 13; стр. 299);  
10 US2003091580 (пример 2); WO200210187 (пункт формулы изобретения  
6; фиг.10); WO200194641 (пункт формулы изобретения 12; фиг.7b);  
15 WO200202624 (пункт формулы изобретения 13; фиг.1A-1B);  
US2002034749 (пункт формулы изобретения 54; стр. 45-46);  
WO200206317 (пример 2; стр. 320-321, пункт формулы изобретения  
20 34; стр. 321-322); WO200271928 (стр. 468-469); WO200202587  
(пример 1; фиг.1); WO200140269 (пример 3; стр. 190-192);  
WO200036107 (пример 2; стр. 205-207); WO2004053079 (пункт  
25 формулы изобретения 12); WO2003004989 (пункт формулы изобретения  
1); WO200271928 (стр. 233-234, 452-453); WO 0116318;

30 (24) PSCA (антиген-предшественник стволовых клеток  
предстательной железы, Genbank рег.№ AJ297436); Reiter R.E., et  
al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et  
35 al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun.  
(2000) 275(3):783-788; WO2004022709; EP1394274 (пример 11);  
40 US2004018553 (пункт формулы изобретения 17); WO2003008537 (пункт  
формулы изобретения 1); WO200281646 (пункт формулы изобретения  
1; стр. 164); WO2003003906 (пункт формулы изобретения 10; стр.  
45 288); WO200140309 (пример 1; фиг.17); US2001055751 (пример 1;  
фиг.1b); WO200032752 (пункт формулы изобретения 18; фиг.1);  
WO9851805 (пункт формулы изобретения 17; стр. 97); WO9851824  
50 (пункт формулы изобретения 10; стр. 94); WO9840403 (пункт

формулы изобретения 2; фиг.1B); Регистрационные номера: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

5 (25) GEDA (Genbank рег.№ AY260763); AAP14954 lipoma HMGIC fusion-partner-like protein /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens; вид: Homo sapiens (человек) WO2003054152 (пункт формулы изобретения 10 20); WO2003000842 (пункт формулы изобретения 1); WO2003023013 (пример 3, пункт формулы изобретения 20); US2003194704 (пункт формулы изобретения 45); Перекрестные ссылки: GI30102449; 15 AAP14954.1; AY260763\_1

(26) BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток; рецептор 20 3 BlyS, BR3, Genbank рег.№ AF116456); рецептор BAFF /pid=NP\_443177.1 - Homo sapiens; Thompson, J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611; 25 WO2003045422 (пример; стр. 32-33); WO2003014294 (пункт формулы изобретения 35; фиг.6B); WO2003035846 (пункт формулы изобретения 70; стр. 615-616); WO200294852 (Col 136-137); WO200238766 (пункт формулы изобретения 3; стр. 133); WO200224909 (пример 3; фиг.3); Перекрестные ссылки: MIM:606269; NP\_443177.1; NM\_052945\_1; 35 AF132600

(27) CD22 (CD22-В-изоформа В-клеточного рецептора, BL-CAM, 40 Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Genbank рег. No. AK026467); Wilson et al. (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003072036 (пункт формулы изобретения 1; фиг.1); Перекрестные ссылки: 45 MIM:107266; NP\_001762.1; NM\_001771\_1;

(28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , связанный с иммуноглобулином альфа-белок, В-клеткоспецифический белок, который ковалентно 50 взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс с

молекулами IgM на поверхности клеток, передавая сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток); pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2, Genbank reg. No. NP\_001774.10) WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (пункт формулы изобретения 9); US2002150573 (пункт формулы изобретения 4, стр. 13-14); WO9958658 (пункт формулы изобретения 13, фиг.16); WO9207574 (фиг.1); US5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148(5): 1526- 1531; Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1): 141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

(29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, связанный с G-белком рецептор, который активируется хемокином CXCL13, обеспечивает миграцию лимфоцитов и гуморальную защиту, а также играет определенную роль в инфицировании вирусом ВИЧ-2, и, вероятно, в развитии СПИД'а, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 аминокислоты, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7[P] Gene Chromosome: 11q23.3, Genbank accession No. NP\_001707.1) WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (пример 2); US6555339 (пример 2); WO200261087 (фиг.1); WO200157188 (пункт формулы изобретения 20, стр. 269); WO200172830 (стр. 12-13); WO200022129 (пример 1, стр. 152-153, пример 2, стр. 254-256); WO9928468 (пункт формулы изобретения 1, стр. 38); US5440021 (пример 2, col 49-52); WO9428931 (стр. 56-58); WO9217497 (пункт формулы изобретения 7, фиг.5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;

(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы MHC класса II (антиген Ia), которая связывается с пептидами и презентрует их CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам); 273 аминокислоты, pI: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3, Genbank per. № NP\_002111.1); Tonnellet et al. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al. (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al. (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al. (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO9958658 (пункт формулы изобретения 13, фиг.15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara et al. (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

(31) P2X5 (ионный канал, открываемый лигандом пуринергического рецептора P2X<sub>5</sub>; ионный канал, открываемый внеклеточным АТР, может участвовать в синаптической передаче и в нейрогенезе, а его дефицит может играть определенную роль в патофизиологии идиопатической дисфункции мочевого пузыря,); 422 аминокислоты), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3, Genbank per.№ NP\_002552.2); Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004047749; WO2003072035 (пункт формулы изобретения 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; WO200222660 (пункт формулы изобретения 20); WO2003093444 (пункт формулы изобретения 1); WO2003087768 (пункт формулы изобретения 1); WO2003029277 (стр. 82);

(32) CD72 (антиген CD72 линии В-клеточной дифференцировки,

Lyb-2) PROTEIN SEQUENCE Full maeaity...tafrfpd (1..359; 359  
 аминокислот), pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Gene Chromosome:  
 5 9p13.3, Genbank рег.№ NP\_001773.1); WO2004042346 (пункт формулы  
 изобретения 65); WO2003026493 (стр. 51-52, 57-58); WO200075655  
 (стр. 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol.  
 10 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad.  
 Sci USA 99:16899-16903;

(33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный  
 15 белок семейства богатых лейцином повторов (LRR) типа I, который  
 регулирует активацию и апоптоз В-клеток, и потеря его функции  
 ассоциируется с прогрессированием заболевания у пациентов с  
 20 системной красной волчанкой); 661 аминокислота, pI: 6.20, MW:  
 74147 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 5q12, Genbank рег.№  
 25 NP\_005573.1); US2002193567; WO9707198 (пункт формулы изобретения  
 11, стр. 39-42); Miura et al. (1996) Genomics 38(3):299-304;  
 30 Miura et al. (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003083047; WO9744452  
 (пункт формулы изобретения 8, стр. 57-61); WO200012130 (стр. 24-  
 26);

(34) FcRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый  
 35 рецептор для Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-  
 подобные домены типа C2 и домены ITAM и может играть  
 40 определенную роль в дифференцировке В-лимфоцитов); 429  
 аминокислот, pI: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] Gene Chromosome:  
 45 1q21-1q22, Genbank рег.№ NP\_443170.1); WO2003077836; WO200138490  
 (пункт формулы изобретения 6, фиг.18E-1-18-E-2); Davis et al.  
 (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003089624  
 50 (пункт формулы изобретения 8); EP1347046 (пункт формулы



изобретения 1); WO2003089624 (пункт формулы изобретения 7);

(35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор  
 5 суперсемейства иммуноглобулина 2, предполагаемый иммунорецептор,  
 который, возможно, играет определенную роль в развитии В-клеток  
 и лимфомагенезе; в некоторых злокачественных В-клетках  
 10 наблюдается нарушение регуляции гена посредством транслокации);  
 977 аминокислот, pI: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] Gene Chromosome:  
 1q21, Genbank рег. No. для человека: AF343662, AF343663,  
 15 AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475,  
 AL834187, AY358085; для мыши: AK089756, AY158090, AY506558;  
 20 NP\_112571.1 WO2003024392 (пункт формулы изобретения 2, фиг.97);  
 Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun.  
 277(1):124-127; WO2003077836; WO200138490 (пункт формулы  
 25 изобретения 3, фиг.18B-1-18B-2);

(36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TREF, HPP1, TR,  
 30 предполагаемый трансмембранный протеогликан, родственный  
 семейству факторов роста EGF/терегулинов и фоллистатину); 374  
 аминокислоты, NCBI, рег.№: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI  
 35 RefSeq: NP\_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt  
 Q9UIK5; Genbank accession No. AF179274; AY358907, CAF85723,  
 40 CQ782436; WO2004074320 (SEQ ID NO 810); JP2004113151 (SEQ ID NOS  
 2, 4, 8); WO2003042661 (SEQ ID NO 580); WO2003009814 (SEQ ID NO  
 411); EP1295944 (стр. 69-70); WO200230268 (стр. 329);  
 45 WO200190304 (SEQ ID NO 2706); US2004249130; US2004022727;  
 WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563;  
 US2003124579; Horie et al. (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et  
 50 al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et

al. (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynn-Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84.

5 Родительским антителом может быть также гибридный белок, содержащий последовательность альбумин-связывающего пептида (ABP) (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General  
10 Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Антителами согласно изобретению являются гибридные белки с последовательностями ABP,  
15 описанные в публикациях (i) Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043, таблицы III и IV, стр. 35038; (ii) US 20040001827, SEQ ID NOS: 9-22; и (iii) WO 01/45746, стр. 12-13, SEQ ID NOS: z1-z14, которые вводятся в настоящее описание  
20 посредством ссылки.

### Мутагенез

ДНК, кодирующую вариант аминокислотной последовательности  
30 исходного полипептида, получают различными методами, известными специалистам. Такими методами являются, но не ограничиваются ими, сайт-направленный (или олигонуклеотид-опосредуемый)  
35 мутагенез, ПЦР-мутагенез и кластерный мутагенез полученной ранее ДНК, кодирующей данный полипептид. Варианты рекомбинантных антител могут быть также сконструированы путем манипуляции с  
40 рестрикционными фрагментами или посредством ПЦР-реакции с перекрывающимся удлинением, в которой используются синтетические  
45 олигонуклеотиды. Мутагенные праймеры кодируют замену (ы) цистеинового(ых) кодона(ов). Для генерирования ДНК, кодирующей такие мутантные цистеин-содержащие антитела, могут быть  
50 применены стандартные методы мутагенеза. Общее описание можно

найти в руководстве Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; и Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993.

Сайт-направленный мутагенез представляет собой один из методов получения вариантов белков с заменами, то есть, мутантных белков. Этот метод хорошо известен специалистам (см., например, Carter (1985) et al. Nucleic Acids Res. 13:4431- 4443; Ho et al. (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; и Kunkel et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488). Вкратце, для осуществления сайт-направленного мутагенеза ДНК, исходную ДНК модифицируют путем первой гибридизации олигонуклеотида, кодирующего нужную мутацию, с одной цепью указанной исходной ДНК. После гибридизации, ДНК-полимеразу используют для синтеза полноразмерной второй цепи с применением гибридизованного олигонуклеотида в качестве праймера и с применением одной цепи исходной ДНК в качестве матрицы. Так, например, олигонуклеотид, кодирующий нужную мутацию, встраивают в полученную двухцепочечную ДНК. Сайт-направленный мутагенез может быть осуществлен в гене, экспрессирующем белок, подвергаемый мутагенезу в экспрессионной плазмиде, и полученная плазида может быть секвенирована для подтверждения введения нужных цистеиновых замен (Liu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260). Существуют различные протоколы и форматы сайт-направленного мутагенеза, включая коммерчески доступные, например, набор для мультисайт-направленного мутагенеза (Quik-

Change<sup>®</sup> Multi Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA).

5 ПЦР-мутагенез может быть также использован для получения  
вариантов аминокислотной последовательности исходного  
полипептида. См., Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183,  
10 Academic Press; Ito et al. (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et  
al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; и Vallette et al.  
15 (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733. Вкратце, если в ПЦР в  
качестве исходного материала используются небольшие количества  
матричной ДНК, то могут быть использованы праймеры,  
20 последовательность которых незначительно отличается от  
соответствующей области в матричной ДНК, в целях генерирования  
относительно больших количеств специфических ДНК-фрагментов,  
25 отличающихся от матричной последовательности только в тех  
положениях, в которых праймеры отличаются от матрицы.

30 Другой метод получения вариантов, а именно, кластерный  
мутагенез, основан на технологии, описанной Wells et al. (1985)  
Gene 34:315-323. Исходным материалом является плаزمид (или  
35 другой вектор), содержащая исходную мутируемую полипептид-  
кодирующую ДНК. Для этого идентифицируют кодон(ы) в исходной  
40 ДНК, подвергаемой мутации. На каждой стороне  
идентифицированного(ых) сайта(ов) мутации должен присутствовать  
уникальный сайт рестрикции эндонуклеазой. Если такие  
45 рестрикционные сайты отсутствуют, то для введения в  
соответствующие положения исходной ДНК полипептида, они могут  
быть созданы вышеописанным методом олигонуклеотид-опосредуемого  
50 мутагенеза. Плазмидную ДНК разрезают в этих сайтах для ее

линеаризации. Двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий ДНК-последовательность между рестрикционными сайтами и имеющий  
5     нужную(ые) мутацию(и), синтезируют в соответствии со  
стандартными процедурами, где две цепи олигонуклеотида  
синтезируют отдельно, а затем гибридизуют стандартными методами.  
10    Этот двухцепочечный олигонуклеотид называется кластером. Такой  
кластер конструируют так, чтобы он имел 5'- и 3'-концы,  
15    совместимые с концами линеаризованной плазмиды, и чтобы он мог  
быть непосредственно присоединен к плазмиде. Таким образом, эта  
плазида будет содержать мутированную последовательность ДНК.  
20    Мутантная ДНК, содержащая кодируемые цистеиновые замены, может  
быть подтверждена посредством секвенирования ДНК.

Одиночные мутации также генерируют с помощью  
25    олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием  
двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы и с помощью  
ПЦР-мутагенеза (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A  
30    Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al. (1983) Methods  
Enzymol. 100:468-500; Zoller, MJ. and Smith, M. (1982) Nucl.  
35    Acids Res. 10:6487-6500).

В настоящем изобретении, hu4D5Fabv8, представленный на фаге  
40    M13 (Gerstner et al. (2002) "Sequence Plasticity In The Antigen-  
Binding Site Of A Therapeutic Anti-HER2 Antibody", J MoI Biol.  
321:851-62), был использован в этих экспериментах в качестве  
45    модельной системы. Цистеиновые мутации были введены в  
конструкции: hu4D5Fabv8-фаг, hu4D5Fabv8 и ABP-hu4D5Fabv8.  
Получение hu4D5-ThioFab-фага осуществляли методом преципитации  
50    полиэтиленгликолем (ПЭГ), как описано в литературе (Lowman,

Henry B. (1998) Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey) 87 (Combinatorial Peptide Library Protocols) 249-264).

Олигонуклеотиды получали методом фосфорамидитного синтеза (патенты США 4415732 и 4458066; Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311). Указанный фосфорамидитный метод позволяет проводить реакцию циклоприсоединения нуклеотидных мономерных звеньев с реакционноспособной 3'-фосфорамидитной молекулой с образованием растущей, чаще всего, в 3' → 5' направлении, олигонуклеотидной цепи на твердом носителе, состоящем из стекла с регулируемым размером пор или из высокоструктурированного полистирола, где в указанной реакции, 3'-концевой нуклеозид присоединяется к твердому носителю в начале синтеза (патенты США 5047524 и 5262530). Такой метод обычно осуществляют на автоматических коммерчески доступных синтезаторах (Applied Biosystems, Foster City, CA). Олигонуклеотиды могут быть химически помечены неизотопными молекулами для детекции, захвата, стабилизации или в других целях (Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp.39-54; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp.40-55, 643-671; Keller, G. & Manak, M. in DNA Probes Second Edition (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23).

#### Анализ PHESELECTOR

Анализ PHESELECTOR (фаговый ELISA для отбора

реакционноспособных тиолов) позволяет детектировать  
реакционноспособные цистеиновые группы в антителах в формате  
5 фагового ELISA. Способ нанесения представляющего интерес белка  
(например, антитела) на поверхность лунок с последующим  
инкубированием с фаговыми частицами, а затем с ПХ-меченным  
10 "вторым" антителом, с последующим определением оптической  
плотности подробно описан в примере 2. Мутантные белки,  
представленные на фаге, могут быть скринированы быстрым,  
15 надежным и высокэффективным методом. Этим же самым методом могут  
быть получены библиотеки сконструированных на основе цистеина  
антител, которые могут быть подвергнуты селективному связыванию  
для идентификации включения соответствующих реактивных сайтов  
свободных Cys из рандомизированных фаговых библиотек белков  
25 антител или других белков. Этот метод включает проведение  
реакции цистеиновых мутантных белков, представленных на фаге, с  
аффинным реагентом или репортерной группой, которая также  
30 взаимодействует с тиолом. На фигуре 8 проиллюстрирован анализ  
PHESELECTOR, где схематически представлено связывание Fab или  
тио-Fab с HER2 (вверху) и биотинилированного тιο-Fab со  
35 стрептавидином (внизу).

#### **Экспрессия и очистка белка**

40 ДНК, кодирующая сконструированные на основе цистеина  
антитела, может быть легко выделена и секвенирована в  
соответствии со стандартными процедурами (например, с  
45 использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически  
связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных  
50 антител). Гибридомные клетки служат в качестве источника такой

ДНК. После выделения, ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или другие клетки-хозяева млекопитающих, такие как миеломные клетки (патент США 5807715; заявки на патент США 2005/0048572 и 2004/0229310), которые обычно не продуцируют белок антитела, в результате чего в этих рекомбинантных клетках-хозяевах синтезируются моноклональные антитела. Выходы сконструированных на основе цистеина антител hu4D5Fabv8 были аналогичны выходам hu4D5Fabv8 дикого типа. Обсуждение рекомбинантной экспрессии антитело-кодирующей ДНК в бактериях можно найти в статьях Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 and Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188.

После конструирования и отбора, сконструированные на основе цистеина антитела, например, тио-Fab, имеющие в высокой степени реакционноспособные несвязанные остатки Cys, могут быть получены путем (i) экспрессии в бактериях, например, в *E.coli*-системе или в системе клеточной культуры млекопитающих (WO 01/00245), например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO); и (ii) очистки стандартными методами очистки белка (Lowman et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988).

Тио-Fab были экспрессированы после индуцирования в 34B8, несупрессорном штамме *E.coli* (Basa et al. (1997) Journal Biological Chemistry 272(16): 10678-84). См. пример 3a. Собранный клеточный осадок ресуспендировали в PBS (забуференном фосфатом физиологическом растворе), лизис целых клеток



осуществляли путем их пропускания через микрофлюидизатор, и тио-  
Fab очищали с помощью аффинной хроматографии на G-белок-  
5 Сефарозе<sup>TM</sup> (Amersham). Тио-Fab конъюгировали с биотин-PEO-  
малеимидом как описано выше, и биотинилированные тио-Fab  
дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации на Superdex-200<sup>TM</sup>  
10 (Amersham), в результате чего были удалены свободный биотин-PEO-  
малеимид и олигомерная фракция тио-Fab.

#### 15 Масс-спектроскопический анализ

Масс-спектрометрический анализ с ионизацией путем  
электрораспыления, проводимый в сочетании с жидкостной  
20 хроматографией (LC-ESI-MS), был применен для точного определения  
молекулярной массы конъюгированного с биотином Fab (Cole, R.B.  
Electro Spray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals,  
25 Instrumentation And Applications. (1997) Wiley, New York).  
Аминокислотную последовательность биотинилированного пептида  
30 hu4D5Fabv8 (A121C) определяли путем гидролиза трипсином с  
последующим проведением MS-анализа LC-ESI-Tandem (таблица 4,  
пример 3b).

35 Fab-фрагмент антитела hu4D5Fabv8 содержит примерно 445  
аминокислотных остатков, включая 10 остатков Cys (пять на легкой  
40 цепи и пять на тяжелой цепи). Была установлена с высоким  
разрешением структура фрагмента вариабельной области  
гуманизованного антитела 4D5 (Fv4D5), см. Eigenbrot et al. "X-  
45 Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three  
Variants Of Humanized Anti-P185her2 Antibody 4D5 And Comparison  
With Molecular Modeling" (1993) J Mol Biol. 229:969-995). Все  
50 остатки Cys присутствуют в форме дисульфидных связей, а поэтому

эти остатки не имеют каких-либо реакционноспособных тиоловых групп для конъюгирования с лекарственным средством-малеимидом (если только они не обработаны восстановителем). Следовательно, новый сконструированный остаток Cys может оставаться несвязанным, и может реагировать, то есть, образовывать конъюгат с электрофильным линкерным реагентом или промежуточным соединением "лекарственное средство-линкер", таким как лекарственное средство-малеимид. На фигуре 1A проиллюстрировано трехмерное представление фрагмента антитела hu4D5Fabv8, полученное методом координационной рентгеновской кристаллографии. Структурные положения сконструированных остатков Cys в тяжелой и легкой цепях пронумерованы согласно системе последовательной нумерации. Для варианта 4d5v7fabH трастузумаба, эта система последовательной нумерации коррелирует с системой нумерации Кэбата (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), как показано на фигуре 1B, на которой проиллюстрирована схема последовательной нумерации (верхний ряд), начиная с N-конца, по сравнению со схемой нумерации по Кэбату (нижний ряд), где вставки обозначены a,b,c. С использованием системы нумерации Кэбата, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее или большее число аминокислот вследствие укорочения или вставки в FR или CDR переменного домена. Сайты сконструированных на основе цистеина вариантов тяжелой цепи идентифицируют с применением схемы последовательной нумерации и схемы нумерации Кэбата, как указано в следующей таблице:

Варианты тяжелой цепи 4D5Fab	Последовательная нумерация	Нумерация по Кэбату
A40C	Ala-40	Ala-40
A88C	Ala-88	Ala-84
S119C	Ser-119	Ser-112
S120C	Ser-120	Ser-113
A121C	Ala-121	Ala-114
S122C	Ser-122	Ser-115
A175C	Ala-175	Ala-168

Фагмида M13-Cys-мутантные Fab (фигуры 3А и 3В) могут быть  
 легко скринированы по сравнению с Fab-белками. Связывание  
 фагмиды-тиоFab с антигеном и со стрептавидином може быть  
 протестировано путем нанесения HER2 и стрептавидина,  
 соответственно, на ELISA-планшеты с последующим зондированием  
 анти-Fab антителом, конъюгированным с ПХ (пероксидазой хрена),  
 как описано в примере 2 и проиллюстрировано на фигуре 8. Этот  
 метод позволяет осуществлять одновременный мониторинг влияния  
 Cys-содержащей/конъюгированной с биотином молекулы на связывание  
 с антигеном и на реакционную способность тиоловой группы. Кроме  
 того, указанный метод может быть применен в целях скрининга  
 реакционноспособных тиоловых групп для любого белка,  
 представленного на фаге M13. Конъюгированные или  
 неконъюгированные фагмидные тиоFab очищают путем простой ПЭГ-  
 преципитации.

Антигенсвязывающий фрагмент гуманизованного 4D5 (hu4D5Fab)  
 хорошо экспрессируется в *E.coli* и представлен на бактериофаге

(Garrard et al. (1993) Gene 128:103-109). Fab-фрагмент антитела hu4D5Fabv8 был представлен на фаге M13 в качестве модельной системы в ELISA-анализе для зондирования реакционной способности тиола. На фигуре 8 графически представлен анализ PHESELECTOR, иллюстрирующий связывание биотинилированного тироFab-фага и антифагового ПХ-конъюгированного антитела с HER2 (вверху) и со стрептавидином (внизу). Сначала, исходя из данных кристаллической структуры, было выбрано пять аминокислотных остатков (L-Ala43, H-Ala40, H-Ser119, H-Ala121 и H-Ser122), удаленных от антигенсвязывающей поверхности (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995). Рентгеновская кристаллическая структура, имеющаяся в базе данных белка, обозначена 1FVC. Остатки Cys были введены в эти положения с помощью сайт-направленного мутагенеза. Препараты тироFab-фаг были выделены и подвергнуты реакции с биотинилирующим реагентом.

Конъюгированные с биотином и неконъюгированные варианты тестировали на связывание с HER2 и со стрептавидином с помощью анализа PHESELECTOR на основе ELISA (фигура 8, пример 2), в котором использовали антифаговое антитело, конъюгированное с ПХ (пероксидазой хрена). Мониторинг взаимодействия небиотинилированного фаг-hu4D5Fabv8 (фигура 2A) и биотинилированного фаг-hu4D5Fabv8 (фигура 2B) с BSA (незаштрихованные столбцы), HER2 (серые столбцы) или со стрептавидином (черные столбцы) проводили с использованием анти-M13 антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ), путем осуществления стандартной ПХ-реакции и определения оптической плотности при 450 нм. Оптическую плотность после реакции

превращения колориметрического субстрата измеряли при 450 нм. Способность тиюFab реагировать с HER2 является мерой уровня связывания с антигеном. Способность тиюFab реагировать со стрептавидином является мерой уровня биотинилирования. Способность тиюFab реагировать с BSA используется в качестве негативного контроля для неспецифического связывания. Как показано на фигуре 2A, все варианты тиюFab-фаг обнаруживают такой же уровень связывания с HER2, как и hu4D5Fabv8-фаг дикого типа. Кроме того, конъюгирование с биотином не влияет на уровень связывания тиюFab с HER2 (фигура 2B).

Как было неожиданно выявлено, образцы тиюFab-фага обнаруживают различные уровни активности связывания со стрептавидином. Из всех проанализированных фаг-тиуюFab, максимальной тиоловой реактивностью обладало сконструированное на основе цистеина антитело A121C. Даже при инкубировании hu4D5Fabv8-фага дикого типа с аналогичными количествами биотин-малеимида, этот фаг обнаруживал незначительный уровень связывания со стрептавидином, что указывает на то, что уже присутствующие цистеиновые остатки (участвующие в образовании дисульфидной связи), происходящие от hu4D5Fabv8 и белков оболочки фага M13, не влияют на сайт-специфическое конъюгирование биотин-малеимида. Эти результаты показали, что ELISA-анализ фага может быть успешно проведен для скрининга реакционноспособных тиоловых групп на поверхности Fab.

Анализ PHESELECTOR позволяет осуществлять скрининг реакционноспособных тиоловых групп в антителах. В качестве примера может служить идентификация варианта A121C этим методом.

Для идентификации большего числа вариантов тио-Fab с  
реакционноспособными тиоловыми группами может быть проведен  
5 эффективный поиск полноразмерной молекулы Fab. Для идентификации  
и количественной оценки доступности растворителя для  
аминокислотных остатков в полипептиде был использован такой  
10 параметр, как относительная доступность поверхности. Доступность  
поверхности может быть выражена как площадь поверхности ( $\text{\AA}^2$ ),  
которая может контактировать с молекулой растворителя, например,  
15 с водой. Пространство, занятое водой, выражают приблизительно  
как сферу радиусом  $1,4 \text{ \AA}$ . В пакете кристаллографических программ  
CCP4, которые являются бесплатными, либо требуют лицензионной  
20 оплаты (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington,  
WA44AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, or by internet:  
25 [www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)), используются алгоритмы для  
вычисления поверхностной доступности каждой аминокислоты белка с  
известными кристаллографическими координатами ("The CCP4 Suite:  
30 Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst.  
D50:760-763). Двумя репрезентативными программными модулями, с  
35 помощью которых проводят вычисления поверхностной доступности,  
являются программы "AREAIMOL" и "SURFACE", разработанные на  
основе алгоритмов B. Lee & F.M.Richards (1971) J.MoLBiol.  
40 55:379-400. Программа AREAIMOL позволяет определять доступность  
поверхности белка для растворителя как точку центра сферы зонда  
45 (представляющего молекулу растворителя), когда эта точка  
обкатывает ван-дер-ваальсовскую поверхность белка. Программа  
AREAIMOL позволяет вычислять площадь поверхности, доступную для  
50 растворителя, путем генерирования точек поверхности на большой

сфере вокруг каждого атома (на расстоянии от центра атома, равном сумме радиусов атома и зонда) и элиминации тех точек, которые находятся в эквивалентных сферах, ассоциированных с соседними атомами. Программа AREAIMOL позволяет определять доступную для растворителя площадь атомов в PDB-файле координат и систематизировать доступную площадь остатка, цепи и всей молекулы. Площади (или разности площадей), доступные для отдельных атомов, могут быть зарегистрированы в выходном псевдо-PDB-файле. Программа AREAIMOL использует только один радиус для каждого элемента и распознает только ограниченное число различных элементов. Атомы неизвестных типов (то есть, атомы, отсутствующие во внутренней базе данных AREAIMOL) будут приниматься по умолчанию как атомы с радиусом 1,8 Å. Список известных атомов приводится ниже.

Атом	Атомный номер	Ван-дер-ваальсовский радиус (Å)
C	6	1,80
N	7	1,65
O	8	1,60
Mg	12	1,60
S	16	1,85
P	15	1,90
Cl	17	1,80
Co	27	1,80

Программы AREAIMOL и SURFACE позволяют получить абсолютную доступность, то есть, число ангстрем (Å) в квадрате. Относительную доступность поверхности вычисляют по сравнению с

доступностью стандартного пептида с характерными аминокислотами  
в данном полипептиде. Стандартным пептидом является трипептид  
5 Gly-X-Gly, где X означает представляющую интерес аминокислоту, и  
данный стандартный пептид должен иметь "удлиненную" конформацию,  
то есть, конформацию, подобную бета-цепям. Такая удлиненная  
10 конформация максимизирует доступность остатка X. Вычисленную  
доступную площадь делят на доступную площадь для стандартного  
пептида в трипептиде Gly-X-Gly и получают частное, которое  
15 представляет собой относительную доступность. Процент  
доступности представляет собой относительную доступность,  
умноженную на 100.  
20

Другой репрезентативный алгоритм для вычисления доступности  
поверхности основан на SOLV-модуле программы xsae (Broger, C, F.  
25 Hoffman-LaRoche, Basel), которая позволяет вычислять  
относительную доступность аминокислотного остатка для водной  
сферы исходя из рентгенографических координат данного  
30 полипептида.

Относительную доступность поверхности для каждой  
35 аминокислоты в hu4D5Fabv7 вычисляют с использованием данных о  
его кристаллической структуре (Eigenbrot et al. (1993) J Mol  
Biol. 229:969-995). Величины относительной доступности  
40 поверхности для аминокислот легкой цепи и тяжелой цепи  
hu4D5Fabv7 представлены в таблице 1 в порядке убывания.  
45

50



## hu4D5Fabv7-легкая цепь

5	SER A	202	frac	acc=	101.236	ASP A	151	frac	acc=	41.586
	GLY A	41	frac	acc=	90.775	SER A	12	frac	acc=	40.633
	GLY A	157	frac	acc=	88.186	ASN A	210	frac	acc=	40.158
	ASP A	1	frac	acc=	87.743	SER A	63	frac	acc=	39.872
	SER A	156	frac	acc=	83.742	ARG A	66	frac	acc=	39.669
	GLY A	57	frac	acc=	81.611	PRO A	8	frac	acc=	39.297
10	SER A	168	frac	acc=	79.680	SER A	65	frac	acc=	39.219
	SER A	56	frac	acc=	79.181	SER A	77	frac	acc=	38.820
	LYS A	169	frac	acc=	77.591	THR A	180	frac	acc=	38.296
	SER A	60	frac	acc=	75.291	ASP A	185	frac	acc=	38.234
	THR A	109	frac	acc=	74.603	THR A	31	frac	acc=	38.106
	CYS A	214	frac	acc=	72.021	THR A	94	frac	acc=	37.452
15	LYS A	126	frac	acc=	71.002	THR A	93	frac	acc=	37.213
	SER A	67	frac	acc=	66.694	THR A	197	frac	acc=	36.709
	ARG A	18	frac	acc=	66.126	SER A	182	frac	acc=	36.424
	ASN A	152	frac	acc=	65.415	GLY A	128	frac	acc=	35.779
	SER A	127	frac	acc=	65.345	LYS A	207	frac	acc=	35.638
	LYS A	190	frac	acc=	65.189	ASP A	17	frac	acc=	35.413
20	LYS A	145	frac	acc=	63.342	GLY A	200	frac	acc=	35.274
	GLN A	199	frac	acc=	62.470	GLU A	165	frac	acc=	35.067
	GLU A	143	frac	acc=	61.681	ALA A	112	frac	acc=	34.912
	GLN A	3	frac	acc=	59.976	GLN A	79	frac	acc=	34.601
	LYS A	188	frac	acc=	59.680	VAL A	191	frac	acc=	33.935
	ARG A	24	frac	acc=	59.458	SER A	208	frac	acc=	33.525
25	PHE A	53	frac	acc=	58.705	LYS A	39	frac	acc=	33.446
	SER A	9	frac	acc=	58.446	GLU A	123	frac	acc=	32.486
	GLN A	27	frac	acc=	57.247	THR A	69	frac	acc=	32.276
	ALA A	153	frac	acc=	56.538	SER A	76	frac	acc=	32.108
	SER A	203	frac	acc=	55.864	HIS A	189	frac	acc=	31.984
	LYS A	42	frac	acc=	54.730	ARG A	108	frac	acc=	31.915
30	GLY A	16	frac	acc=	54.612	ASN A	158	frac	acc=	31.447
	LYS A	45	frac	acc=	54.464	VAL A	205	frac	acc=	31.305
	PRO A	204	frac	acc=	53.172	SER A	14	frac	acc=	31.094
	GLU A	213	frac	acc=	53.084	GLN A	155	frac	acc=	30.630
	ALA A	184	frac	acc=	52.556	GLU A	187	frac	acc=	30.328
	VAL A	15	frac	acc=	52.460	ARG A	211	frac	acc=	30.027
35	SER A	7	frac	acc=	51.936	LYS A	183	frac	acc=	29.751
	LEU A	154	frac	acc=	51.525	ASN A	138	frac	acc=	29.306
	GLN A	100	frac	acc=	51.195	ASP A	170	frac	acc=	29.041
	SER A	10	frac	acc=	49.907	SER A	159	frac	acc=	27.705
	THR A	5	frac	acc=	48.879	GLN A	147	frac	acc=	27.485
	THR A	206	frac	acc=	48.853	THR A	22	frac	acc=	27.121
40	ASP A	28	frac	acc=	48.758	ALA A	43	frac	acc=	26.801
	GLY A	68	frac	acc=	48.690	ARG A	142	frac	acc=	26.447
	THR A	20	frac	acc=	48.675	LEU A	54	frac	acc=	25.882
	ASP A	122	frac	acc=	47.359	ASP A	167	frac	acc=	25.785
	PRO A	80	frac	acc=	46.984	THR A	129	frac	acc=	23.880
	SER A	52	frac	acc=	46.917	ALA A	144	frac	acc=	23.652
45	SER A	26	frac	acc=	46.712	VAL A	163	frac	acc=	22.261
	TYR A	92	frac	acc=	46.218	PRO A	95	frac	acc=	20.607
	LYS A	107	frac	acc=	45.912	ALA A	111	frac	acc=	19.942
	GLU A	161	frac	acc=	45.100	LYS A	103	frac	acc=	18.647
	VAL A	110	frac	acc=	44.844	LEU A	181	frac	acc=	18.312
	GLU A	81	frac	acc=	44.578	THR A	72	frac	acc=	18.226
50	PRO A	59	frac	acc=	44.290	GLU A	195	frac	acc=	18.006
	ASN A	30	frac	acc=	42.721	THR A	178	frac	acc=	17.499
	GLN A	160	frac	acc=	42.692	THR A	85	frac	acc=	17.343

SER A 114 frac acc= 42.374  
PRO A 40 frac acc= 41.928

ASP A 70 frac acc= 17.194  
LEU A 11 frac acc= 16.568

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

PHE A 116 frac acc= 16.406  
THR A 97 frac acc= 16.204  
ARG A 61 frac acc= 16.192  
TYR A 49 frac acc= 16.076  
SER A 50 frac acc= 15.746  
LYS A 149 frac acc= 15.510  
GLU A 55 frac acc= 14.927  
LEU A 201 frac acc= 14.012  
GLY A 64 frac acc= 13.735  
GLY A 212 frac acc= 13.396  
PHE A 98 frac acc= 12.852  
THR A 74 frac acc= 12.169  
SER A 171 frac acc= 11.536  
PRO A 141 frac acc= 11.073  
PHE A 83 frac acc= 10.871  
THR A 164 frac acc= 10.325  
ALA A 32 frac acc= 9.971  
HIS A 198 frac acc= 9.958  
VAL A 146 frac acc= 9.861  
SER A 121 frac acc= 9.833  
ALA A 13 frac acc= 9.615  
GLU A 105 frac acc= 9.416  
SER A 162 frac acc= 9.304  
ILE A 117 frac acc= 8.780  
HIS A 91 frac acc= 8.557  
ALA A 193 frac acc= 8.547  
GLN A 37 frac acc= 8.442  
VAL A 58 frac acc= 8.281  
PRO A 120 frac acc= 8.095  
GLN A 38 frac acc= 6.643  
PRO A 113 frac acc= 6.594  
GLY A 101 frac acc= 6.558  
TYR A 140 frac acc= 5.894  
VAL A 115 frac acc= 5.712  
TYR A 87 frac acc= 4.539  
SER A 176 frac acc= 4.106  
ILE A 2 frac acc= 4.080  
ASN A 137 frac acc= 3.906  
TRP A 148 frac acc= 3.676  
GLY A 99 frac acc= 3.550  
PRO A 44 frac acc= 3.543  
LEU A 175 frac acc= 3.488  
VAL A 19 frac acc= 3.420  
ILE A 106 frac acc= 3.337  
PRO A 119 frac acc= 2.953  
LEU A 46 frac acc= 2.887  
GLN A 6 frac acc= 2.860  
TYR A 173 frac acc= 2.825  
VAL A 150 frac acc= 2.525  
GLN A 166 frac acc= 2.525  
THR A 172 frac acc= 2.436

LEU A 125 frac acc= 2.398  
PRO A 96 frac acc= 2.387  
LEU A 47 frac acc= 2.180  
ALA A 51 frac acc= 1.837  
PHE A 118 frac acc= 1.779  
PHE A 62 frac acc= 1.581  
ALA A 25 frac acc= 1.538  
VAL A 133 frac acc= 1.315  
ASP A 82 frac acc= 1.141  
LEU A 179 frac acc= 0.872  
GLN A 124 frac acc= 0.787  
MET A 4 frac acc= 0.778  
SER A 177 frac acc= 0.693  
SER A 131 frac acc= 0.693  
LEU A 135 frac acc= 0.654  
PHE A 71 frac acc= 0.593  
TRP A 35 frac acc= 0.448  
PHE A 209 frac acc= 0.395  
TYR A 186 frac acc= 0.259  
LEU A 78 frac acc= 0.157  
VAL A 196 frac acc= 0.000  
VAL A 132 frac acc= 0.000  
VAL A 104 frac acc= 0.000  
VAL A 33 frac acc= 0.000  
VAL A 29 frac acc= 0.000  
TYR A 192 frac acc= 0.000  
TYR A 86 frac acc= 0.000  
TYR A 36 frac acc= 0.000  
THR A 102 frac acc= 0.000  
SER A 174 frac acc= 0.000  
PHE A 139 frac acc= 0.000  
LEU A 136 frac acc= 0.000  
LEU A 73 frac acc= 0.000  
ILE A 75 frac acc= 0.000  
ILE A 48 frac acc= 0.000  
ILE A 21 frac acc= 0.000  
GLN A 90 frac acc= 0.000  
GLN A 89 frac acc= 0.000  
CYS A 194 frac acc= 0.000  
CYS A 134 frac acc= 0.000  
CYS A 88 frac acc= 0.000  
CYS A 23 frac acc= 0.000  
ALA A 130 frac acc= 0.000  
ALA A 84 frac acc= 0.000  
ALA A 34 frac acc= 0.000

## hu4D5Fabv7-тяжелая цепь

	SER B	179	frac	acc=	99.479	PRO B	14	frac	acc=	45.729
	GLY B	42	frac	acc=	95.850	THR B	54	frac	acc=	45.503
	GLU B	1	frac	acc=	87.276	THR B	200	frac	acc=	45.369
5	GLY B	66	frac	acc=	84.541	LEU B	177	frac	acc=	45.337
	ASP B	102	frac	acc=	83.794	GLY B	8	frac	acc=	44.898
	SER B	75	frac	acc=	80.567	SER B	7	frac	acc=	43.530
	GLY B	140	frac	acc=	80.344	THR B	69	frac	acc=	43.503
	ASN B	211	frac	acc=	79.588	PRO B	220	frac	acc=	43.378
	GLY B	197	frac	acc=	78.676	LYS B	208	frac	acc=	43.138
10	ASP B	62	frac	acc=	77.716	LYS B	30	frac	acc=	42.380
	GLY B	103	frac	acc=	77.176	ALA B	23	frac	acc=	41.952
	SER B	163	frac	acc=	76.664	GLU B	46	frac	acc=	41.430
	SER B	139	frac	acc=	74.946	SER B	25	frac	acc=	41.323
	LYS B	213	frac	acc=	74.442	ARG B	87	frac	acc=	41.282
	ALA B	165	frac	acc=	74.339	LYS B	124	frac	acc=	40.888
15	THR B	167	frac	acc=	73.934	ASN B	28	frac	acc=	40.529
	SER B	122	frac	acc=	72.870	GLN B	3	frac	acc=	39.824
	SER B	194	frac	acc=	71.959	THR B	123	frac	acc=	39.306
	PRO B	41	frac	acc=	71.540	SER B	63	frac	acc=	38.867
	THR B	198	frac	acc=	68.668	GLY B	56	frac	acc=	38.582
	SER B	222	frac	acc=	68.128	GLY B	169	frac	acc=	38.469
20	LYS B	43	frac	acc=	67.782	THR B	172	frac	acc=	38.421
	GLY B	26	frac	acc=	67.782	PRO B	209	frac	acc=	38.309
	THR B	138	frac	acc=	65.826	GLY B	101	frac	acc=	38.040
	ASP B	31	frac	acc=	64.222	TYR B	109	frac	acc=	36.829
	GLY B	15	frac	acc=	64.172	LYS B	221	frac	acc=	36.520
	SER B	168	frac	acc=	62.100	GLY B	44	frac	acc=	35.147
25	SER B	120	frac	acc=	61.332	GLY B	181	frac	acc=	34.735
	LYS B	76	frac	acc=	61.092	THR B	58	frac	acc=	34.457
	GLY B	141	frac	acc=	59.419	GLY B	9	frac	acc=	34.254
	SER B	137	frac	acc=	59.179	VAL B	5	frac	acc=	34.198
	TYR B	57	frac	acc=	58.916	ALA B	121	frac	acc=	33.049
	GLU B	89	frac	acc=	58.483	SER B	127	frac	acc=	32.390
30	SER B	180	frac	acc=	56.289	GLY B	10	frac	acc=	32.230
	LYS B	65	frac	acc=	55.044	SER B	71	frac	acc=	30.659
	ASP B	215	frac	acc=	54.656	ASP B	73	frac	acc=	30.245
	GLN B	13	frac	acc=	53.719	LEU B	115	frac	acc=	29.867
	GLN B	112	frac	acc=	53.215	LEU B	11	frac	acc=	29.825
	TYR B	105	frac	acc=	51.940	ASN B	84	frac	acc=	29.765
35	ALA B	88	frac	acc=	51.602	SER B	210	frac	acc=	28.656
	GLY B	164	frac	acc=	50.259	GLU B	155	frac	acc=	28.162
	PRO B	192	frac	acc=	49.826	SER B	160	frac	acc=	26.526
	THR B	158	frac	acc=	49.694	CYS B	223	frac	acc=	26.270
	THR B	142	frac	acc=	48.896	GLY B	16	frac	acc=	26.158
	ASN B	55	frac	acc=	48.344	ILE B	202	frac	acc=	26.068
40	LYS B	136	frac	acc=	48.312	GLN B	82	frac	acc=	25.836
	ARG B	19	frac	acc=	48.082	SER B	193	frac	acc=	25.550
	PRO B	156	frac	acc=	47.366	ASN B	77	frac	acc=	25.418
	PRO B	174	frac	acc=	47.157	ARG B	59	frac	acc=	25.301
	LYS B	217	frac	acc=	47.102	VAL B	93	frac	acc=	25.254
	GLN B	199	frac	acc=	46.650	THR B	74	frac	acc=	24.902
45	SER B	17	frac	acc=	45.980	GLU B	219	frac	acc=	24.778
	SER B	85	frac	acc=	45.824	ASN B	206	frac	acc=	24.647

50

	VAL B	170	frac	acc=	24.549	PRO B	154	frac	acc=	6.767
	TYR B	52	frac	acc=	24.298	PRO B	133	frac	acc=	6.767
	ALA B	175	frac	acc=	23.804	TRP B	99	frac	acc=	6.502
	LYS B	216	frac	acc=	23.277	THR B	32	frac	acc=	6.291
	VAL B	214	frac	acc=	23.150	LEU B	45	frac	acc=	4.649
5	GLY B	125	frac	acc=	22.802	VAL B	128	frac	acc=	4.515
	ASN B	162	frac	acc=	22.245	ILE B	51	frac	acc=	4.307
	ALA B	72	frac	acc=	22.166	SER B	186	frac	acc=	4.084
	ALA B	40	frac	acc=	21.974	PHE B	173	frac	acc=	3.969
	LEU B	18	frac	acc=	20.273	ARG B	38	frac	acc=	3.734
	THR B	212	frac	acc=	20.170	TRP B	47	frac	acc=	3.561
10	LEU B	182	frac	acc=	19.619	VAL B	118	frac	acc=	3.409
	TYR B	33	frac	acc=	19.398	ALA B	24	frac	acc=	3.376
	THR B	190	frac	acc=	19.365	TYR B	95	frac	acc=	3.242
	VAL B	176	frac	acc=	18.941	GLU B	6	frac	acc=	3.216
	SER B	21	frac	acc=	18.929	ALA B	144	frac	acc=	3.167
	SER B	119	frac	acc=	18.877	ILE B	70	frac	acc=	1.958
15	THR B	91	frac	acc=	18.237	GLY B	111	frac	acc=	1.868
	ASP B	151	frac	acc=	17.849	LEU B	4	frac	acc=	1.808
	THR B	114	frac	acc=	17.601	TYR B	201	frac	acc=	1.758
	SER B	134	frac	acc=	17.571	LEU B	148	frac	acc=	1.744
	LEU B	196	frac	acc=	17.090	PHE B	68	frac	acc=	1.708
	TYR B	60	frac	acc=	16.575	VAL B	188	frac	acc=	1.315
20	TYR B	183	frac	acc=	15.968	CYS B	22	frac	acc=	0.935
	VAL B	2	frac	acc=	15.901	TRP B	161	frac	acc=	0.876
	PRO B	130	frac	acc=	15.342	LEU B	131	frac	acc=	0.654
	LEU B	166	frac	acc=	15.268	VAL B	205	frac	acc=	0.495
	GLY B	100	frac	acc=	15.003	ALA B	92	frac	acc=	0.356
	PHE B	27	frac	acc=	14.383	ALA B	79	frac	acc=	0.356
25	ASN B	204	frac	acc=	13.873	VAL B	64	frac	acc=	0.263
	PHE B	104	frac	acc=	13.836	ILE B	29	frac	acc=	0.227
	TYR B	80	frac	acc=	13.490	VAL B	218	frac	acc=	0.000
	VAL B	159	frac	acc=	12.782	VAL B	189	frac	acc=	0.000
	ARG B	67	frac	acc=	12.362	VAL B	149	frac	acc=	0.000
	GLN B	178	frac	acc=	12.131	VAL B	116	frac	acc=	0.000
30	HIS B	171	frac	acc=	11.412	VAL B	48	frac	acc=	0.000
	SER B	184	frac	acc=	11.255	VAL B	37	frac	acc=	0.000
	ARG B	98	frac	acc=	11.115	TYR B	152	frac	acc=	0.000
	PRO B	53	frac	acc=	11.071	TYR B	94	frac	acc=	0.000
	GLN B	39	frac	acc=	11.037	TRP B	36	frac	acc=	0.000
	SER B	195	frac	acc=	10.909	SER B	187	frac	acc=	0.000
35	ASP B	108	frac	acc=	10.525	SER B	97	frac	acc=	0.000
	LEU B	185	frac	acc=	10.464	MET B	107	frac	acc=	0.000
	GLY B	113	frac	acc=	10.406	MET B	83	frac	acc=	0.000
	THR B	78	frac	acc=	10.213	LEU B	145	frac	acc=	0.000
	THR B	117	frac	acc=	9.990	LEU B	86	frac	acc=	0.000
	LYS B	150	frac	acc=	9.447	LEU B	81	frac	acc=	0.000
40	VAL B	157	frac	acc=	9.323	LEU B	20	frac	acc=	0.000
	VAL B	12	frac	acc=	9.207	ILE B	34	frac	acc=	0.000
	TRP B	110	frac	acc=	9.069	HIS B	207	frac	acc=	0.000
	ALA B	143	frac	acc=	8.903	HIS B	35	frac	acc=	0.000
	SER B	135	frac	acc=	8.897	GLY B	146	frac	acc=	0.000
45	PHE B	129	frac	acc=	8.895	CYS B	203	frac	acc=	0.000
	ARG B	50	frac	acc=	8.639	CYS B	147	frac	acc=	0.000
	ALA B	61	frac	acc=	8.547	CYS B	96	frac	acc=	0.000
	ALA B	132	frac	acc=	7.882	ASP B	90	frac	acc=	0.000
	VAL B	191	frac	acc=	7.366	ALA B	106	frac	acc=	0.000
	PRO B	126	frac	acc=	7.258	ALA B	49	frac	acc=	0.000
50	PHE B	153	frac	acc=	6.918					

Для идентификации остатков hu4D5Fabv8, которые могут быть

заменены остатками Cys, были применены два нижеследующих критерия:

5 1. Аминокислотные остатки, которые были полностью скрытыми, т.е., имели менее чем 10%-ную относительную доступность поверхности, удаляли. В таблице 1 представлены 134 остатка (легкой цепи) и 151 остаток (тяжелой цепи) hu4D5Fabv8, которые  
10 обладают более чем 10%-ной доступностью (относительной доступностью поверхности). Были выбраны верхние десять наиболее доступных остатков Ser, Ala и Val, поскольку, по сравнению с  
15 другими аминокислотами, они обладают наиболее близким структурным сходством с Cys и дают лишь минимальные структурные ограничения в антителе, сконструированном на основе Cys. Могут  
20 быть также скринированы и другие участки для замены цистеинами, и эти участки могут быть использованы для конъюгирования.

2. Остатки были отсортированы по их роли в функциональных и  
30 структурных взаимодействиях с Fab. Кроме того, были также выбраны остатки, которые не участвуют во взаимодействиях с антигеном и расположены на некотором расстоянии от имеющихся  
35 дисульфидных связей. Такие вновь введенные Cys-остатки должны отличаться от цистеинов, участвующих в образовании дисульфидной связи и не должны влиять на связывание с антигеном и ошибочно  
40 спариваться с цистеинами, участвующими в образовании дисульфидной связи.

45 Нижеследующие остатки hu4D5Fabv8 соответствуют вышеуказанным критериям, и остатки для их замены остатком Cys выбирают из следующих остатков: L-V15, L-A43, L-V110, L-A144,  
50 L-S168, H-A88, H-A121, H-S122, H-A175 и H-S179 (как показано на

фигуре 1).

Тиоловая реактивность может быть обобщена для любого  
 5 антитела, где замены аминокислот реакционноспособными  
 цистеиновыми остатками, которые могут быть сделаны в участках  
 легкой цепи, выбирают из L-10-L-20; L-38-L-48; L-105-L-115;  
 10 L-139-L-149; L-163-L-173; в участках тяжелой цепи – из H-35-H-  
 45; H-83-H-93; H-114-H-127 и H-170-H-184, а в участках Fc-  
 области – из H-268-H-291; H-319-H-344; H-370-H-380 и H-395-  
 15 H-405.

Тиоловая реактивность может быть также обобщена по  
 20 определенным доменам антитела, таким как константный домен  
 легкой цепи (CL) и константный домен тяжелой цепи, CH1, CH2 и  
 CH3. Цистеиновые замены, дающие величину тиоловой реактивности,  
 25 составляющую 0,6 и выше, могут быть сделаны в константных  
 доменах тяжелой цепи  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  интактных антител: IgA, IgD,  
 30 IgE, IgG и IgM, соответственно, включая IgG подклассов: IgG1,  
 IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

Как видно из данных кристаллической структуры, выбранные 10  
 35 Cys-мутантов находятся далеко от антигенсвязывающего сайта, а в  
 данном случае, на границе с HER2. Эти мутанты могут быть  
 40 экспериментально проанализированы на их непосредственное влияние  
 на функциональные взаимодействия. Тиоловая реактивность всех  
 Cys-Fab-вариантов была измерена и вычислена как описано в  
 45 примерах 1 и 2 и как показано в таблице 2. Остатки L-V15C, L-  
 V110C, H-A88C и H-A121C имеют реакционноспособные и стабильные  
 тиоловые группы (фигуры 3A и 3B). Мутанты V15C, V110C, A144C,  
 50 S168C представляют собой Cys-варианты легкой цепи. Мутанты A88C,

A121C, A175C, S179C представляют собой Cys-варианты тяжелой цепи. Было неожиданно обнаружено, что участки с высокой относительной доступностью поверхности не обладают наивысшей тиоловой реактивностью, как было установлено с помощью анализа PHESELECTOR (таблица 2). Другими словами, относительная доступность поверхности (таблицы 1, 2) не коррелирует с тиоловой реактивностью (таблица 2). Фактически, остатки Cys, введенные в сайты с умеренной доступностью поверхности, составляющей 20%-80% (фигура 4A, таблица 1), или в частично доступные сайты, такие как остатки Ala или Val, обнаруживают более высокую тиоловую реактивность, то есть,  $>0,6$  (фигура 3B, таблица 2), чем Cys, введенный в положения остатка Ser, что подтверждает необходимость применения анализа PHESELECTOR для скрининга сайтов с тиоловой реактивностью, поскольку для выбора этих сайтов недостаточно только одной информации о кристаллической структуре (фигуры 3B и 4A).

Данные о тиоловой реактивности представлены на фигурах 3A и 3B для аминокислотных остатков Cys-мутантов 4D5 тиро-*Fab*: (3A) небиотинилированного (контроль) и (3B) биотинилированного фага тиро-*Fab*. Реакционноспособные тиоловые группы на поверхности антитела/*Fab* были идентифицированы с помощью анализа PHESELECTOR на взаимодействие небиотинилированного фага hu4D5Fabv8 (3A) и биотинилированного hu4D5Fabv8-фага (3B) с BSA (незаштрихованные столбцы), с HER2 (серые столбцы) или со стрептавидином (черные столбцы). Этот анализ проводили, как описано в примере 2. На левой стороне показаны варианты легкой цепи, а на правой стороне показаны варианты тяжелой цепи. Как и ожидалось, связывающая

способность небиотинилированных Cys-мутантов тиро-Fab 4D5 была  
низкой, а способность связывания с HER2 оставалась высокой.  
5 Отношение связывания биотинилированных Cys-мутантов тиро-Fab 4D5  
со стрептавидином и с HER2 дает величины тиоловой реактивности,  
представленные в таблице 2. Фоновая оптическая плотность при 450  
10 нм или незначительные уровни неспецифического связывания белка  
биотинилированных Cys-мутантов тиро-Fab 4D5 с BSA также  
15 представлены на фигуре 3В. Величины относительной доступности  
поверхности выбранных аминокислотных остатков, которые были  
заменены остатками Cys, приводятся на фигуре 4А. Относительная  
20 доступность поверхности была вычислена исходя из известной  
структуры hu4D5Fabv7 и представлена в таблице 1 (Eigenbrot et  
al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995). Конформационные параметры  
25 структур hu4D5Fabv7 и hu4D5Fabv8 имеют высокую степень сходства  
и позволяют определять любую корреляцию между вычисленными  
данными относительной доступности поверхности для hu4D5Fabv7 и  
30 данными тиоловой реактивности цистеиновых мутантов hu4D5Fabv8.  
Измеренная тиоловая реактивность остатков Cys тиро-Fab-фага,  
35 вводимых в положения частично доступных остатков (Ala или Val),  
превышала тиоловую реактивность остатков, вводимых в положения  
остатков Ser (таблица 2). Из данных таблицы 2, представленных  
40 для Cys-мутантов тиро-Fab, можно видеть, что корреляция между  
величинами тиоловой реактивности и величинами относительной  
45 доступности поверхности либо является незначительной, либо  
вообще отсутствует.

50 Аминокислоты в положениях L-15, L-43, L-110, L-144, L-168,  
H-40, H-88, H-119, H-121, H-122, H-175 и H-179 антитела могут



быть, в основном, заменены (мутированы) свободными цистеиновыми  
 аминокислотными остатками. Примерно 5 аминокислотных остатков с  
 5 каждой стороны от этих положений могут быть также заменены  
 свободными цистеинами, то есть, в пределах L-10-L-20; L-38-L-48;  
 L-105-L-115; L-139-L-149; L-163-L-173; H-35-H-45; H-83-H-93;  
 10 H-114-H-127 и H-170-H-184, а в Fc-области, в пределах, выбранных  
 из H-268-H-291; H-319-H-344; H-370-H-380 и H-395-H-405, в  
 результате чего могут быть получены сконструированные на основе  
 15 цистеина антитела согласно изобретению.

Таблица 2

## Тиоловая реактивность фага тио-Fab

Конструкция фаг-тио- Fab	Тиоловая реактивность*	Относительная доступность поверхности (%) (из таблицы 1)
hu4D5Fabv8 дикого типа	0,125	-
L-V15C	0,934	52,46
L-A43C	0,385	26,80
L-V110C	0,850	44,84
L-A144C	0,373	23,65
L-S168C	0,514	79,68
H-A40C	0,450	21,97
H-A88C	0,914	51,60
H-S119C	0,680	18,88
H-A121C	0,925	33,05
H-S122C	0,720	72,87
H-A175C	0,19	23,80

H-S179C	0,446	99,48
---------	-------	-------

L=легкая цепь, H=тяжелая цепь, A=аланин, S=серин, V=валин,  
C=цистеин.

\*Тиоловую реактивность измеряют как отношение OD<sub>450nm</sub> для связывания со стрептавидином к OD<sub>450nm</sub> для связывания с HER2 (антитело) (пример 2). Величина тиоловой реактивности, равная 1, означает полное биотинилирование тиола цистеина.

Для дальнейшего анализа были выбраны два Cys-варианта, происходящие от легкой цепи (L-V15C и L-V110C) и два варианта, происходящие от тяжелой цепи (H-A88C и H-A121C), поскольку эти варианты обладают наиболее высокой тиоловой реактивностью (таблица 2).

В отличие от процедуры очистки фага, для получения Fab может потребоваться 2-3 дня, в зависимости от масштаба продуцирования. За это время, тиоловые группы могут терять свою реакционную способность, что обусловлено окислением. Для подтверждения стабильности тиоловых групп на hu4D5Fabv8-фаге была измерена стабильность тиоловой реактивности фаг-тио-Fab (фигура 4B). После очистки тио-Fab-фага, на дни 1, 2 и 4, все образцы конъюгировали с биотин-PEO-малеимидом и зондировали с помощью ELISA фага (PHESELECTOR) для анализа на связывание с HER2 и со стрептавидином. L-V15C-, L-V110C-, H-A88C- и H-A121C- варианты по сравнению с другими тио-Fab-вариантами, имели значимые уровни тиоловой реактивности (фигура 4B).

#### **Меченые антитела, сконструированные на основе цистеина**

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно

изобретению могут быть конъюгированы с любой молекулой-меткой, которая может быть ковалентно присоединена к антителу через  
5 реакционноспособную тиоловую группу цистеина (Singh et al. (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor  
10 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 обладать следующими функциями: а именно, она способна (i) передавать детектируемый  
15 сигнал; (ii) взаимодействовать со второй меткой для модификации детектируемого сигнала, подаваемого первой или второй меткой, например, посредством FRET (переноса резонансной энергии  
20 флуоресценции); (iii) стабилизировать взаимодействие или повышать аффинность связывания с антигеном или лигандом; (iv) влиять на подвижность, например, электрофоретическую  
25 подвижность, или клеточную проницаемость, под действием заряда, гидрофобности, формы или других физических параметров; или (v) обеспечивать захват молекулы для модуляции аффинности к лиганду,  
30 связывания антитела с антигеном или образования ионных комплексов.

40 Меченые антитела, сконструированные на основе цистеина, могут быть использованы в диагностических анализах, например, для детекции экспрессии представляющего интерес антигена в  
45 конкретных клетках, тканях или в сыворотке. Для применения в диагностических целях, указанное антитело обычно метят детектируемой молекулой. Существуют различные метки, которые  
50 могут быть, по существу, подразделены на группы по следующим

категориям:

(а) радиоизотопы (радионуклиды), такие как  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  
 $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  
 $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  или  $^{213}\text{Bi}$ . Меченные радиоизотопами антитела  
 могут быть использованы в экспериментах по визуализации  
 рецепторов-мишеней. Антитело может быть помечено реагентами-  
 лигандами, которые связываются, либо образуют хелатный комплекс  
 или какой-либо другой комплекс с металлом-радиоизотопом, где  
 указанный реагент способен реагировать с тиолом цистеинов,  
 введенных в указанное антитело, в соответствии с методами,  
 описанными в *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2,  
 Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs.  
 (1991). Хелатообразующими лигандами, которые могут образовывать  
 комплекс с ионами металла, являются DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и  
 TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Радионуклиды могут быть  
 присоединены посредством образования комплекса с конъюгатами  
 "антитело-лекарственное средство" согласно изобретению (Wu et  
 al. (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137-1146).

Хелатные комплексы с металлом, подходящие для мечения  
 антитела в экспериментах по визуализации, описаны в патентах США  
 5342606; 5428155; 5316757; 5480990; 5462725; 5428139; 5385893;  
 5739294; 5750660; 5834456; и в публикациях 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.* [0378] 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.

(b) Флуоресцентные метки, такие как хелаты, образованные редкоземельными металлами (хелаты, образованные европием), флуоресцеины нескольких типов, включая ФИТЦ, 5-карбоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин; родамины нескольких типов, включая TAMRA; данзил; лиссамин; цианины; фикоэритрины; техасский красный и их аналоги. Флуоресцентные метки могут быть конъюгированы с антителами методами, описанными, например, в руководстве *Current Protocols in Immunology*, см. выше. Флуоресцентными красителями и флуоресцентными реагентами-метками являются коммерчески доступные реагенты, поставляемые фирмами Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) и Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

(c) Различные метки "фермент-субстрат", которые являются

доступными или описаны в литературе (в патенте США 4275149). Фермент обычно катализирует химическое превращение хромогенного субстрата, которое может быть измерено различными методами. Так, например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое может быть измерено спектрофотометрическим методом. Альтернативно, фермент может изменять интенсивность флуоресценции или хемилюминесценции субстрата. Методы количественной оценки изменения интенсивности флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат подвергается электронному возбуждению под действием химической реакции, после чего он может излучать свет, который может быть затем измерен (например, на хемилюминометре), или сообщать энергию флуоресцентному акцептору. Примерами ферментативных меток являются люциферазы (например, люцифераза светляка и бактериальная люцифераза; патент США 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малат-дегидрогеназа, уреаза, пероксидаза, такая как пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ),  $\beta$ -галактозидаза, глюкоамилаза, лизозим, сахарид-оксидазы (например, глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантин-оксидаза), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методы конъюгирования ферментов с антителами описаны в публикациях 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.

Примерами комбинаций "фермент-субстрат" являются, например:

(i) Пероксидаза хрена (ПХ) с ее субстратом пероксидом водорода, где указанный пероксид водорода окисляет краситель-предшественник (например, ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB));

(ii) щелочная фосфатаза (ЩФ) с ее хромогенным субстратом пара-нитрофенилфосфатом; и

(iii)  $\beta$ -D-галактозидаза ( $\beta$ -D-Gal) с ее хромогенным субстратом (например, п-нитрофенил- $\beta$ -D-галактозидазой) или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-галактозидазой.

Специалистам известны и различные другие комбинации "фермент-субстрат". Общее их описание можно найти в патентах США 4275149 и 4318980.

Метка может быть непосредственно конъюгирована с антителом, сконструированным на основе цистенина. Так, например, антитело может быть конъюгировано с биотином, а любая из меток трех вышеуказанных широких категорий может быть конъюгирована с авидином или со стрептавидином, или наоборот. Биотин селективно связывается со стрептавидином, и таким образом, данная метка может быть опосредованно конъюгирована с антителом. Альтернативно, для осуществления непрямого конъюгирования метки с полипептидным вариантом, такой полипептидный вариант конъюгируют с небольшим гаптенем (например, диоксином), а одну из меток вышеупомянутых различных типов конъюгируют с антигаптенным полипептидным вариантом (например, с антителом против диоксина). Таким образом, может быть достигнуто опосредованное конъюгирование метки с полипептидным вариантом

(Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

5 Полипептидный вариант согласно изобретению может быть использован в любом известном аналитическом методе, таком как ELISA, в анализах на конкурентное связывание, в прямых и  
10 непрямах "сэндвич"-анализах и в анализах, проводимых путем иммунопреципитации (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

15 Детектируемая метка может быть использована для определения локализации, для визуализации и количественной оценки события связывания или распознавания. Меченые антитела согласно изобретению могут распознавать рецепторы клеточной поверхности. Другим применением детектируемо меченных антител является метод  
25 иммунной иммобилизации на сферах, включающий конъюгирование сферы с флуоресцентно меченным антителом и детекцию флуоресцентного сигнала после связывания с лигандом. В  
30 аналогичных методах детекции связывания, для измерения и детекции взаимодействий антитела с антигеном применяется эффект  
35 поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Детектируемые метки, такие как флуоресцентные красители и хемилюминесцентные красители (Briggs et al. (1997) "Synthesis of  
40 Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc, Perkin-Trans. 1:1051-1058), дают детектируемый сигнал и обычно используются для мечения антител,  
45 предпочтительно, обладающих нижеследующими свойствами, а именно, (i) меченое антитело должно продуцировать сигнал очень высокой  
50 интенсивности при низком фоновом сигнале, так, чтобы небольшие



количества антител могли быть детектированы высокочувствительным методом в бесклеточном или клеточном анализе; и (ii) меченое  
5 антитело должно быть фотостабильным, так, чтобы флуоресцентный сигнал мог детектироваться, наблюдаться и регистрироваться без применения значительного уровня оптического отбеливания. В  
10 методах, в которых применяется связывание меченого антитела с клеточными мембранами или с клеточными поверхностями, особенно "живых" клеток, данные метки, предпочтительно, (iii) должны  
15 иметь хорошую растворимость в воде, что позволяет достичь эффективную концентрацию конъюгата и высокую чувствительность детекции, и (iv) должны быть нетоксичными по отношению к "живым"  
20 клеткам во избежание нарушения нормальных метаболических процессов в клетках или преждевременной гибели клеток.

25 Прямая количественная оценка интенсивности флуоресценции клеток и подсчет событий флуоресцентного мечения, например, событий связывания конъюгатов "пептид-краситель" с клеточной  
30 поверхностью, могут быть осуществлены на системе FMAT® 8100 HTS System (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), которая  
35 позволяет проводить автоматическое смешивание и считывание, и нерадиоактивные анализы на "живых" клетках или на сферах (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high  
40 throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204).  
45 Применение меченых антител также предусматривает проведение анализов на связывание с рецептором клеточной поверхности, анализов с иммунной иммобилизацией, флуоресцентных твердофазных  
50 анализов (FLISA), анализа путем 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), анализа на апоптоз (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 анализа на цитотоксичность. Метод люминесцентного анализа на уровне микрообъемов может быть применен для идентификации позитивной или негативной регуляции под действием молекулы, доставленной на клеточную поверхность (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51).

Меченые и сконструированные на основе цистеина антитела согласно изобретению могут быть использованы в качестве визуализирующих биологических маркеров и зондов в различных методах и технологиях биомедицины и молекулярной визуализации, таких как (i) MRI (визуализация методом магнитного резонанса); (ii) MicroCT (компьютерная томография); (iii) SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); (iv) PET (позитронная эмиссионная томография) Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v) биолюминесценция; (vi) флуоресценция; и (vii) ультразвуковое обследование. Иммуносцинтиграфия представляет собой способ визуализации, в котором антитела, меченные радиоактивными веществами, вводят животному или человеку, и по изображению определяют место локализации антитела в организме животного или человека (патент

США 6528624). Визуализирующие биомаркеры могут быть объективно измерены и оценены как показатель нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое лечение. Биологическими маркерами могут быть маркеры несколько типов: маркеры типа 0 представляют собой природные давно известные маркеры данного заболевания и линейно коррелируют с известными клиническими показателями, например, оценкой воспаления синовия при ревматоидном артрите, проводимой методом ЯМР-томографии; маркеры типа I, которые позволяют детектировать эффект терапевтического лечения в соответствии с действующим механизмом, даже если этот механизм не может быть ассоциирован с клиническим результатом; маркеры типа II, которые действуют как "суррогатные" конечные точки, где изменения в биомаркере или изменения сигнала, поступающего от биомаркера, позволяют предсказывать благоприятный клинический эффект для подтверждения целевого ответа, такого как эрозия кости при ревматоидном артрите, измеренная с помощью компьютерной томографии (КТ). Таким образом, с помощью визуализирующих биомаркеров могут быть получены фармакодинамические (ФД) терапевтические данные, относящиеся (i) к экспрессии белка-мишени, (ii) к связыванию терапевтического средства с белком-мишенью, то есть, к селективности, и (iii) к клиренсу и времени полужизни; а также фармакокинетические данные. Преимуществами *in vivo* визуализирующих биомаркеров по сравнению с лабораторными (*in vitro*) биологическими маркерами, являются: возможность их применения для осуществления неинвазивной обработки, возможность их количественной оценки и применения для обследования всего

организма, возможность многократного введения доз и проведения  
 анализов, то есть, в различные моменты времени, и возможность  
 5 применения результатов, полученных в преклинических  
 исследованиях (для мелких животных), для проведения клинических  
 исследований (для человека). В некоторых случаях, биологическая  
 10 визуализация позволяет не проводить ряд экспериментов или свести  
 до минимума количество экспериментов на животных в  
 15 преклинических исследованиях.

Визуализирующими радионуклидными метками являются такие  
 радионуклиды, как  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  
 20  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  или  $^{213}\text{Bi}$ . Ион  
 металла радионуклида может образовывать комплекс с  
 25 хелатообразующим линкером, таким как DOTA. Линкерные реагенты,  
 такие как DOTA-малеимид (4-малеимидобутирамидобензил-DOTA),  
 могут быть получены посредством реакции взаимодействия  
 30 аминокбензил-DOTA с 4-малеимидомасляной кислотой (Fluka),  
 активированной изопропилхлорформиаом (Aldrich), в соответствии  
 с процедурой, описанной Axworthy et al. (2000) Proc. Natl. Acad.  
 35 Sci. USA 97(4):1802-1807). DOTA-малеимидные реагенты реагируют  
 со свободными цистеиновыми аминокислотными остатками  
 40 сконструированных на основе цистеина антител и способствуют  
 образованию комплекса металл-лиганд на указанном антителе (Lewis  
 et al. (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Реагенты для мечения  
 45 хелатообразующего линкера, такие как DOTA-NHS (моно-N-гидрокси-  
 сукцинимидоэфир 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-  
 50 тетрауксусной кислоты), являются коммерчески доступными  
 (Macrocyclics, Dallas, TX). Визуализация рецептора-мишени

меченными радионуклидом антителами позволяет идентифицировать активацию пути посредством детекции и количественной оценки прогрессирующей аккумуляции антител в опухолевой ткани (Albert et al. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Конъюгированные радиоактивные металлы могут оставаться внутри клеток после деградации лизосом.

Методы пептидного мечения являются хорошо известными. 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 DeGryter, 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, меченные двумя молекулами, флуоресцентным репортером и гасителем, находящимися в непосредственной близости друг от друга, участвуют в переносе резонансной энергии

флуоресценции (FRET). Репортерные группы обычно представляют собой флуоресцентные красители, которые возбуждаются под действием света на определенных длинах волн и переносят энергию на акцептор или гаситель, то есть, на группу с соответствующим стоксовым сдвигом, обеспечивающую излучение с максимальной яркостью. Флуоресцентными красителями являются молекулы с более явно выраженной ароматичностью, такие как флуоресцеин и родамин и их производные. Флуоресцентный репортер может быть частично или в значительной степени погашен молекулой-гасителем в интактном пептиде. После расщепления пептида пептидазой или протеазой может наблюдаться детектируемое увеличение интенсивности флуоресценции (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34).

Меченые антитела согласно изобретению могут быть также использованы в качестве средства для аффинной очистки. В этом способе, меченое антитело иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола сефадекс или фильтровальная бумага, методами, хорошо известными специалистам. Иммобилизованное антитело подвергают контакту с образцом, содержащим очищаемый антиген, а затем носитель промывают подходящим растворителем для удаления почти всего материала в образце, за исключением очищаемого антигена, и присоединяют к иммобилизованному полипептидному варианту. И наконец, носитель промывают другим подходящим растворителем, таким как глициновый буфер, pH 5,0, который высвобождает антиген из полипептидного варианта.

Реагенты для мечения обычно имеют реакционноспособные

функциональные группы, которые могут реагировать (i) непосредственно с тиолом цистеина антитела, сконструированного на основе цистеина, с образованием меченого антитела, (ii) с линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения "линкер-метка" или (iii) с линкерным антителом с образованием меченого антитела. Реакционноспособными функциональными группами реагентов для мечения являются малеимид, гелогенацетил, иодацетамидосукцинимидиловый эфир (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиоцианат, сульфонилхлорид, 2,6-дихлортриазинил, пентафторфениловый эфир и фосфорамидит, хотя могут быть также использованы и другие функциональные группы.

Репрезентативной реакционноспособной функциональной группой является N-гидроксисукцинимидоэфир (NHS), в котором карбоксигруппа замещена детектируемой меткой, например, биотином или флуоресцентным красителем. NHS-эфир указанной метки может быть предварительно получен, выделен, очищен и/или охарактеризован, либо он может быть образован *in situ* и подвергнут реакции с нуклеофильной группой антитела. Обычно, карбоксильную форму метки активируют посредством реакции взаимодействия с определенной комбинацией карбодиимидных реагентов, например, с дициклогексилкарбодиимидом, диизопропилкарбодиимидом, или ураниевым реагентом, например, TSTU (тетрафторборатом O-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилурония, HBTU (гексафторфосфата O-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония) или HATU (гексафторфосфатом O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония); и с активатором, таким как 1-гидроксибензотриазол (HOBt), и N-

гидроксисукцинимид, с получением NHS-эфира метки. В некоторых случаях, метка и антитело могут быть связаны посредством *in situ* активации метки и взаимодействия с антителом с получением конъюгата "метка-антитело" в одну стадию. Другими активирующими и связывающими реагентами являются TBUT (гексафторфосфат 2-(1H-бензотриазо-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония), TFFH (2-фторгексафторфосфат N,N',N'',N'''-тетраметилурония), PyBOP (гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфония), EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин), DCC (дициклогексилкарбодиимид); DIPCDI (диизопропилкарбодиимид), MSNT (1-(мезитилен-2-сульфонил)-3-нитро-1H-1,2,4-триазол и арилсульфонилгалогениды, например, триизопропилбензолсульфонилхлорид.

#### КОНЬЮГИРОВАНИЕ БИОТИН-МАЛЕИМИДА С ТИО-FAB

Вышеописанные свойства тию-Fab подтверждали в присутствии фага, поскольку присоединение Fab к белку оболочки фага может изменять доступность или реактивность тиола Cys. Поэтому, конструкции тию-Fab клонировали в экспрессионный вектор под контролем промотора щелочной фосфатазы (Chang et al. (1987) Gene 55:189-196), и экспрессию тию-Fab индуцировали путем культивирования клеток *E.coli* в среде, не содержащей фосфата. Тию-Fab очищали на колонке с G-белком-сефарозой<sup>TM</sup> и анализировали с помощью электрофореза в восстанавливающем и невосстанавливающем ПААГ с ДСН. Эти анализы позволяют определить, сохраняют ли тию-Fab свою реакционноспособную тиоловую группу, либо они становятся неактивными в результате образования внутримолекулярных или межмолекулярных дисульфидных



связей. Тио-Fab L-V15C, L-V110C, H-A88C и H-A121C были  
экспрессированы и очищены с помощью хроматографии на колонке с  
5 G-белком-сефарозой<sup>TM</sup> (подробное описание см. в разделе "Методы").  
Очищенные белки анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ  
в восстанавливающих (с ДТТ) и в невосстанавливающих (без ДТТ)  
10 условиях. В теле, для отщепления межцепьевых дисульфидных групп  
могут быть использованы и другие восстановители, такие как ВМЕ  
(бета-меркаптоэтанол). Из анализа, проводимого с помощью  
15 электрофореза в ДСН-ПААГ, очевидно, что основная (~90%) фракция  
тио-Fab присутствует в мономерной форме, а hu4D5Fabv8 дикого  
типа присутствует, главным образом, в мономерной форме (47 кДа).

Тио-Fab (A121C) и hu4D5Fabv8 дикого типа инкубировали со  
100-кратным избытком биотин-малеимида в течение 3 часов при  
25 комнатной температуре, и биотинилированные Fab загружали на  
гель-фильтрационную колонку с Superdex-200<sup>TM</sup>. Эта стадия очистки  
30 может быть проведена для отделения мономерного Fab от  
олигомерного Fab, а также от избыточного свободного биотин-  
малеимида (или свободного цитотоксического лекарственного  
35 средства).

На фигуре 5 проиллюстрировано подтверждение свойств тио-  
40 Fab-вариантов в отсутствии фагового окружения. Белки, которые не  
были гибридизованы с фагом, hu4D5Fabv8 и hu4D5Fabv8-A121C (тио-  
Fab-A121C), экспрессировали и очищали с использованием сфер с G-  
45 белком-агарозой, а затем инкубированы со 100-кратным молярным  
избытком биотин-малеимида. Затем сравнивали связывание  
стрептавидина и HER2 с биотинилированным и сконструированным на  
50 основе Cys-тио-Fab с небитинилированным Fab дикого типа. После

этого, с помощью ELISA-анализа проводили мониторинг степени конъюгирования биотина (взаимодействия со стрептавидином) и его способности связываться с HER2. Каждый Fab тестировали при 2 нг и 20 нг.

Биотинилированный тио-Fab A121C сохранял способность связываться с HER2, в основном, сравнимую с соответствующей связывающей способностью hu4D5Fabv8 дикого типа (Фигура 5). Fab дикого типа и A121C-тио-Fab очищали с помощью гель-фильтрационной колоночной хроматографии. Два образца тестировали на связывание с HER2 и со стрептавидином посредством ELISA с использованием козьего анти-Fab антитела, конъюгированного с ПХ, в качестве "второго антитела". Образец дикого типа (незаштрихованные столбцы) и тио-Fab (столбцы с точечной штриховкой) обнаруживали аналогичную способность связываться с HER2, но только тио-Fab сохранял свою способность связываться со стрептавидином. В случае небитинилированного hu4D5Fabv8 дикого типа наблюдался лишь фоновый уровень взаимодействия со стрептавидином (Фигура 5). Масс-спектральный анализ (LC-ESI-MS) биотинилированного тио-Fab (A121C) давал главный пик с 48294,5 Дальтон, в отличие от hu4D5Fabv8 дикого типа, который давал пик с 47737 Дальтон. Разница между двумя молекулами в 537,5 Дальтон точно соответствует одному биотин-малеимиду, конъюгированному с тио-Fab. Секвенирование белка с помощью масс-спектропии (масс-спектральный двойной анализ LC-ESI) еще раз подтвердил, что конъюгированная молекула биотина была присоединена в положении только что введенного остатка Cys (таблица 4, пример 3).

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЕ КОНЪЮГИРОВАНИЕ БИОТИН-МАЛЕИМИДА С  
АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ПЕПТИДОМ (ABP) -ТИО-FAb

5 Связывание белка плазмы может быть эффективным средством  
улучшения фармакокинетических свойств короткоживущих молекул.  
Альбумин является самым распространенным белком в плазме.  
10 Пептиды, связывающиеся с альбумином сыворотки, (ABP) могут  
изменять фармакодинамику гибридных белков, содержащих активные  
15 домены, например, изменять поглощающую способность ткани, ее  
проницаемость и диффузию. Эти фармакодинамические параметры  
могут быть модулированы путем специфического отбора  
20 соответствующей последовательности пептида, связывающегося с  
альбумином сыворотки (заявка патент США 2004/0001827). Ряд  
альбумин-связывающих пептидов был идентифицирован посредством  
25 скрининга методом фагового представления (Dennis et al. (2002)  
"Albumin Binding As A General Strategy For Improving The  
30 Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO  
01/45746). Соединения согласно изобретению включают ABP-  
последовательности, описанные в работах (i) Dennis et al. (2002)  
35 J Biol Chem. 277:35035-35043, таблицы III и IV, стр. 35038; (ii)  
в заявке на патент США 20040001827, SEQ ID NOS: 9-22; и (iii) WO  
01/45746, стр. 12-13, SEQ ID NOS: z1-z14, которые вводятся в  
40 настоящее описание посредством ссылки.

Альбумин-связывающие (ABP)-Fab были сконструированы путем  
45 присоединения альбумин-связывающего пептида к С-концу тяжелой  
цепи Fab в стехиометрическом отношении 1:1 (1 ABP/1 Fab). Было  
показано, что связывание этих ABP-Fab с альбумином увеличивает  
50 их время полужизни у кроликов и мышей более чем в 25 раз.

Поэтому, вышеописанные реакционноспособные остатки Cys могут быть введены в эти ABP-Fab и использованы для сайт-специфического конъюгирования с цитотоксическими лекарственными средствами с последующим проведением исследований на животных *in vivo*. На фигуре 9 графически проиллюстрирован конъюгат, “(альбумин-связывающий пептид-Fab)-гибрид (ABP-Fab)-линкер-лекарственное средство”.

Репрезентативными последовательностями альбумин-связывающего пептида являются, но не ограничиваются ими, аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-5:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:1
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:2
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:3
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO:4
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO:5

Последовательности альбумин-связывающего пептида (ABP) связываются с альбумином животных многих видов (мышей, крыс, кроликов, коров, макак-резусов, павианов и человека) с  $K_d$  (кролика)=0,3 мкМ. Альбумин-связывающий пептид не конкурирует с лигандами, которые, как известно, связываются с альбумином, и имеют время полужизни ( $T_{1/2}$ ), например, у кроликов, равное 2,3 ч. Белки ABP-тио-Fab очищали на BSA-сефарозе<sup>™</sup>, а затем конъюгировали с биотин-малеимидом и очищали с помощью хроматографии на колонке с Superdex-S200 как описано в предыдущих разделах. Очищенные биотинилированные белки были гомогенными и не содержали каких-либо олигомерных форм (пример

4) .

На фигуре 6 проиллюстрированы свойства вариантов "альбумин-  
 5 связывающий пептид (ABP)-тио-Fab". Для оценки способности ABP-  
 hu4D5Fabv8 дикого типа, ABP-hu4D5Fabv8-V110C и ABP-hu4D5Fabv8-  
 A121C связываться с кроличьим альбумином, стрептавидином и HER2  
 10 проводили ELISA-анализы. Биотинилированные ABP-тио-Fab обладают  
 способностью связываться с альбумином и HER2 с аффинностью,  
 15 аналогичной аффинности связывания ABP-hu4D5Fabv8 дикого типа,  
 как было подтверждено в ELISA-анализе (фигура 6) и в  
 кинетическом анализе на связывание BIAcore (таблица 3). ELISA-  
 20 планшет покрывали альбумином, HER2 и SA как описано выше.  
 Связывание биотинилированных ABP-тио-Fab с альбумином, HER2 и SA  
 зондировали с использованием ПХ-конъюгированного анти-Fab  
 25 антитела. Биотинилированные ABP-тио-Fab, по сравнению с с  
 небитинилированным контрольным ABP-hu4D5Fabv8 дикого типа,  
 30 обладали способностью связываться со стрептавидином, что  
 указывает на то, что ABP-тио-Fab, подобно тио-Fab, были сайт-  
 специфически конъюгированы с биотин-малеимидом, поскольку в  
 35 обоих вариантах были использованы те же самые Cys-мутанты  
 (фигура 6).

Таблица 3

Кинетический анализ BIAcore на связывание HER2 и кроличьего  
 40 альбумина с биотинилированным ABP-hu4D5Fabv8 дикого типа и тио-  
 45 Fab

Антитело	$k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ (нМ)
Связывание с HER2			

дикого типа	$4,57 \times 10^5$	$4,19 \times 10^{-5}$	0,0917
V110C	$4,18 \times 10^5$	$4,05 \times 10^{-5}$	0,097
A121C	$3,91 \times 10^5$	$4,15 \times 10^{-5}$	0,106
Связывание с кроличьим альбумином			
дикого типа	$1,66 \times 10^5$	0,0206	124
V110C	$2,43 \times 10^5$	0,0331	136
A121C	$1,70 \times 10^5$	0,0238	140

ABP=альбумин-связывающий пептид

Альтернативно, альбумин-связывающий пептид может быть присоединен к антителу посредством ковалентного связывания через линкерную группу.

#### КОНСТРУИРОВАНИЕ АВР-ТИО-ФАВ С ДВУМЯ СВОБОДНЫМИ ТИОЛОВЫМИ ГРУППАМИ НА ОДИН ФАВ

Вышеуказанные результаты показали, что все четыре (L-V15C, L-V110C, H-A88C и H-A121C) варианта тио-Fab (Fab-антител, сконструированных на основе цистеина) имеют реакционноспособные тиоловые группы, которые могут быть использованы для сайт-специфического конъюгирования с реагентом-меткой, линкерным реагентом или с промежуточным соединением "лекарственное средство-линкер". L-V15C может быть экспрессирован и очищен, но с относительно низким выходом. Однако, такая экспрессия и очистка дает выход вариантов L-V110C, H-A88C и H-A121C, аналогичный выходу hu4D5Fabv8. Поэтому, эти мутанты могут быть использованы для последующего анализа, и подвергнуты

рекомбинации с получением более чем одной тиоловой группы на Fab. Для этой цели была введена одна тиоловая группа в легкую  
5 цепь и одна тиоловая группа в тяжелую цепь с получением двух  
тиоловых групп на молекулу Fab (L-V110C/H-A88C и L-V110C/H-A121C). Эти два двойных Cys-варианта экспрессировали в  
10 экспрессионной системе *E.coli* и очищали. Было обнаружено, что  
гомогенность очищенных биотинилированных ABP-тио-Fab аналогична  
гомогенности вариантов с одним Cys.

15 Были исследованы эффекты конструирования двух  
реакционноспособных остатков Cys на Fab (фигура 7). Присутствие  
20 второго биотина тестировали путем зондирования связывания  
биотинилированного ABP-тио-Fab с SA с использованием  
стрептавидина-ПХ (фигура 7). Для анализа HER2/Fab, ELISA-планшет  
25 покрывали HER2 и зондировали с использованием ПХ-  
конъюгированного анти-Fab антитела. Для анализа SA/Fab, ELISA-  
30 планшет покрывали SA и зондировали с использованием ПХ-  
конъюгированного анти-Fab антитела. Для анализа SA/SA, ELISA-  
планшет покрывали SA и зондировали с использованием SA-ПХ  
35 (фигура 7). ELISA-анализы на взаимодействие биотинилированных  
Cys-вариантов ABP-hu4D5Fabv8 с HER2, стрептавидином (SA),  
HER2/Fab, SA/Fab и SA/SA указывают на то, что такие  
40 взаимодействия регулируются ПХ-конъюгированным анти-Fab  
антителом и SA-ПХ, соответственно. Присутствие одного биотина на  
45 Fab подтверждалось с помощью SA/Fab, а более чем один биотин на  
Fab наблюдался в SA/SA-анализе. Связывание HER2 с двойными Cys-  
мутантами аналогично связыванию вариантов с одним Cys (фигура  
50 7). Однако, уровень биотинилирования двойных Cys-мутантов был

выше, чем у вариантов с одним Cys, что обусловлено присутствием  
 более, чем одной свободной тиоловой группы на молекулу Fab  
 5 (фигура 7).

### КОНСТРУИРОВАНИЕ ТИО-IgG-ВАРИАНТОВ ТРАСТУЗУМАБА

Цистеин ввели в полноразмерное моноклональное антитело,  
 10 трастузумаб (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech Inc.) в определенные положения  
 остатков. Мутанты с одним Cys, H-A88C, H-A121C и L-V110C  
 15 трастузумаба, и двойные Cys-мутанты V110C-A121C и V110C-A121C  
 трастузумаба экспрессировали в клетках CHO (яичника китайского  
 хомячка) путем временной ферментации в среде, содержащей 1 мМ  
 20 цистеин. Последовательность тяжелой цепи A88C-мутанта (450  
 аминокислот) представлена SEQ ID NO:6. Последовательность  
 тяжелой цепи A121C-мутанта (450 аминокислот) представлена в SEQ  
 25 ID NO:7. Последовательность легкой цепи V110C-мутанта (214  
 аминокислот) представлена в SEQ ID NO:8.

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRCEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 35 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS  
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 45 GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 50 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:7



DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
 RFSGSRSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT  
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:8

В соответствии с одним из вариантов изобретения,  
 сконструированные на основе цистеина антитела "тио-трастузумаб"  
 содержат одну или несколько из следующих последовательностей  
 переменных областей тяжелой цепи, имеющих свободную  
 аминокислоту цистеин (SEQ ID NOS: 9-16).

Мутант	Последовательность	SEQ ID NO:
A40C	WVRQCPGKGL	SEQ ID NO:9
A88C	NSLRCEDTAV	SEQ ID NO:10
S119C	LTVCSASTKGPS	SEQ ID NO:11
S120C	LTVSCASTKGPS	SEQ ID NO:12
A121C	LTVSSCSTKGPS	SEQ ID NO:13
S122C	LTVSSACTKGPS	SEQ ID NO:14
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO:15
S179C	HTFPAVLQCSGLYS	SEQ ID NO:16

В соответствии с другим вариантом изобретения,  
 сконструированные на основе цистеина антитела "тио-трастузумаб"  
 содержат одну или несколько из следующих последовательностей  
 переменных областей легкой цепи, имеющих свободную  
 аминокислоту цистеин (SEQ ID NOS: 17-27).

Мутант	Последовательность	SEQ ID NO:
V15C	SLSASCGDRV	SEQ ID NO:17
A43C	QKPGKCPKLLI	SEQ ID NO:18

V110C	EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:19
S114C	TCAAPCVFIFPP	SEQ ID NO:20
S121C	FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:21
S127C	DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:22
A144C	FYPRECKVQWK	SEQ ID NO:23
A153C	WKVDNCLQSGN	SEQ ID NO:24
N158C	ALQSGCSQESV	SEQ ID NO:25
S168C	VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:26
V205C	GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:27

Полученные полноразмерные IgG-варианты тио-трастузумаба анализировали на тиоловую реактивность и на активность связывания с HER2. На фигуре 13А схематически проиллюстрировано связывание биотинилированного антитела с иммобилизованным HER2 и связывание ПХ-меченного "второго" антитела для детекции оптической плотности. На фигуре 13В показаны измерения уровня связывания с иммобилизованным HER2 для детекции оптической плотности при 450 нм (слева направо): небиотинилированного трастузумаба дикого типа (Wt), конъюгированных с биотин-малеимидом вариантов тио-трастузумаба V110C (с одним cys), A121C (с одним cys) и V110C/A121C (с двумя cys). Каждый тио-IgG-вариант и трастузумаб тестировали при 1, 10 и 100 нг. Эти измерения показали, что биотинилированные анти-HER2 тио-Mab сохраняют активность связывания с HER2.

На фигуре 14А схематически проиллюстрировано связывание биотинилированного антитела с иммобилизованным HER2 и связывание биотина с ПХ-меченным анти-IgG антителом для детекции оптической

плотности. На фигуре 14В показаны измерения уровня связывания и  
определение оптической плотности при 450 нм конъюгированных с  
5 биотин-малеимидом вариантов тио-трастузумаба и уровня связывания  
небиотинилированного трастузумаба дикого типа со стрептавидином.  
Слева направо: V110C (с одним cys), A121C (с одним cys),  
10 V110C/A121C (с двумя cys) и трастузумаб. Каждый тио-IgG-вариант  
трастузумаба и родительский трастузумаб тестировали при 1, 10 и  
15 100 нг. Эти измерения показали, что антитела тио-Mab против HER2  
обладают высокой тиоловой реактивностью.

Цистеин вводили в полноразмерное анти-EphB2R антитело 2H9 в  
20 определенные положения остатков. Мутанты с одним Cys H-A121C 2H9  
экспрессировали в клетках CHO (яичника китайского хомячка) путем  
временной ферментации в среде, содержащей 1 мМ цистеин.  
25 Последовательность тяжелой цепи A121C-мутанта 2H9 (450  
аминокислот) представлена в SEQ ID NO:28.

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFINPSTGYTDY  
NQKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRPKIPRHANVFWGQGLTVTVSS  
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
35 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40 SEQ ID NO:28

Сконструированные на основе цистеина антитела тио-2H9  
содержат нижеследующие последовательности тяжелой цепи  
45 константной области Fc, имеющие свободную аминокислоту цистеин  
(SEQ ID NOS: 29-38).

Мутант	Последовательность	SEQ ID NO:
V273C	HEDPECKFNWYVDGVEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:29
V279C	HEDPEVKFNWYCDGVEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:30
V282C	HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKPR	SEQ ID NO:31
V284C	HEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKPR	SEQ ID NO:32
A287C	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPR	SEQ ID NO:33
S324C	YKCKVCNKALP	SEQ ID NO:34
S337C	IEKTICKAKGQPR	SEQ ID NO:35
A339C	IEKTISKCKGQPR	SEQ ID NO:36
S375C	KGFYPCDIAVE	SEQ ID NO:37
S400C	PPVLDCDGSFF	SEQ ID NO:38

На фигуре 16 проиллюстрирован анализ Fc-вариантов тио-Mab 2H9 (слева направо, дорожки 1-9): A339C; S337C; S324C; A287C; V284C; V282C; V279C; V273C и 2H9 дикого типа, проводимый с помощью электрофореза в денатурирующем ДСН-ПААГ (полиакриламидном геле) в невосстанавливающих (вверху) и в восстанавливающих (внизу) условиях, после очистки на иммобилизованном белке А. На дорожке справа показаны маркеры размеров в убывающем порядке, указывающие на то, что интактные белки имеют размер примерно 150 кДа; фрагменты тяжелой цепи имеют размер примерно 50 кДа; а фрагменты легкой цепи имеют размер примерно 25 кДа. На фигуре 17А проиллюстрирован анализ вариантов тио-Mab 2H9 (слева направо, дорожки 1-4): L-V15C; S179C; S375C; S400C, проводимый с помощью электрофореза в невосстанавливающем (слева) и в восстанавливающем (справа) денатурирующем полиакриламидном геле после очистки на

иммобилизованном белке А. На фигуре 17В проиллюстрирован анализ дополнительных вариантов тио-Mab 2Н9 и 3А5, проводимый с помощью электрофореза в невосстанавливающем (слева) и в восстанавливающем (+DTT) (справа) денатурирующем полиакриламидном геле после очистки на иммобилизованном белке А. Варианты тио-Mab 2Н9 (в Fab, а также в Fc-области) экспрессировали и очищали как описано выше. Как видно на фигурах 16, 17А и 17В, все белки являются гомогенными, как было подтверждено в анализе с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим проведением процедуры восстановления и окисления, описанной в примере 11 в целях получения реакционноспособных тио-Mab, используемых для конъюгирования (пример 12).

Цистеин ввели в полноразмерное анти-MUC16 антитело 3А5 в определенные положения остатков. Мутанты с одним Cys Н-А121С 3А5 экспрессировали в клетках CHO (яичника китайского хомячка) путем временной ферментации в среде, содержащей 1 мМ цистеин. Последовательность тяжелой цепи А121С-мутанта 3А5 (446 аминокислот) представлена в SEQ ID NO:39.

DVQLQESGPGLVNPSQSLSLTCTVTGYSITNDYAWNWIROFPGNKLEWMGYINYSGYTTY  
NPSLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGLTVTSACSTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:39

Сконструированные на основе цистеина анти-MUC16 антитела  
тио-3A5 содержат нижеследующие последовательности переменных  
областей тяжелой цепи, имеющие свободную аминокислоту цистеин  
(SEQ ID NOS: 40-44).

Мутант	Последовательность	SEQ ID NO:
F45C	NWIRQCPGNK	SEQ ID NO:40
A90C	LNSCTTEDTAT	SEQ ID NO:41
A212C	GQGTLVTVSACSTKGPSVFPL	SEQ ID NO:42
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO:43
V176C	HTFPACLQSSGLYS	SEQ ID NO:44

Сконструированные на основе цистеина анти-MUC16 антитела  
тио-3A5 содержат нижеследующие последовательности переменных  
областей легкой цепи, имеющие свободную аминокислоту цистеин  
(SEQ ID NOS: 45-49).

Мутант	Последовательность	SEQ ID NO:
L15C	FLSVSCGGRVT	SEQ ID NO:45
A43C	QKPGNCPRLLI	SEQ ID NO:46
V110C	EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:47
A144C	FYPRECKVQWK	SEQ ID NO:48
S168C	VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:49

#### ТИОЛОВАЯ РЕАКТИВНОСТЬ ТИО-Mab

Тиоловую реактивность полноразмерных антител IgG,  
сконструированных на основе цистеина (тио-Mab), измеряли путем  
биотинилирования и связывания со стрептавидином. Для скрининга  
тио-Mab, специфически конъюгированного с биотин-малеимидом,  
проводили Вестерн-блот-анализ. В этом анализе, антитела

анализировали с помощью электрофореза в восстанавливающем ПААГ с ДСН, и присутствие биотина специфически детектировали путем инкубирования со стрептавидином-ПХ. Как видно на фигуре 18, взаимодействие стрептавидин-ПХ наблюдалось либо в тяжелой цепи, либо в легкой цепи, в зависимости от того, какой из сконструированных Cys-вариантов используется в данном случае, а в случае антитела дикого типа, такого взаимодействия не наблюдалось, что указывает на то, что варианты тиро-Mab специфически конъюгированы с биотином в положении введенного остатка Cys. На фигуре 18 проиллюстрирован анализ восстановленных биотинилированных тиро-IgG-вариантов, проводимый в денатурирующем геле после захвата на иммобилизованном ПХ-конъюгированном анти-IgG антителе (верхний гель) и на стрептавидине-ПХ (нижний гель). Дорожка 1: 3A5 H-A121C. Дорожка 2: 3A5 L-V110C. Дорожка 3: 2H9 H-A121C. Дорожка 4: 2H9 L-V110C. Дорожка 5: родительское анти-EpHb2R антитело 2H9 дикого типа. Каждый мутант (дорожки 1-4) был захвачен анти-IgG антителом и детектирован с помощью ПХ (вверху), что указывает на сохранение селективности и аффинности. Захват иммобилизованным стрептавидином с ПХ-детекцией (внизу) подтверждал локализацию биотина на тяжелой и легкой цепях. Цистеиновая мутация в сконструированных на основе цистеина антителах на дорожках 1 и 3 локализована на тяжелой цепи. Цистеиновая мутация в сконструированных на основе цистеина антител на дорожках 2 и 4 локализована в легкой цепи. Конъюгирование с реагентом "биотин-малеимид" происходит в сайте цистеиновой мутации.

Анализ сконструированных на основе цистеина антител тиро-

Маб, представленных на фигуре 18, и V15C-варианта 2Н9, осуществляемый с помощью ЖХ/МС, дает возможность проводить количественную оценку тиоловой реактивности (таблица 5).

Таблица 5

Количественная ЖХ/МС-оценка биотинилирования тио-Маб - тиоловой реактивности

Вариант тио-Маб	Количество биотина на тио-Маб
2Н9 дикого типа	0,0
2Н9 L-V15C	0,6
2Н9 L-V110C	0,5
2Н9 H-A121C	2,0
3А5 L-V110C	1,0
3А5 H-A121C	2,0

Конструирование цистеина проводили в константном домене, т.е., в Fc-области антител IgG. Ряд аминокислот в определенных положениях заменяли цистеинами, и экспрессированные мутанты, то есть, сконструированные на основе цистеина антитела, анализировали на их тиоловую реактивность. Биотинилированные Fc-варианты тио-Маб 2Н9 анализировали на тиоловую реактивность в ELISA-анализе путем количественной ПХ-оценки посредством захвата на иммобилизованном стрептавидине (фигура 19). Такой ELISA-анализ был разработан для быстрого скрининга остатков Cys с реакционноспособными тиоловыми группами. Как показано на схематической диаграмме фигуры 19, взаимодействие стрептавидина с биотином оценивали путем зондирования ПХ-конъюгированным анти-IgG антителом с последующим измерением оптической плотности при



450 нм. Полученные результаты подтвердили, что тио-Fc-варианты 2Н9 V282С, А287С, А339С, S375С и S400С обладают тиоловой реактивностью от умеренной до очень высокой. Степень конъюгирования Fc-вариантов тио-Mab 2Н9 с биотином количественно оценивали с помощью ЖХ/МС-анализа, проиллюстрированного в таблице 6. ЖХ/МС-анализ подтвердил, что варианты А282С, S375С и S400С обнаруживали 100% конъюгирование с биотином, а варианты V284С и А339С обнаруживали 50% конъюгирование с биотином, что указывало на присутствие реакционноспособной тиоловой группы цистеина. Другие тио-Fc-варианты и родительское антитело 2Н9 дикого типа либо обнаруживали очень незначительный уровень биотинилирования, либо вообще не обнаруживали биотинилирования.

Таблица 6

Количественная ЖХ/МС-оценка биотинилирования Fc-тио-Mab 2Н9

Fc-вариант тио-Mab 2Н9	% биотинилирования
V273С	0
V279С	31
V282С	100
V284С	50
A287С	0
S324С	71
S337С	0
A339С	54
S375С	100
S400С	100
(2Н9 дикого типа)	0

**ТИОЛОВАЯ РЕАКТИВНОСТЬ ВАРИАНТОВ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ FAV ТИО-4D5**

Скрининг различных сконструированных на основе цистеина вариантов Fab легкой цепи анти-ErbB2 антитела 4D5 выявил различные варианты с величиной тиоловой реактивности 0,6 и выше (таблица 7), как было измерено в анализе PHESELECTOR, проиллюстрированном на фигуре 8. Величины тиоловой реактивности, представленные на фигуре 7, нормализовали по тιο-Fab-варианту тяжелой цепи (HC-A121C) 4D5, который принимали за 100% как полностью биотинилированный вариант HC-A121C, и выражали в процентах.

Таблица 7

Процентные величины тиоловой реактивности тιο-Fab-вариантов легкой цепи антитела 4D5

Тιο-Fab-вариант 4D5	Величина тиоловой реактивности (%)
V15C	100
V110C	95
S114C	78
S121C	75
S127C	75
A153C	82
N158C	77
V205C	78
(HC-A121C)	100
(4D5 дикого типа)	25

**КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

Сконструированные на основе цистеина антитела согласно

изобретению могут быть конъюгированы с любым терапевтическим средством, то есть, с молекулой лекарственного средства, которая может быть ковалентно связана с антителом через реакционноспособную тиоловую группу цистеина.

Репрезентативный вариант соединения-конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC) содержит сконструированное на основе цистеина антитело (Ab) и молекулу лекарственного средства (D), где указанное антитело включает один или несколько свободных цистеиновых аминокислотных остатков, имеющих величину тиоловой реактивности в пределах от 0,6 до 1,0, и присоединено к молекуле D посредством одной или нескольких свободных цистеиновых аминокислотных остатков через линкерную группу (L), и где, указанный конъюгат имеет формулу I:



где  $p$  равно 1, 2, 3 или 4. Число молекул лекарственного средства, которые могут быть конъюгированы с молекулой антитела посредством реагирующей с тиолом линкерной группы, ограничено числом цистеиновых остатков, вводимых описанными здесь способами. Поэтому репрезентативные ADC формулы I содержат антитела, имеющие 1, 2, 3 или 4 введенных цистеиновых остатка.

Другой репрезентативный вариант соединения-конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC) содержит сконструированное на основе цистеина антитело (Ab), альбумин-связывающий пептид (ABP) и молекулу лекарственного средства (D), где указанное антитело присоединено к молекуле лекарственного средства посредством линкерной группы (L) и к альбумин-связывающему пептиду посредством амидной связи или второй

линкерной группы; и где указанный конъюгат имеет формулу Ia:



5 где  $p$  равно 1, 2, 3 или 4.

ADC-соединениями согласно изобретению являются соединения, обладающие противораковой активностью. В частности, указанные  
10 соединения включают сконструированное на основе цистеина антитело, конъюгированное, то есть, ковалентно связанное посредством линкера, с молекулой лекарственного средства, то  
15 есть, с токсином. Если данное лекарственное средство не конъюгировано с антителом, то такое лекарственное средство обладает цитотоксической или цитостатической активностью. Таким образом, биологическая активность указанной молекулы  
20 лекарственного средства модулируется посредством конъюгирования с антителом. Конъюгаты "антитело-лекарственное средство" (ADC) согласно изобретению обеспечивают селективную доставку эффективной дозы цитотоксического средства в опухолевую ткань, в  
25 результате чего может быть достигнута более высокая селективность, то есть, может быть использована более низкая эффективная доза.

В одном из вариантов изобретения, биологическая доступность ADC согласно изобретению или внутриклеточного метаболита ADC в  
40 организме млекопитающего является более высокой по сравнению с биологической доступностью соединения лекарственного средства, содержащего лишь одну молекулу лекарственного средства, присутствующего в указанном ADC. Кроме того, биологическая  
45 доступность ADC согласно изобретению или внутриклеточного метаболита ADC в организме млекопитающего является более высокой

по сравнению с биологической доступностью аналога ADC, не имеющего молекулы лекарственного средства.

5           **МОЛЕКУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

Молекула лекарственного средства (D) конъюгатов "антитело-  
лекарственное средство" (ADC) включает любое соединение, часть  
10 или группу, которые обладают цитотоксическим или цитостатическим  
действием. Молекулами лекарственного средства являются: (i)  
15 химиотерапевтические средства, которые могут функционировать как  
ингибиторы микротубулина, ингибиторы митоза, ингибиторы  
топоизомеразы или ДНК-интеркалирующие агенты; (ii) белковые  
20 токсины, которые могут действовать как ферменты; и (iii)  
радиоизотопы.

Репрезентативными молекулами лекарственного средства  
25 являются, но не ограничиваются ими, майтанзиноид, ауристатин,  
доластатин, трихотецен, CC1065, калихеамицин и другие  
30 энедииновые антибиотики, таксан, антрациклин, и их  
стереоизомеры, изостеры, аналоги или производные.

Майтанзиновые соединения, подходящие для применения в  
35 качестве майтанзиноидных лекарственных средств, хорошо известны  
специалистам и могут быть выделены из природных источников  
известными методами, или они могут быть получены методами генной  
40 инженерии (см. Yu et al. (2002) PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA)  
99:7968-7973), либо майтанзинол и аналоги майтанзинола могут  
45 быть получены известными методами синтеза.

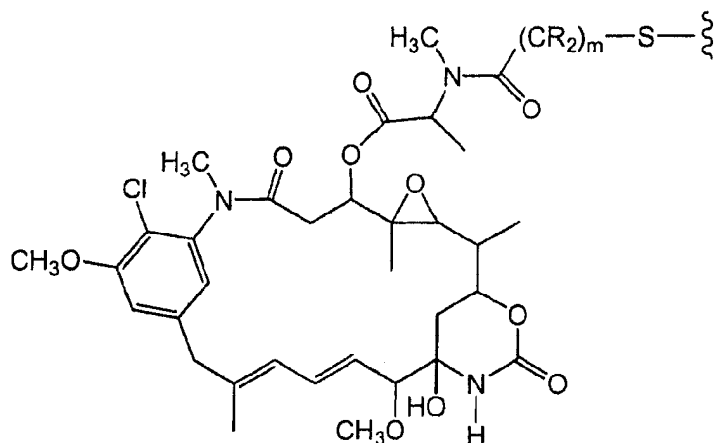
Репрезентативными майтанзиноидными лекарственными  
средствами являются лекарственные средства, имеющие  
50 модифицированное ароматическое кольцо, такие как C-19-дехлоро

(патент США 4256746) (полученные путем восстановления анзамитоцина Р2 алюмогидридом лития); С-20-гидроксид (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлор (патенты США №. 4361650 и 4307016) (полученные путем деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces*, или путем дехлорирования с использованием LAN); и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлоро (патент США № 4294757) (полученные путем ацилирования с использованием ацилхлоридов), и молекулы, имеющие модификации в других положениях.

Репрезентативными молекулами майтазиноидного лекарственного средства являются молекулы, имеющие модификации, такие как: С-9-SH (патент США 4424219) (полученные путем реакции взаимодействия майтанзинола с  $H_2S$  или  $P_2S_5$ ); С-14-алкоксиметил (деметокси/ $CH_2OR$ ) (патент США 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил ( $CH_2OH$  или  $CH_2OAc$ ) (патент США 4450254) (полученные от *Nocardia*); С-15-гидроксид/ацилокси (патент США 4364866) (полученные путем превращения майтанзинола под действием *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделенные из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (полученные путем деметилирования майтанзинола под действием *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (патент США 4371533) (полученные путем восстановления майтанзинола трихлоридом титана/LAN). Известно, что многие положения в майтанзиновых соединениях, в зависимости от типа связи, могут быть использованы в качестве положения присоединения. Так, например, для образования сложноэфирной связи, подходящими являются С-3-положение, имеющее гидроксильную группу, С-14-положение, модифицированное

гидроксиметилом, С-15-положение, модифицированное гидроксильной группой, и С-20-положение, имеющее гидроксильную группу.

Молекулами лекарственного средства (D) конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) формулы I являются майтанзиноиды, имеющие структуру:



где волнистая линия означает ковалентное связывание атома серы молекулы D с линкером (L) конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC). R может независимо представлять собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, выбранный из метила, этила, 1-пропила, 2-пропила, 1-бутила, 2-метил-1-пропила, 2-бутила, 2-метил-2-пропила, 1-пентила, 2-пентила, 3-пентила, 2-метил-2-бутила, 3-метил-2-бутила, 3-метил-1-бутила, 2-метил-1-бутила, 1-гексила, 2-гексила, 3-гексила, 2-метил-2-пентила, 3-метил-2-пентила, 4-метил-2-пентила, 3-метил-3-пентила, 2-метил-3-пентила, 2,3-диметил-2-бутила и 3,3-диметил-2-бутила. Алкиленовой цепью, связывающей амидную группу с атомом серы, может быть метанил, этанил или пропил, то есть, m равно 1, 2 или 3.

Майтанзиновые соединения ингибируют пролиферацию клеток путем подавления образования микротрубочек во время митоза посредством ингибирования полимеризации белка микротрубочек,

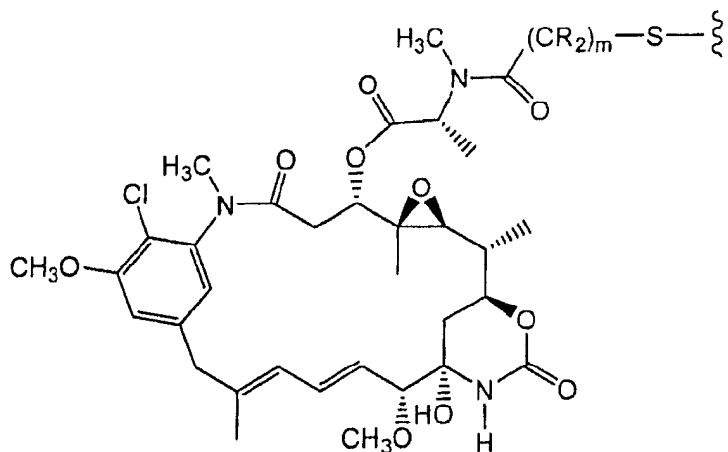
тубулина (Remillard et al. (1975) Science 189:1002-1005).

Майтанзин и майтанзиноиды являются в высокой степени  
цитотоксичными, но их клиническое применение в противораковой  
терапии значительно ограничено, что обусловлено серьезными  
системными побочными эффектами, ассоциированными, главным  
образом, с плохой селективностью этих соединений по отношению к  
опухолям. Клинические испытания с применением майтанзина были  
прекращены, что было вызвано его серьезным побочным действием на  
центральную нервную систему и желудочно-кишечный тракт (Issel et  
al. (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207).

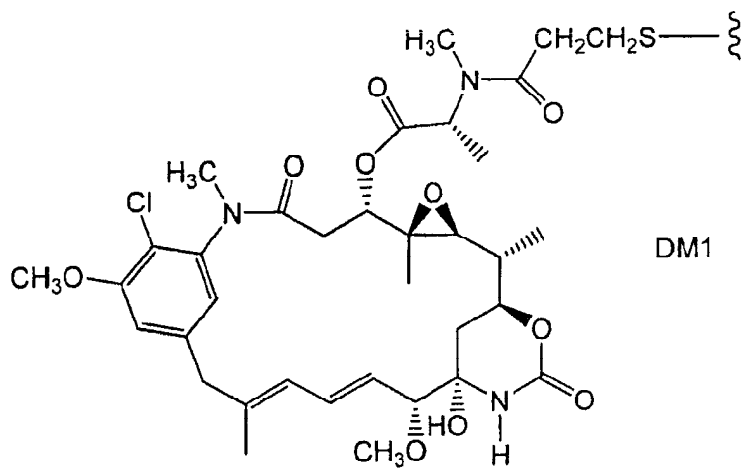
Майтанзиноидные лекарственные средства, используемые в  
конъюгатах "антитело-лекарственное средство", привлекательны  
тем, что они (i) относительно доступны для ферментативной или  
химической модификации и дериватизации продуктов ферментации,  
(ii) пригодны для дериватизации функциональными группами,  
подходящими для конъюгирования с антителами посредством  
недисульфидных линкеров, (iii) стабильны в плазме и (iv)  
эффективны против ряда опухолевых клеточных линий (заявка на  
патент США 2005/0169933; WO 2005/037992; патент США 5208020).

Как и в случае других молекул лекарственного средства, в  
качестве соединений согласно изобретению рассматриваются все  
стереоизомеры майтанзиноидного лекарственного средства, то есть,  
любая комбинация R- и S-конфигураций у хиральных атомов углерода  
молекулы D. В одном из вариантов изобретения, майтанзиноидное  
лекарственное средство (D) имеет нижеследующую стереохимическую  
структуру:

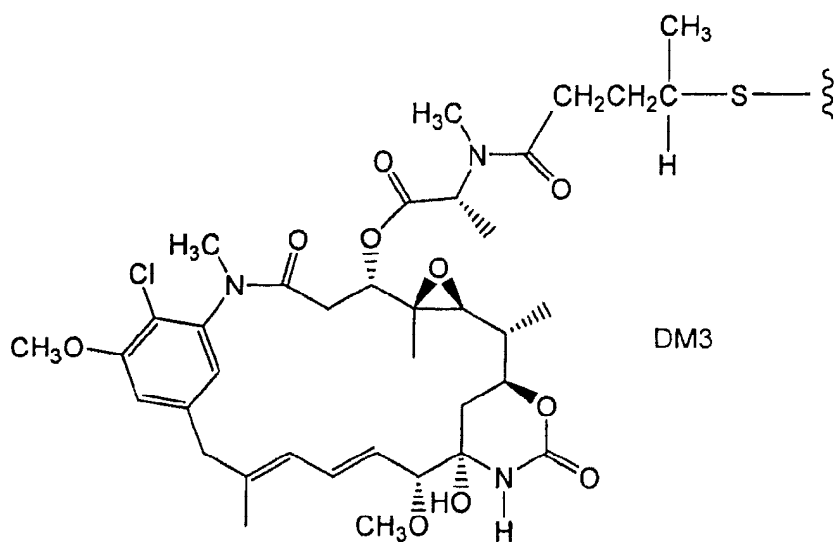




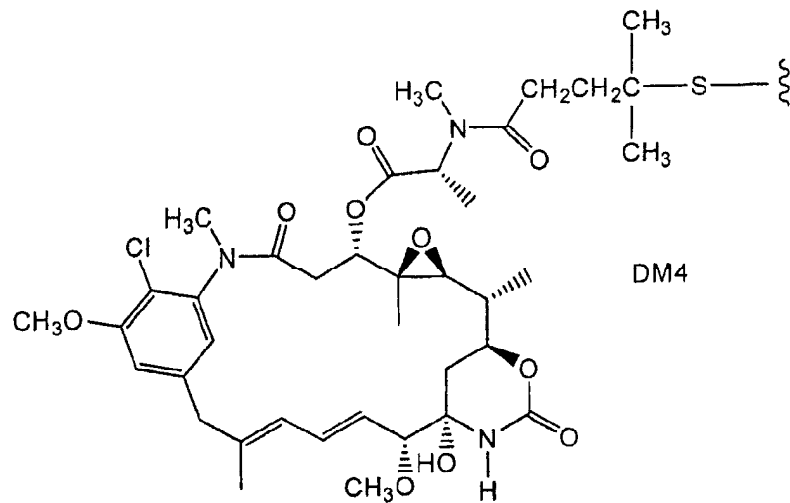
Репрезентативными вариантами молекул майтанзиноидного лекарственного средства являются DM1,  $(CR_2)_m=CH_2CH_2$ ; DM3,  $(CR_2)_m=CH_2CH_2CH(CH_3)$ ; и DM4,  $(CR_2)_m=CH_2CH_2C(CH_3)_2$ , имеющие структуры:



DM1



DM3



Линкер может быть присоединен к майтанзиноидной молекуле в различных положениях, в зависимости от типа связи. Так, например, сложноэфирная связь может быть образована посредством реакции взаимодействия с гидроксильной группой в соответствии со стандартными методами связывания. Реакция может проходить в С-3-положении, имеющем гидроксильную группу, в С-14-положении, модифицированном гидроксиметилом, в С-15-положении, модифицированном гидроксильной группой, и в С-20-положении, имеющем гидроксильную группу. В предпочтительном варианте изобретения, такая связь образуется в С-3-положении майтанзинола или аналога майтанзинола.

Молекулами лекарственного средства (D) конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) формулы I также являются доластатины и их пептидные аналоги и производные, ауристатины (патенты США №№ 5635483; 5780588). Было показано, что доластатины и ауристатины влияют на динамику образования микротрубочек, на гидролиз GTP и на деление ядер и клеток (Wooye et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), а также обладают противораковой (патент США 5663149) и

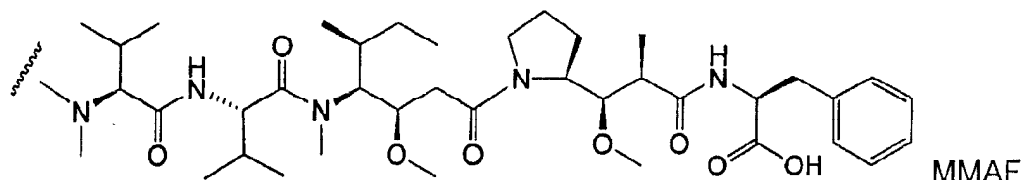
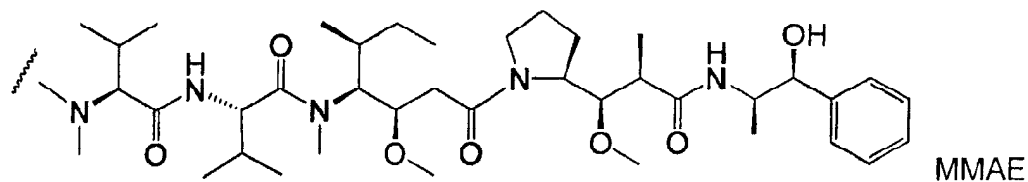
противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Различные формы доластатиновых или ауристатиновых лекарственных средств могут быть ковалентно связаны с антителом у N(амино)-конца или у C(карбокси)-конца пептидного лекарственного средства (WO 02/088172; Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) Blood 102(4):1458-1465).

Молекулами лекарственных средств являются доластатины, ауристатины (патенты США 5635483; 5780588; 5767237; 6124431) и их аналоги и производные. Было показано, что доластатины и ауристатины влияют на динамику образования микротрубочек, на гидролиз GTP и на деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), а также обладают противораковой (патент США 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекула доластатинового или ауристатинового лекарственного средства может быть связана с антителом у N(амино)-конца или у C(карбокси)-конца пептидного лекарственного средства (WO 02/088172).

Репрезентативными вариантами ауристатина являются связанные по N-концу молекулы монометилауристатинового лекарственного средства DE и DF, описанные в заявке WO 2005/081711; Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, опубликованной 28 марта, 2004, описание которой во всей своей полноте вводится в настоящее изобретение посредством ссылки.

Молекулами лекарственного средства (D) конъюгатов

“антитело-лекарственное средство” (ADC) формулы I являются молекулы монометилауристатинового лекарственного средства MMAE и MMAF, связанные по N-концу с антителом, и имеющие структуры:



Обычно, пептидные молекулы лекарственного средства могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, методом синтеза в растворе (см. E. Schröder & K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), хорошо известным специалистам в области химии пептидного синтеза.

Молекулами лекарственного средства являются калихеамицин и его аналоги и производные. Антибиотики семейства калихеамицинов способны индуцировать разрыв двухцепочечной ДНК в субпикомолярных концентрациях. Описание получения конъюгатов антибиотиков семейства калихеамицинов можно найти в патентах США 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701, 5770710; 5773001; 5877296. Структурными аналогами калихеамицина, которые могут быть использованы, являются, но не ограничиваются ими,  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-ацетил- $\gamma_1^I$ , PSAG и  $\theta_1^I$  (Hinman et al., Cancer Research

53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998).

Белковыми токсинами являются: А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (от *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина (Vitetta et al. (1987) Science, 238:1098), А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки фитолакки американской (*Phytolaca americana*) (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены (WO 93/21232).

Терапевтическими радиоизотопами являются:  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  и радиоактивные изотопы Lu.

Радиоизотоп или другие метки могут быть включены в конъюгат известными методами (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989).  $^{14}\text{C}$ -меченная 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилетриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является репрезентативным хелатообразующим агентом для конъюгирования радионуклида с антителом (WO 94/11026).

#### ЛИНКЕРЫ

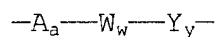
"Линкер" (L) представляет собой бифункциональную или мультифункциональную молекулу, которая может быть использована для связывания одной или нескольких молекул лекарственного средства (D) и молекулы антитела (Ab) с образованием конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) формулы I. Конъюгаты

“антитело-лекарственное средство” (ADC) обычно получают с использованием линкера, имеющего реакционноспособную функциональную группу для связывания с лекарственным средством и с антителом. Тиол цистеина, введенного в антитело (Ab), может образовывать связь с функциональной группой линкерного реагента, молекулы лекарственного средства или промежуточного соединения “лекарственное средство-линкер”.

В одном из аспектов изобретения, линкер имеет реакционноспособный сайт, содержащий электрофильную группу, реагирующую с нуклеофильным цистеином, присутствующим на антителе. Тиол цистеина указанного антитела реагирует с электрофильной группой на линкере и образует ковалентную связь с этим линкером. Подходящими электрофильными группами являются, но не ограничиваются ими, малеимидные и галогенацетамидные группы.

Сконструированные на основе цистеина антитела подвергают взаимодействию с линкерными реагентами или с промежуточными соединениями “лекарственное средство-линкер” посредством электрофильных функциональных групп, таких как малеимид или  $\alpha$ -галогенкарбонил в соответствии с методом конъюгирования, описанным на стр. 766 публикации Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, и в соответствии с протоколом, описанным в примере 4.

В одном из вариантов изобретения, линкер L в ADC имеет формулу:



где: A представляет собой удлиняющий компонент, ковалентно связанный с тиолом цистеина антитела (Ab);

а равно 0 или 1;

каждый -W- независимо представляет собой аминокислоту,

5 w независимо представляет собой целое число от 0 до 12,

Y означает спейсерный компонент, ковалентно связанный с молекулой лекарственного средства; и

10 y равно 0, 1 или 2.

### УДЛИНЯЮЩИЙ КОМПОНЕНТ

15 Удлиняющий компонент (-A-), если он присутствует, способен связывать антитело с аминокислотой (-W-). В этом случае, антитело (Ab) имеет тиоловую группу свободного цистеина, которая  
20 может образовывать связь с электрофильной функциональной группой удлиняющего компонента. Репрезентативные удлиняющие компоненты данного варианта настоящего изобретения представлены в формулах  
25 IIIa и IIIb в квадратных скобках, где Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше, а R<sup>17</sup> представляет собой двухвалентный радикал, выбранный из (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, арилена, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-  
30 арилена, -арилена-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоциклила), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоциклил)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероциклила, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероциклила),  
35 (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероциклил)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-,  
- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-,  
40 (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, - (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-,  
- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- и  
- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, где R<sup>b</sup> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил,  
45 фенил или бензил, а r независимо представляет собой целое число от 1 до 10.

50 Ариленами являются двухвалентные ароматические углеводородные радикалы с 6-20 атомами углерода, полученные

путем удаления двух атомов водорода из исходной ароматической циклической системы. Типичными ариленовыми группами являются, но не ограничиваются ими, радикалы, происходящие от бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и т.п.

Гетероциклические группы включают кольцевую систему, в которой один или несколько атомов на кольце представляют собой гетероатом, например, атом азота, кислорода и серы. Гетероциклический радикал включает 1-20 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гидроцикл может представлять собой моноцикл, имеющий 3-7 атомов на кольце (2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), или бицикл, имеющий 7-10 атомов на кольце (4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например, бицикло [4,5]-, [5,5]-, [5,6]- или [6,6]-система. Гетероциклы описаны в публикациях Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, в главах 1, 3, 4, 6, 7, и 9; в публикации "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности, в томах 13, 14, 16, 19 и 28; and J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Примерами гетероциклов являются, например, но не ограничиваются ими, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, тетрагидротиофенил, окисленный серой тетрагидротиофенил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиазолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталенил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил,

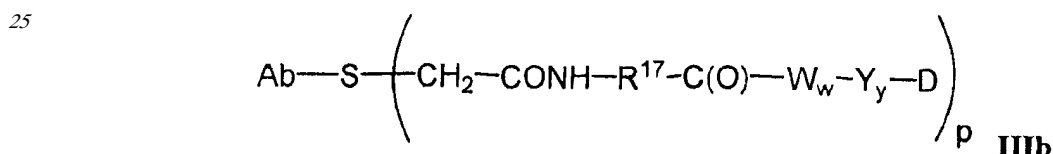
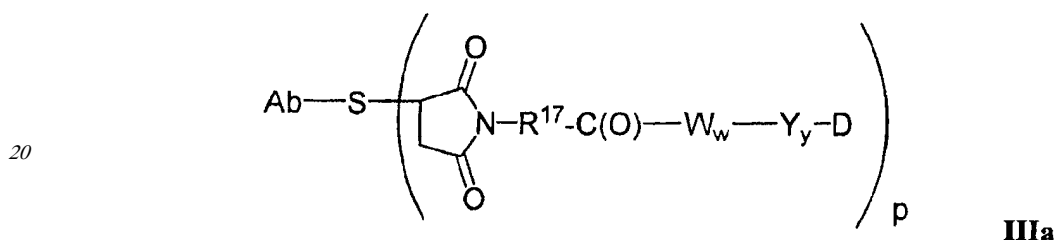


пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил,  
 тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил,  
 5 тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил,  
 октагидроизохинолинил, азоцинил, триазинил, 6H-1,2,5-  
 тиадиазирил, 2H,6H-1,5,2-дитиазирил, тиенил, тиантренил,  
 10 пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксантирил,  
 2H-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил,  
 15 индолизинил, изоиндолил, 3H-индолил, 1H-индазолил, пуририл, 4H-  
 хинолизинил, фталазинил, нафтиридирил, хиноксалирил,  
 хиназолил, циннолил, птеридинил, 4Ah-карбазолил, карбазолил,  
 20 β-карболирил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил,  
 фенантролил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил,  
 25 изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолил,  
 пиразолидинил, пиразолил, пиперазинил, индолил,  
 изоиндолил, хинуклидинил, морфолил, оксазолидинил,  
 30 бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолил и  
 изатиноил.

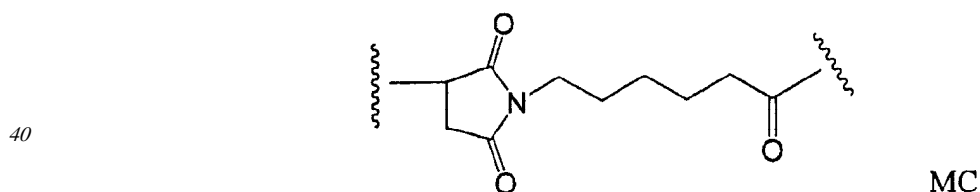
35 Карбоциклические группы включают насыщенное или  
 ненасыщенное кольцо, имеющее от 3 до 7 атомов углерода в  
 качестве моноцикла, или от 7 до 12 атомов углерода в качестве  
 40 бицикла. Моноциклические карбоциклы имеют от 3 до 6 атомов на  
 кольце, а обычно, 5 или 6 атомов на кольце. Бициклические  
 карбоциклы имеют от 7 до 12 атомов на кольце, например,  
 45 расположенных в виде бицикло-[4,5]-, [5,5]-, [5,6]- или [6,6]-  
 системы, или 9 или 10 атомов на кольце, расположенных в виде  
 50 бицикло-[5,6]- или [6,6]-системы. Примерами моноциклических  
 карбоциклов являются 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-  
5 циклогекс-3-енил, циклогептил и циклооктил.

Следует отметить, что во всех репрезентативных вариантах  
ADC формулы I, таких как соединения III-VI, даже если они не  
10 указаны конкретно, от 1 до 4 молекул лекарственного средства  
связаны с антителом ( $p=1-4$ ), в зависимости от числа введенных  
15 цистеиновых остатков.

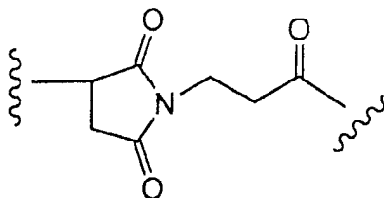


Репрезентативным удлиняющим элементом является элемент  
формулы IIIa, происходящий от малеимида-капроила (MC), где  $R^{17}$   
35 представляет собой  $-(\text{CH}_2)_5-$ :



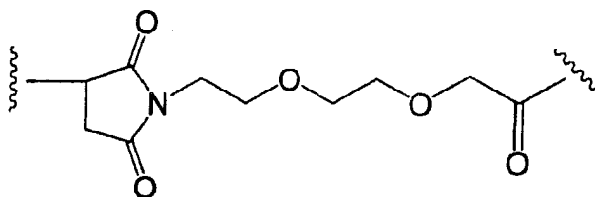
Репрезентативным удлиняющим элементом является элемент  
45 формулы IIIa, происходящий от малеимида-пропаноила (MP), где  $R^{17}$   
представляет собой  $-(\text{CH}_2)_2-$ :

50

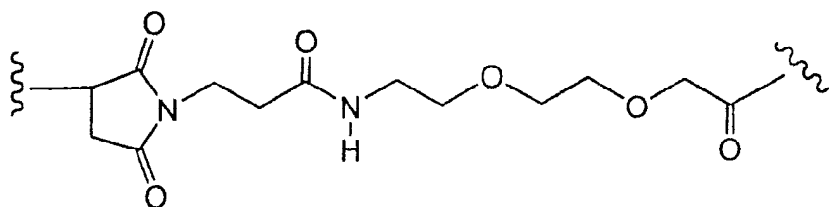


MP

Другим репрезентативным удлиняющим элементом является элемент формулы IIIa, где  $R^{17}$  представляет собой  $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ , а  $r$  равно 2:

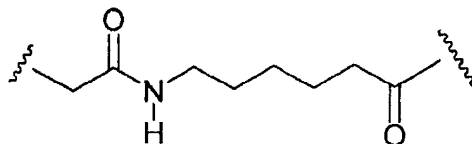


Другим репрезентативным удлиняющим элементом является элемент формулы IIIa, где  $R^{17}$  представляет собой  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ , где  $R^b$  представляет собой H, а каждый из  $r$  равен 2:



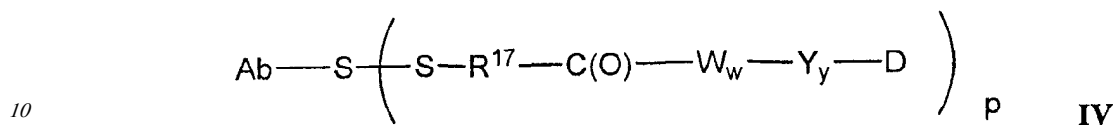
MPEG

Другим репрезентативным удлиняющим элементом является элемент формулы IIIb, где  $R^{17}$  представляет собой  $-(CH_2)_5-$ :

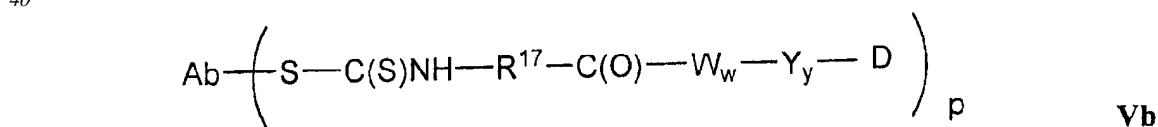
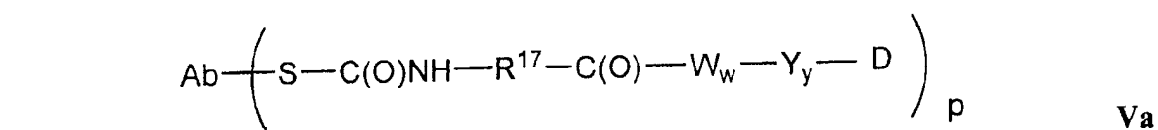


В другом варианте изобретения, указанный удлиняющий элемент связан с молекулой антитела посредством дисульфидной связи, находящейся между атомом серы молекулы антитела и атомом серы

удлиняющего элемента. Репрезентативный удлиняющий элемент  
данного варианта изобретения показан в формуле IV в квадратных  
5 скобках, где  $R^{17}$ , Ab-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше.



В еще одном варианте изобретения, реакционноспособная  
15 группа удлиняющего элемента содержит реагирующую с тиолом  
функциональную группу, которая может образовывать связь со  
свободным тиолом цистеина антитела. Примерами реагирующих с  
20 тиолом функциональных групп являются, но не ограничиваются ими,  
малеимид,  $\alpha$ -галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие  
как сукцинимидоэфиры, 4-нитрофениловые эфиры, пентафторфениловые  
25 эфиры, тетрафторфениловые эфиры, ангидриды, хлорангидриды,  
сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные  
30 удлиняющие элементы данного варианта изобретения показаны в  
формулах Va и Vb в квадратных скобках, где  $R^{17}$ , Ab-, -W-, -Y-,  
-D, w и y определены выше.



45 В другом варианте изобретения, указанным линкером может  
быть линкер дендритного типа для ковалентного связывания более  
чем одной молекулы лекарственного средства с антителом  
50 посредством ветвящейся многофункциональной линкерной молекулы

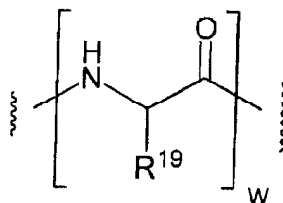
(Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990).

Дендритные линкеры могут повышать молярное отношение лекарственного средства к антителу, т.е., при загрузке, которая соответствует эффективности ADC. Таким образом, если сконструированное на основе цистеина антитело имеет только одну реакционноспособную тиоловую группу цистеина, то множество молекул лекарственного средства могут быть ковалентно связаны посредством дендритного линкера.

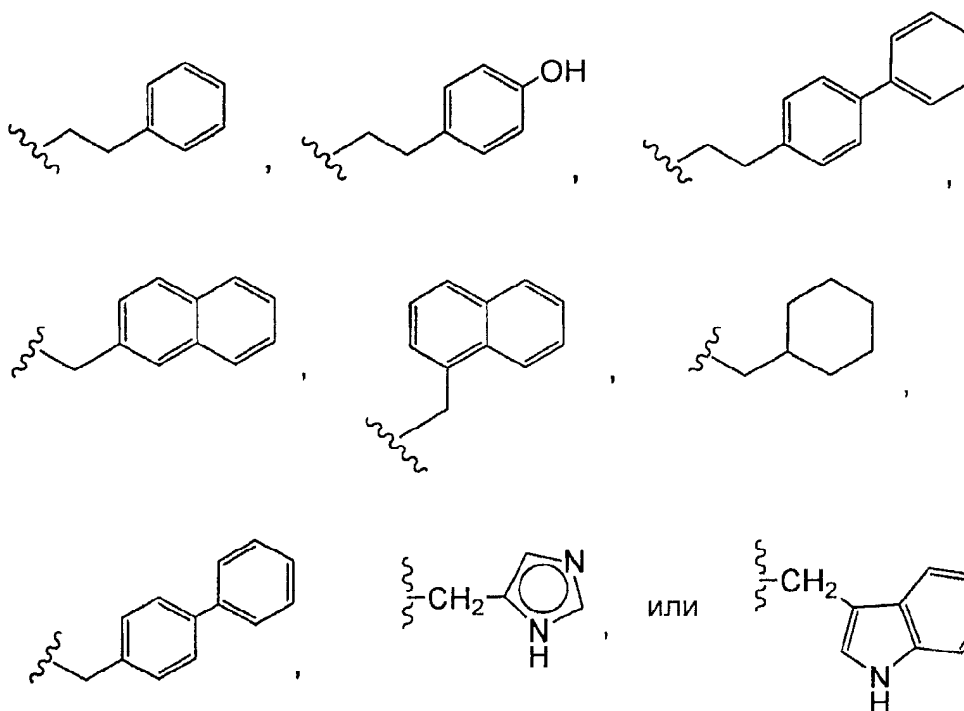
#### **АМИНОКИСЛОТНЫЙ КОМПОНЕНТ**

Линкер может содержать аминокислотные остатки. Аминокислотный компонент ( $-W_w-$ ), если он присутствует, связывает антитело (Ab) с молекулой лекарственного средства (D) сконструированного на основе цистеина конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC) согласно изобретению.

$-W_w-$  представляет собой дипептидный, трипептидный, тетрапептидный, пентапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, нонапептидный, декапептидный, ундекапептидный или додекапептидный компонент. Аминокислотными остатками, составляющими указанный аминокислотный компонент, являются природные остатки, а также небольшие аминокислоты, и неприродные аминокислотные аналоги, такие как цитруллин. Каждый из компонентов  $-W-$  независимо имеет формулу, представленную ниже в квадратных скобках, а  $w$  означает целое число от 0 до 12:



где  $\text{R}^{19}$  представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, п-гидроксibenзил,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил,



Аминокислотный компонент может быть ферментативно расщеплен одним или несколькими ферментами, включая опухолеассоциированную протеазу, с высвобождением молекулы лекарственного средства (D), которая, в одном из вариантов изобретения, после высвобождения

подвергается протонированию *in vivo* с образованием лекарственного средства (D).

5 Подходящие компоненты  $-W_w-$  могут быть сконструированы и оптимизированы в отношении их селективности к ферментативному расщеплению конкретными ферментами, например, опухолеассоциированной протеазой. В одном из вариантов изобретения, компонентом  $-W_w-$  является компонент, расщепление которого катализируется катепсином В, С и D, или плазмин-протеазой.

Примерами аминокислотных компонентов  $-W_w-$  являются дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примерами дипептидов являются валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примерами трипептидов являются глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).

Если  $R^{19}$  не является водородом, то атом углерода, к которому присоединен  $R^{19}$ , является хиральным. Каждый атом углерода, к которому присоединен  $R^{19}$ , независимо присутствует в (S)- или (R)-конфигурации, или в виде рацемической смеси. Таким образом, аминокислотные компоненты могут быть энантимерно чистыми, рацемическими или диастереомерными.

#### 40 Спейсерный компонент

Спейсерный компонент  $(-Y_y-)$ , если он присутствует ( $y=1$  или 2), связывает аминокислотный компонент  $(-W_w-)$  с молекулой лекарственного средства (D), если такой аминокислотный компонент присутствует ( $w=1-12$ ). Альтернативно, если такой аминокислотный компонент отсутствует, то указанный спейсерный компонент связывает удлиняющий компонент с молекулой лекарственного

средства. Если отсутствуют аминокислотный компонент и удлиняющий  
 компонент ( $w, y=0$ ), то указанный спейсерный компонент также  
 связывает молекулу лекарственного средства с молекулой антитела.  
 Спейсерными компонентами являются компоненты двух общих типов:  
 самоэлиминирующиеся и несамоэлиминирующиеся.  
 Несамоэлиминирующийся спейсерный компонент представляет собой  
 компонент, где часть спейсерного компонента или весь этот  
 компонент остаются связанными с молекулой лекарственного  
 средства после отщепления, а в частности, ферментативного  
 отщепления аминокислотного компонента от конъюгата "антитело-  
 лекарственное средство" или от конъюгата "лекарственное  
 средство-линкер". Если ADC, содержащий глицин-глициновый  
 спейсерный компонент или глициновый спейсерный компонент,  
 подвергаются ферментативному расщеплению протеазой,  
 ассоциированной с опухолевыми клетками, протеазой,  
 ассоциированной с раковыми клетками, или протеазой,  
 ассоциированной с лимфоцитами, то молекула глицин-глицин-  
 лекарственное средство или молекула глицин-лекарственное  
 средство отщепляется от Ab-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>. В одном из вариантов  
 изобретения, независимая реакция гидролиза происходит в клетках-  
 мишенях и приводит к расщеплению связи в молекуле глицин-  
 лекарственное средство с высвобождением лекарственного средства.

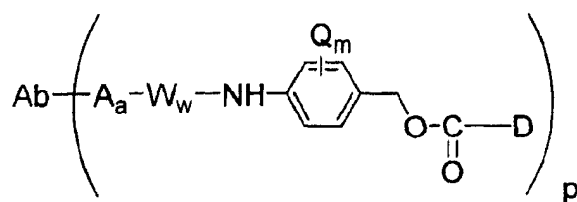
В другом варианте изобретения, -Y<sub>y</sub>- представляет собой  
 п-аминобензилкарбамоиловый компонент (PAB) (см. схемы 2 и 3),  
 фениленовая часть которого замещена Q<sub>m</sub>, где Q представляет собой  
 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил), галоген, нитро или циано, а m равно  
 целому числу от 0 до 4.



Репрезентативными вариантами несамозелиминирующихся  
спейсерных компонентов (-Y-) являются -Gly-Gly-; -Gly-; -Ala-  
Phe-; -Val-Cit-.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится  
к конъюгату "лекарственное средство-линкер" или ADC, в которых  
отсутствует спейсерный компонент (y=0), или к их фармацевтически  
приемлемой соли или сольвату.

Альтернативно, ADC, содержащий самоэлиминирующийся  
спейсерный компонент, может высвобождать молекулу D. В одном из  
вариантов изобретения, -Y- представляет собой группу PAB,  
которая связана с -W<sub>w</sub>- посредством атома азота аминотrupпы PAB, и  
непосредственно связана с молекулой -D через карбонатную,  
карбаматную или эфирную группу, где ADC имеет нижеследующую  
репрезентативную структуру:

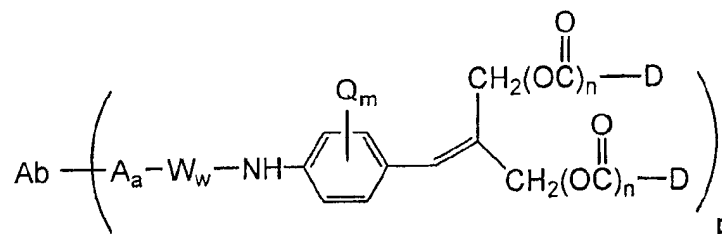


где Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил),  
галоген, нитро или циано; m равно целому числу от 0 до 4; а p  
равно 1-4.

Другими примерами самоэлиминирующихся спейсеров являются,  
но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые по  
своим электронным свойствам, аналогичны группе PAB, такие как  
производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al. (1999)  
Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто- или пара-  
аминобензилацетали. Могут быть использованы спейсеры, которые

подвергаются циклизации после гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные кольцевые бицикло[2.2.1]- и бицикло[2.2.2]-системы (Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Примерами самоэлиминирующихся спейсеров, используемых в ADC, являются амин-содержащие лекарственные средства, замещенные в положении глицина (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

В одном из вариантов изобретения, указанный спейсерный элемент представляет собой разветвленный бис(гидроксиметил)стирол (BHMS), который может быть использован для включения и высвобождения множества лекарственных средств, и который имеет структуру:



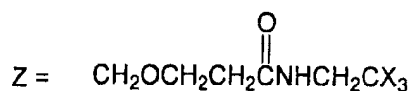
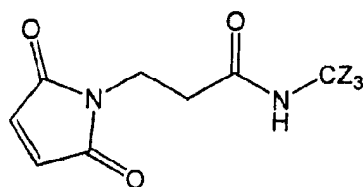
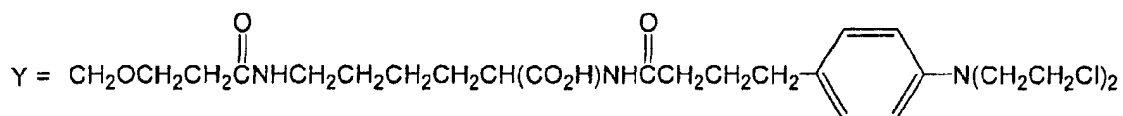
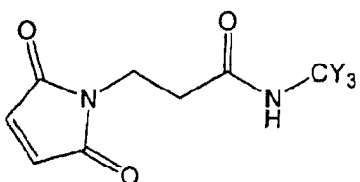
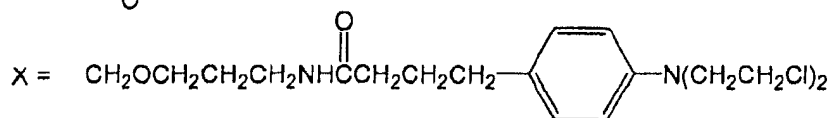
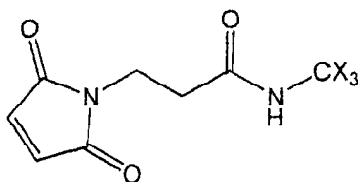
содержащую 2-(4-аминобензилиден)пропан-1,3-диоловый дендримерный компонент (WO 2004/043493; de Groot et al. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), где Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил), галоген, нитро или циано; m равно целому числу от 0 до 4; n равно 0 или 1; а p равно 1-4.

#### Дендритные линкеры

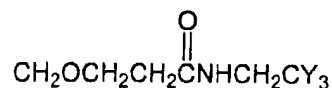
В другом варианте изобретения, линкером L может быть линкер

дендритного типа, используемый для ковалентного связывания более  
чем одной молекулы лекарственного средства с антителом  
5 посредством ветвящейся многофункциональной линкерной молекулы  
(Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters  
12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry  
10 11:1761-1768). Дендритные линкеры могут повышать молярное  
отношение лекарственного средства к антителу, то есть, нагрузку,  
которая соответствует эффективности ADC. Таким образом, если  
15 сконструированное на основе цистеина антитело содержит только  
одну реакционноспособную тиоловую группу цистеина, то  
20 посредством дендритного линкера может быть присоединено большое  
количество молекул лекарственного средства.

В нижеследующих репрезентативных вариантах, реагенты  
25 дендритного линкера позволяют образовывать конъюгаты с девятью  
нуклеофильными реагентами молекулы лекарственного средства  
30 посредством взаимодействия с хлорэтильными функциональными  
группами азотного аналога горчичного газа:



или

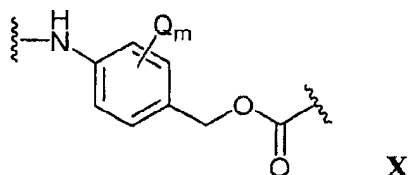


В другом варианте спейсерного элемента, в качестве линкеров в соединениях согласно изобретению могут быть использованы разветвленные дендритные линкеры с самоэлиминирующимися 2,6-бис(гидроксиметил)-п-крезоловыми и 2,4,6-трис(гидроксиметил)-феноловыми дендримерными компонентами (WO 2004/01993; Szalai 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).

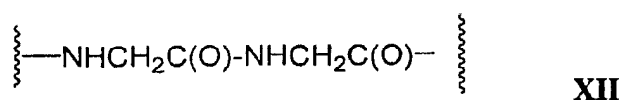
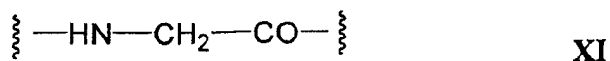
В другом варианте изобретения, молекулы D являются одинаковыми.

В еще одном варианте изобретения, молекулы D являются различными.

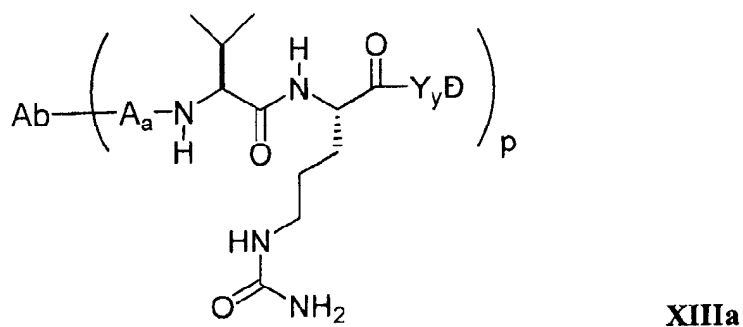
В одном из аспектов изобретения, спейсерные элементы  $(-Y_y-)$  представляют собой соединения формул (X)-(XII):

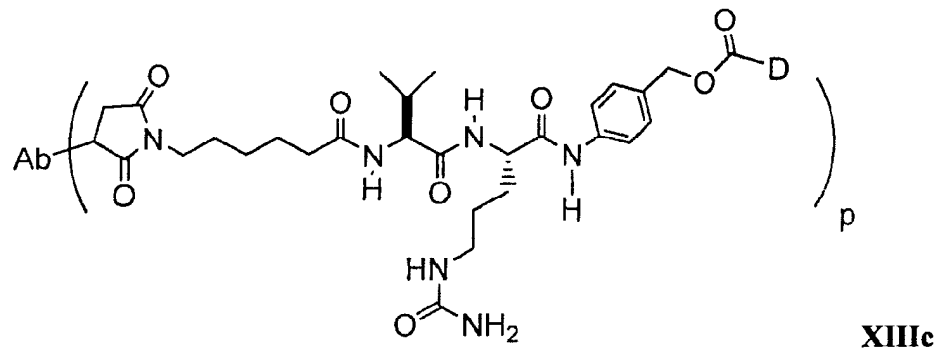
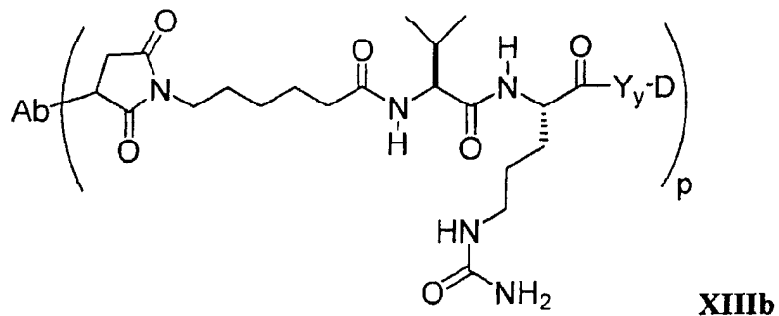


где Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил), -галоген, -нитро или -циано; а m равно целому числу от 0 до 4.



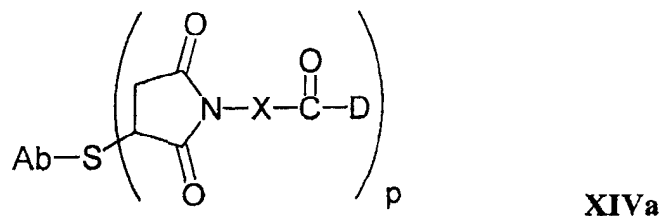
Вариантами соединений-конъюгатов "антитело-лекарственное средство" формулы I являются соединения XIIIa (val-cit), XIIIb (MC-val-cit), XIIIc (MC-val-cit-PAB):



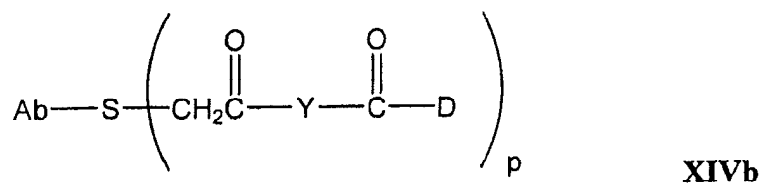


Другими репрезентативными вариантами соединений-конъюгатов  
 "антитело-лекарственное средство" формулы I являются соединения  
 XIVA-e:

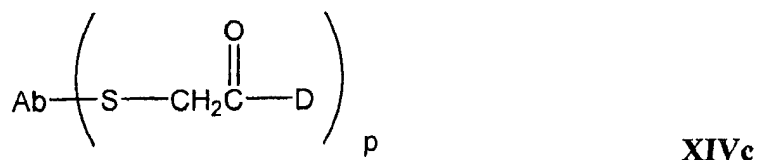
5



10

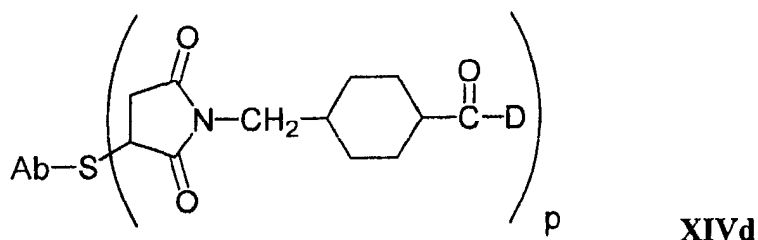


15

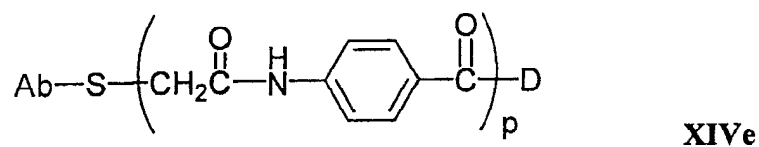


20

25



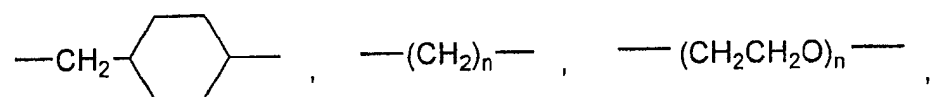
30



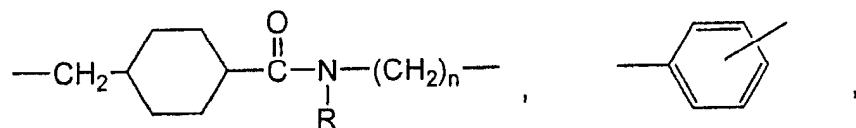
35

где X представляет собой:

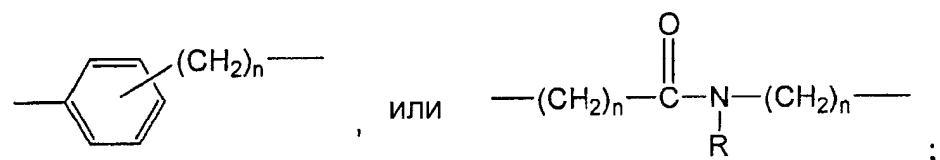
40



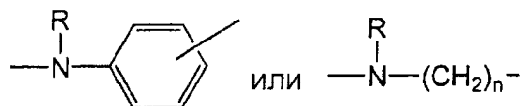
45



50



Y представляет собой:



а R независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub>алкил, и n равно 1–12.

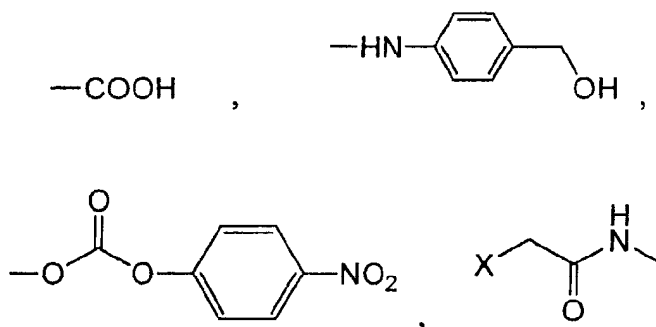
В другом варианте изобретения, линкер имеет реакционноспособную функциональную группу, которая содержит нуклеофильную группу, реагирующую с электрофильной группой, представленной на антителе. Подходящими электрофильными группами, присутствующими на антителе, являются, но не ограничиваются ими, карбонильные группы альдегида и кетона. Гетероатом нуклеофильной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовывать ковалентную связь с молекулой антитела. Подходящими нуклеофильными группами на линкере являются, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, amino, гидразин, тиосемикарбазон, карбоксилат гидразина и арилгидразид. Электрофильная группа на антителе обеспечивает подходящий сайт для присоединения к линкеру.

Обычно, пептидо-подобные линкеры могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть образованы, например, методом синтеза в растворе (E. Schröder & K. Lübke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76–136, Academic Press), хорошо известным специалистам в области пептидной химии.

Линкерные промежуточные соединения могут быть получены с помощью любых комбинаций или последовательностей реакций, в которых участвуют спейсерные, удлиняющие и аминокислотные



компоненты. Такие спейсерные, удлиняющие и аминокислотные компоненты могут содержать реакционноспособные функциональные группы, которые, по своей природе, являются электрофильными, нуклеофильными или свободно-радикальными. Реакционноспособными функциональными группами являются, но не ограничиваются ими,

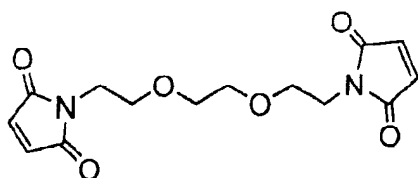
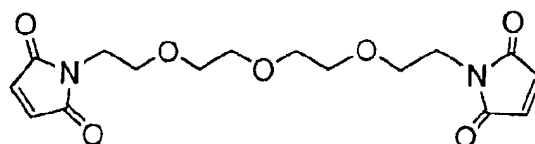


где X представляет собой уходящую группу, например, O-мезил, O-тозил,  $\text{—Cl}$ ,  $\text{—Br}$ ,  $\text{—I}$  или малеимид.

В другом варианте изобретения, указанный линкер может быть замещен группами, модулирующими растворимость или реактивность. Так, например, заряженный заместитель, такой как сульфонат ( $\text{—SO}_3^-$ ) или аммоний, может повышать растворимость реагентов в воде и облегчать реакцию взаимодействия линкерного реагента с антителом или с лекарственным средством, либо облегчать реакцию взаимодействия  $\text{Ab—L}$  (промежуточного соединения "антитело-линкер") с молекулой D, либо  $\text{D—L}$  (промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер") с Ab, в зависимости от способа синтеза, применяемого для получения ADC.

Соединения согласно изобретению, в частности, включают, но не ограничиваются ими, ADC, полученный с использованием линкерных реагентов: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS,

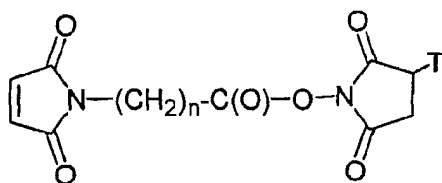
сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, и сульфо-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоата), и с использованием бис-малеимидных реагентов: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub> и BM(PEO)<sub>4</sub>, которые являются коммерчески доступными и поставляются фирмами Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747. См. стр. 467-498, 2003-2004 "Applications Handbook and Catalog". Бис-малеимидные реагенты позволяют последовательно или одновременно присоединять тиоловую группу цистеинового антитела к тиол-содержащей молекуле лекарственного средства, к метке или к линкерному промежуточному соединению. Помимо малеимида, другими функциональными группами, которые реагируют с тиоловой группой цистеинового антитела, молекулой лекарственного средства, меткой или промежуточным линкерным соединением, являются иодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.

BM(PEO)<sub>3</sub>BM(PEO)<sub>4</sub>

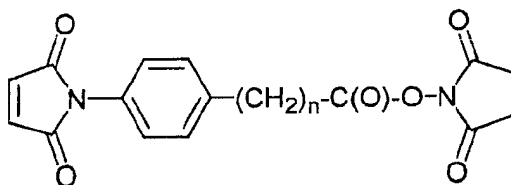
Подходящие линкерные реагенты могут быть также получены из других коммерческих источников, таких как Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), либо они могут быть синтезированы в соответствии с процедурами, описанными Toki et al. (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al. (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186;

в патенте США 6214345; в WO 02/088172; патентных заявках США  
2003130189 и 2003096743; в WO 03/026577; WO 03/043583 и WO  
04/032828.

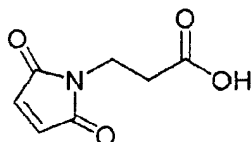
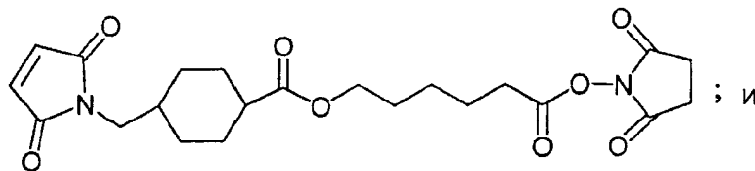
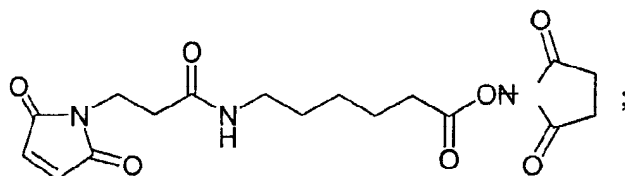
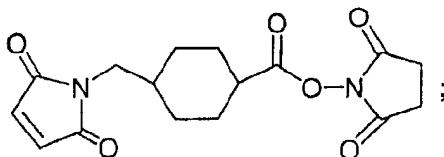
Удлиняющие компоненты формулы IIIa могут быть введены в  
линкер путем взаимодействия нижеследующих линкерных реагентов с  
N-концом аминокислотного компонента:



где n равно целому числу от 1 до 10, а T представляет собой  
-H или -SO<sub>3</sub>Na;

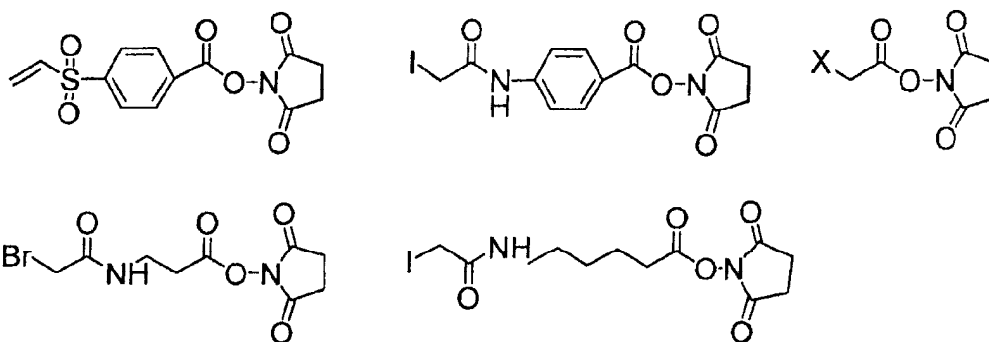


где n равно целому числу от 0 до 3;

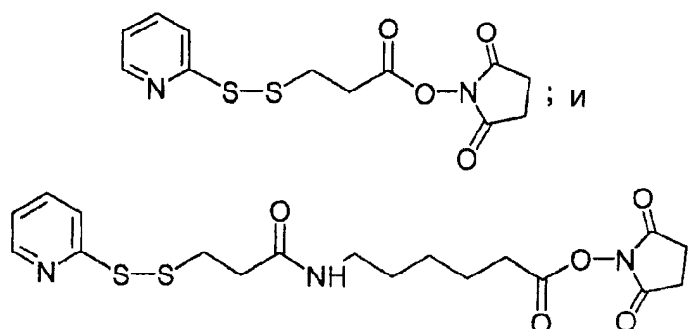


Удлиняющие элементы могут быть введены в линкер посредством

реакции взаимодействия нижеследующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного элемента:



где X представляет собой Br или I. Удлиняющие элементы указанной формулы могут быть также введены в линкер посредством реакции взаимодействия нижеследующих бифункциональных реагентов с N-концом аминокислотного элемента:

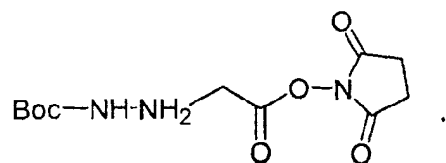
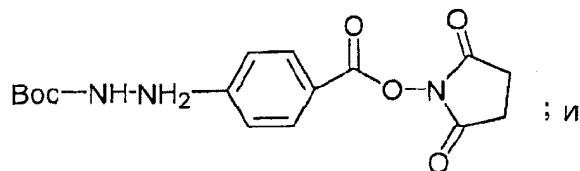


35 Удлиняющие элементы формулы (Va) могут быть введены в линкер посредством реакции взаимодействия нижеследующих промежуточных соединений с N-концом аминокислотного элемента:

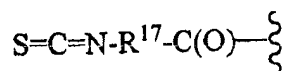
40

45

50

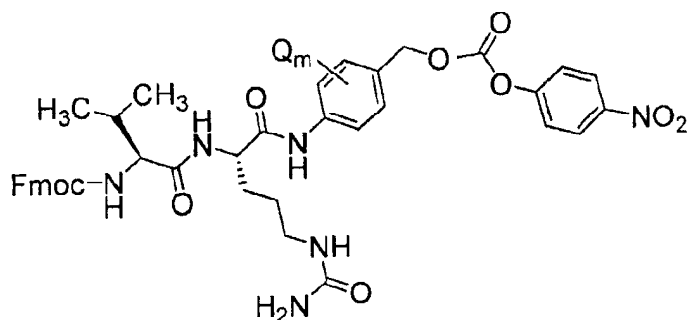


Изотиоцианатные удлиняющие элементы формулы, приведенной  
ниже, могут быть получены из хлорангидрида  
изотиоцианатокарбоновой кислоты, как описано в работе Angew.  
Chem., (1975) 87(14), 517.



где  $\text{R}^{17}$  имеет значения, указанные выше.

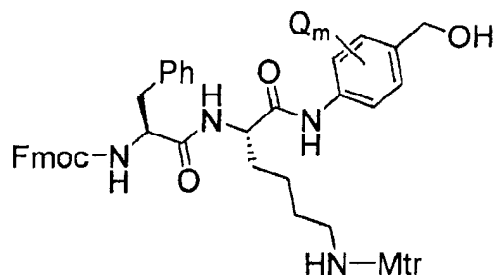
Репрезентативный дипептидный линкерный реагент валин-  
цитруллин (val-cit или vc), включающий малеимидный удлиняющий  
элемент и пара-аминобензилкарбамоильный (PAB)  
самозелиминирующийся спейсер, имеет структуру:



где Q представляет собой  $-\text{C}_1-\text{C}_8$ алкил,  $-\text{O}-$ ( $\text{C}_1-\text{C}_8$ алкил),  
-галоген, -нитро или -циано; а m равно целому числу от 0 до 4.

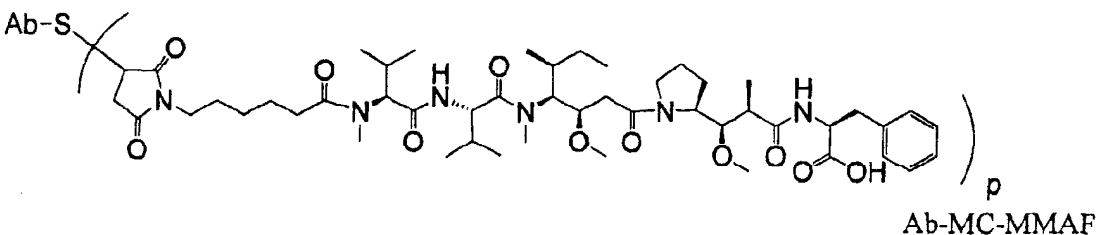
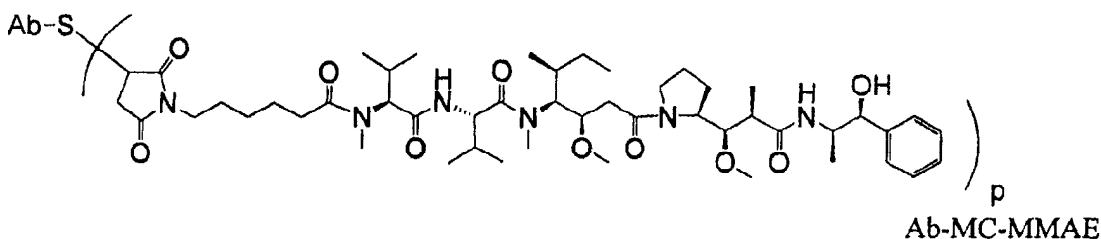
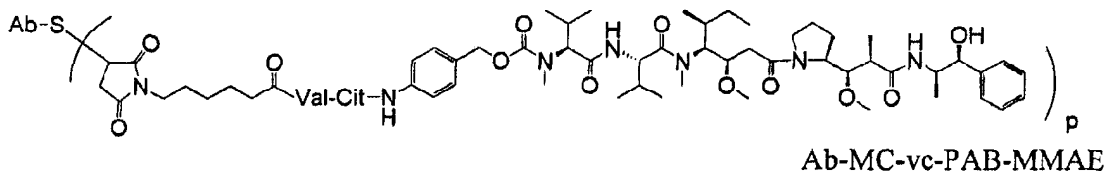
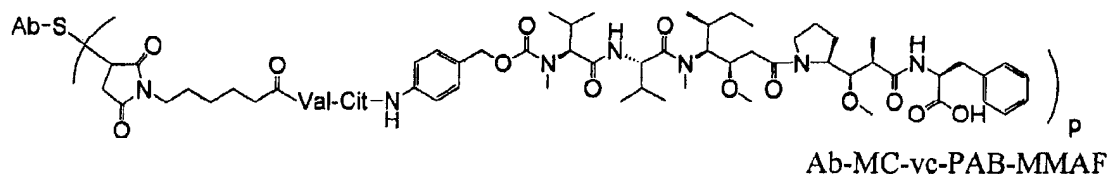
Репрезентативный phe-lys(Mtr)-дипептидный линкерный  
реагент, включающий малеимидный удлиняющий элемент и пара-

аминобензильный самоэлиминирующий спейсерный элемент, может  
 быть получен как описано в работе Dubowchik, et al. (1997)  
 5 Tetrahedron Letters, 38:5257-60, и имеет структуру:

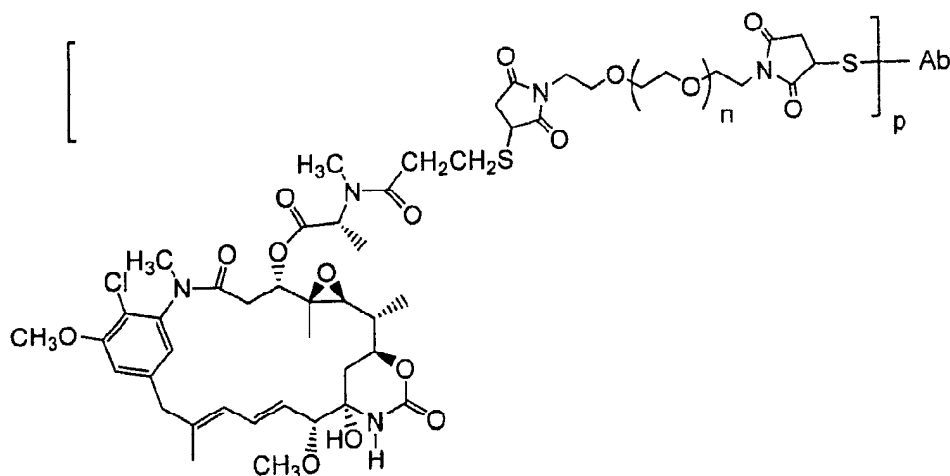


15 где Mtr представляет собой моно-4-метокситритил, Q  
 представляет собой  $-C_1-C_8$ алкил,  $-O-(C_1-C_8$ алкил), -галоген, -нитро  
 или -циано; а m равно целому числу от 0 до 4.

20 Репрезентативными соединениями-конъюгатами "антитело-  
 лекарственное средство" согласно изобретению являются:



где Val представляет собой валин; Cit представляет собой  
 цитруллин;  $p$  равно 1, 2, 3, или 4; а Ab представляет собой  
 сконструированное на основе цистеина антитело. Другой  
 репрезентативный конъюгат "антитело-лекарственное средство", где  
 молекула майтанзиноидного лекарственного средства DM1 связана  
 посредством линкера BMPEO с тиоловой группой трастузумаба, имеет  
 структуру:



где Ab представляет собой сконструированное на основе  
 цистеина антитело;  $n$  равно 0, 1 или 2; а  $p$  равно 1, 2, 3 или 4.

#### ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ "АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"

ADC формулы I могут быть получены несколькими способами с  
 применением реакций органического синтеза, условий и реагентов,  
 известных специалистам, включая: (1) реакцию взаимодействия  
 цистеиновой группы сконструированного на основе цистеина  
 антитела с линкерным реагентом с образованием промежуточного  
 соединения "антитело-линкер" Ab-L посредством ковалентной связи,  
 и последующую реакцию взаимодействия с активированной молекулой  
 лекарственного средства D; и (2) реакцию взаимодействия  
 нуклеофильной группы молекулы лекарственного средства с

линкерным реагентом с образованием промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер" D-L посредством ковалентной связи, и последующую реакцию взаимодействия с цистеиновой группой антитела, сконструированного на основе цистеина. В методах конъюгирования (1) и (2), для получения конъюгатов "антитело-лекарственное средство" формулы I могут быть использованы различные сконструированные на основе цистеина антитела, молекулы лекарственного средства и линкеры.

Тиоловые группы цистеина антитела являются нуклеофильными и обладают способностью взаимодействовать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных реагентах и на промежуточных соединениях "лекарственное средство-линкер", включая (i) активные сложные эфиры, такие как NHS-эфиры, HOBT-эфиры, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеимидные группы; и (iv) дисульфиды, включая пиридилдисульфиды, образующиеся в результате сульфидного обмена. Нуклеофильными группами на молекуле лекарственного средства являются, но не ограничиваются ими, аминовые, тиоловые, гидроксильные, гидразидные, оксимные, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать с электрофильными группами на линкерных частях и линкерных реагентах с образованием ковалентных связей.

Майтанзин может быть, например, превращен в May-SSCH<sub>3</sub>, который может быть восстановлен до свободного тиола May-SH, и подвергнут реакции с модифицированным антителом (Chari et al.



(1992) Cancer Research 52:127-131) с получением иммуноконъюгата "майтанзиноид-антитело" с дисульфидным линкером. Конъюгаты "антитело-майтанзиноид" с дисульфидными линкерами были описаны в литературе (WO 04/016801; патент США 6884874; заявка на патент США 2004/039176 A1; WO 03/068144; заявка на патент США 2004/001838 A1; патенты США 6441163, 5208020, 5416064; WO 01/024763). Дисульфидный линкер SPP конструируют с использованием линкерного реагента N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноата.

В определенных условиях, сконструированные на основе цистеина антитела, способные образовывать конъюгаты с линкерными реагентами, могут быть получены, путем обработки восстановителем, таким как DTT (реагент Клиланда, дитиотреитол) или TCEP (гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Полноразмерные сконструированные на основе цистеина моноклональные антитела (тио-Mabs), экспрессируемые в клетках CHO, подвергают реакции восстановления примерно с 50-кратным избытком TCEP в течение 3 часов при 37°C для восстановления дисульфидных связей, которые могут образовываться между вновь введенными цистеиновыми остатками и цистеином, присутствующим в культуральной среде. Восстановленный тио-Mab разводят и загружают на колонку HiTrap S в 10 mM ацетата натрия, pH 5, и элюируют PBS, содержащим 0,3M хлорид натрия. Дисульфидные связи между цистеиновыми остатками, присутствующими в родительском Mab, снова восстанавливают с использованием разведенного (200 нМ) водного сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>) при комнатной температуре в

течение ночи. Могут быть также использованы и другие окислители, то есть, окисляющие агенты, и условия окисления, известные специалистам. Эффективным также является окисление на воздухе. Такая стадия мягкого неполного повторного окисления с высокой степенью надежности способствует образованию внутрицепевых дисульфидов. Затем добавляют приблизительно 10-кратный избыток промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер", например,  $\text{BM}(\text{PEO})_4\text{-DM1}$ , перемешивают и оставляют на 1 час при комнатной температуре для осуществления конъюгирования с образованием конъюгата "антитело тио-Mab-лекарственное средство". Затем конъюгированную смесь подвергают гель-фильтрации, загружают на колонку HiTrap S и элюируют с этой колонки для удаления избытка промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер" и других примесей.

На фигуре 15 проиллюстрирован общий способ получения сконструированного на основе цистеина антитела, экспрессируемого в клеточной культуре, для последующего конъюгирования. Цистеиновые аддукты, предположительно, вместе с различными межцепевыми дисульфидными связями, подвергают восстановительному расщеплению с получением восстановленной формы антитела. Межцепевые дисульфидные связи, расположенные между связанными цистеиновыми остатками, снова образуются в условиях неполного окисления, таких как воздействие атмосферного кислорода. Вновь введенные, сконструированные и несвязанные цистеиновые остатки становятся доступными для реакции с линкерными реагентами или промежуточными соединениями "лекарственное средство-линкер", в результате чего образуются

конъюгаты антител согласно изобретению. Тио-Mab, экспрессируемые в клеточных линиях млекопитающих, образуют внешний Cys-аддукт, конъюгированный с введенным Cys посредством образования -S-S-связи. Следовательно, очищенные тио-Mab должны быть подвергнуты восстановлению и окислению как описано в примере 11, с получением реакционноспособных тио-Mab. Эти тио-Mab используют для получения конъюгата с малеимидом, содержащего цитотоксические лекарственные средства, флуорофоры и другие метки.

Был получен ряд конъюгатов "антитело тио-Fab и тио-Mab-лекарственное средство" (примеры 4-8). Цистеиновый мутант hu4D5Fabv8 (V110C) конъюгировали с майтанзиноидным лекарственным средством DM1 и с бис-малеимидо-линкерным реагентом BMPEO с получением hu4D5Fabv8 (V110C)-BMPEO-DM1 (пример 8).

#### **Анализы на пролиферацию клеток *in vitro***

В общих чертах, цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата "антитело-лекарственное средство" (ADC) измеряют путем обработки клеток млекопитающих, имеющих рецепторные белки, например, HER2, антителом конъюгата ADC в среде для культивирования клеток; культивирования клеток в течение периода времени примерно от 6 часов до 5 дней; и определения жизнеспособности клеток. Такие *in vitro* анализы с использованием клеток применяют для оценки жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индуцирования апоптоза (активации каспазы) клеток под действием ADC согласно изобретению.

*In vitro*-эффективность конъюгатов "антитело-лекарственное

средство" измеряют с помощью анализа на пролиферацию клеток (фигуры 10 и 11, пример 9). Анализ на жизнеспособность клеток на основе люминесценции (CellTiter-Glo®) является коммерчески доступным (Promega Corp., Madison, WI) и представляет собой однородный анализ, проводимый методом рекомбинантной экспрессии люциферазы *Coleoptera* (патенты США №№ 5583024; 5674713 и 5700670). Этот анализ на пролиферацию клеток позволяет определить число жизнеспособных клеток в культуре исходя из количественной оценки присутствующего АТР, который является индикатором метаболически активных клеток (Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США № 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводят в формате 96-луночного планшета, что позволяет осуществлять автоматический высокоэффективный скрининг (HTS) (Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Однородная аналитическая процедура предусматривает добавление одного реагента (реагента CellTiter-Glo®) непосредственно в клетки, культивированные в среде с добавлением сыворотки. При этом, не требуется проведения стадий промывки клеток, удаления среды и множества стадий пипетирования. Эта система позволяет детектировать, по меньшей мере, 15 клеток/лунку в 384-луночном планшете через 10 минут после добавления реагента и смешивания. Эти клетки могут быть непрерывно обработаны ADC, или они могут быть обработаны и отделены от ADC. В общих чертах, обработка клеток в течение непродолжительного периода времени, то есть, в течение 3 часов, дает такой же результат, как и непрерывная обработка клеток.

Однородный анализ, осуществляемый в формате "добавление -

смешивание - измерение", приводит к лизису клеток и к  
 генерированию люминесцентного сигнала, пропорционального  
 количеству присутствующего АТР. Количество АТР прямо  
 пропорционально числу клеток, присутствующих в культуре. В  
 анализе CellTiter-Glo® генерируется люминесцентный сигнал типа  
 "свечения", продуцируемый люциферазной реакцией, которая имеет  
 время полужизни более чем пять часов, в зависимости от типа  
 клеток и используемой среды. Жизнеспособные клетки определяют в  
 относительных единицах люминесценции (RLU). Субстрат, люциферин  
 жуков, подвергается окислительному декарбоксилированию под  
 действием рекомбинантной люциферазы светляков с одновременным  
 превращением АТР в АМР и генерированием фотонов. Продолжительное  
 время полужизни люциферазы позволяет избежать необходимости  
 использования инжекторов для ввода реагентов и обеспечивает  
 возможность осуществления непрерывной или периодической  
 обработки множества планшетов. Такой анализ на пролиферацию  
 клеток может быть проведен в различных многолуночных планшетах,  
 например, в 96-луночном или в 384-луночном планшете. Данные  
 могут быть зарегистрированы с помощью люминометра или  
 визуализирующей камеры на основе ПЗС. Выход люминесценции  
 представлен в относительных световых единицах (RLU), измеряемых  
 в зависимости от времени. Альтернативно, фотоны, излучаемые при  
 люминесценции, могут быть подсчитаны в сцинтилляционном счетчике  
 в присутствии сцинтиллятора. Количество светового излучения  
 может быть выражено в им./с (импульсов в секунду):



Антипролиферативные эффекты конъюгатов "антитело-  
 лекарственное средство" измеряют по пролиферации клеток в  
 описанном выше *in vitro* анализе на цитолиз клеточных линий  
 опухоли молочной железы SK-BR-3 (фигуры 10 и 11). Для клеток SK-  
 BR-3, в которых, как известно, наблюдается сверхэкспрессия белка  
 рецептора HER2, были определены величины  $IC_{50}$  для ADC.

На фигуре 10 показано, что трастузумаб-SMCC-DM1 ( $IC_{50}=0,008-0,015$  мкг/мл) является более эффективным, чем конъюгат  
 "цистеиновый мутант тяжелой цепи hu4D5Fabv8 -(A121C)-BMPEO-DM1"  
 ( $IC_{50}=0,04$  мкг/мл). Оба конъюгата являются более эффективными в  
 отношении цитолиза клеток, чем один трастузумаб ( $IC_{50}=0,1$   
 мкг/мл). Загрузка лекарственного средства для конъюгата  
 трастузумаб-SMCC-DM1 составляла 2,8 DM1/Ab, а для hu4D5Fabv8  
 (A121C)-BMPEO-DM1 она составляла 0,6 DM1/Ab.

На фигуре 11 показано, что трастузумаб-SMCC-DM1 ( $IC_{50}=0,008-0,015$  мкг/мл) является более эффективным, чем конъюгат  
 "цистеиновый мутант легкой цепи hu4D5Fabv8 -(V110C)-BMPEO-DM1"  
 ( $IC_{50}=0,07$  мкг/мл). Оба конъюгата являются более эффективными в  
 отношении цитолиза клеток, чем один трастузумаб ( $IC_{50}=0,1$   
 мкг/мл). Загрузка лекарственного средства для конъюгата  
 трастузумаб-SMCC-DM1 составляла 2,8 DM1/Ab, а для hu4D5Fabv8  
 (V110C)-BMPEO-DM1 она составляла 0,9 DM1/Ab.

Конъюгаты полноразмерного IgG тио-Mab тестировали на *in vitro*  
 эффективность пролиферации клеток и сравнивали с  
 родительскими антителами. На фигуре 20 представлены результаты  
 анализа клеток SK-BR-3, обработанных: родительским антителом  
 трастузумабом (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.); конъюгатом

трастузумаб-SMCC-DM1 с загрузкой лекарственного средства примерно 3,4 DM1/Ab; и тиио-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1 с загрузкой лекарственного средства примерно 1,6 DM1/Ab. Конъюгат трастузумаб-SMCC-DM1 присоединяли к антителу посредством реагирующего с аминокгруппой NHS-эфир-содержащего линкерного реагента SMCC, а конъюгат тиио-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1 присоединяли посредством реагирующего с тиоловой группой малеимидного линкерного реагента BMPEO. Оба конъюгата были эффективными по отношению к клеткам SK-BR-3 и обнаруживали сравнимую активность, тогда как трастузумаб не обладал цитотоксическим действием. На фигуре 21A представлены результаты анализа клеток HT 1080EphB2, обработанных родительским анти-EphB2R антителом 2H9 и конъюгатом тиио-2H9 (A121C) BMPEO-DM1. На фигуре 21B представлены результаты анализа клеток BT 474, обработанных родительским анти-EphB2R антителом 2H9 и конъюгатом тиио-2H9 (A121C) BMPEO-DM1. Конъюгат тиио-Mab 2H9 был более эффективным по отношению к клеткам HT 1080EphB2 и BT 474, чем конъюгат родительского антитела 2H9. Конъюгат тиио-2H9-BMPEO-DM1 обнаруживал функциональную цитолитическую активность по отношению к EphB2-специфической клеточной линии (HT1080EphB2), тогда как по отношению к клеточной линии, которая не является EphB2-специфической клеточной линией, а именно, BT474, наблюдалась лишь маргинальная активность.

Проводили сравнение конъюгатов "антитело-лекарственное средство", где указанным антителом является родительское антитело и сконструированное на основе цистеина антитело. На фигуре 22 представлены результаты анализа клеток PC3/neo,

обработанных конъюгатом анти-MUC16 антитело 3A5-SMCC-DM1; и тимо-  
3A5 (A121C) BMPEO-DM1. На фигуре 23 представлены результаты  
5 анализа клеток PC3/MUC16, обработанных конъюгатом анти-MUC16  
антитело 3A5-SMCC-DM1; и тимо-3A5 (A121C) BMPEO-DM1. На фигуре 24  
представлены результаты анализа клеток OVCAR-3, обработанных  
10 конъюгатом анти-MUC16 антитело 3A5-SMCC-DM1; и тимо-3A5 (A121C)  
BMPEO-DM1. Конъюгат тимо-3A5-BMPEO-DM1 не обнаруживал какой-либо  
15 значимой цитолитической активности по отношению к контрольной  
клеточной линии PC3/neo, тогда как конъюгат 3A5-SMCC-DM1  
обнаруживал значимую активность по отношению к клеточной линии  
20 PC3/MUC16. Конъюгат тимо-3A5-DM1 также обнаруживал активность по  
отношению к клеткам OVCAR-3, экспрессирующим эндогенный антиген  
MUC16.

#### IN VIVO ЭФФЕКТИВНОСТЬ

*In vivo*-эффективность двух конъюгатов "альбумин-связывающий  
30 пептид-DM1 (майтаниноид)-антитело-лекарственное средство" (ADC)  
согласно изобретению определяли с использованием мышиной модели  
с трансгенным эксплантатом, экспрессирующим высокие уровни HER2  
35 (фигура 12, пример 10). Аллотрансплантат получали от трансгенной  
мыши с Fo5-MMTV, невосприимчивой или плохо восприимчивой к  
40 терапии HERCEPTIN®. Мышей один раз обрабатывали конъюгатом ABP-  
rhuFab4D5-cys(легкая цепь)-DM1; конъюгатом ABP-rhuFab4D5-  
cys(тяжелая цепь)-DM1; и плацебо, то есть, контрольным PBS-  
45 буфером (носитель), и проводили мониторинг в течение 3 недель  
для определения времени, прошедшего до того момента, когда  
50 размер опухоли увеличивался в два раза; вычисления log  
клеточного цитолиза и определения уровня сокращения опухоли.



Образец	Доза	Ti	PR	CR	TDV (дни)
Носитель (PBS-буфер)		7/7	0/7	0/7	3
ABP-rhuFab4D5- V110C(легкая цепь)- DM1 (0,9 DM1/Ab)	25 мг/кг (1012 мкг/м <sup>2</sup> DM1)	7/7	1/7	0/7	14
ABP-rhuFab4D5- A121C(тяжелая цепь)- DM1 (0,6 DM1/Ab);	37,5 мг/кг (1012 мкг/м <sup>2</sup> DM1)	7/7	4/7	0/7	16

Термин Ti означает число животных в исследуемой группе с опухолью при T=0/общее число животных в группе. Термин PR означает число животных с частичной ремиссией опухоли/число животных с опухолью при T=0 в данной группе. Термин CR означает число животных с полной ремиссией опухоли/число животных с опухолью при T=0 в данной группе. Термин TDV означает время, прошедшее до увеличения размера опухоли в два раза, то есть, время в днях, за которое объем контрольной опухоли увеличивался в два раза.

Все семь мышей, обработанных 25 мг/кг (1012 мкг/м<sup>2</sup> DM1) конъюгата ABP-rhuFab4D5-cys(легкая цепь)-DM1, имели опухоли, и лишь у одного животного наблюдалась частичная ремиссия через 20 дней. Все семь мышей, обработанных 37,5 мг/кг (1012 мкг/м<sup>2</sup> DM1) конъюгата ABP-rhuFab4D5-cys(тяжелая цепь)-DM1, имели опухоли, и лишь у четырех животных наблюдалась частичная ремиссия через 20 дней.

Вариант полноразмерного антитела IgG тио-Mab, в который была введена цистеиновая мутация A121C и который был конъюгирован с линкером BMPEO и с молекулой лекарственного

средства DM1, тестировали по сравнению с конъюгатом "родительское антитело трастузумаб - SMCC-DM1", введенным мышам, несущим MMTV-HER2 Fo5-опухоль. В день инъекции 0, размер опухоли составлял примерно 100-200 мм. На фигуре 25 показано изменение среднего объема опухоли за 21 день у бестимусных "голых" с аллотрансплантатом опухоли молочной железы MMTV-HER2 Fo5 после введения на день 0 одной дозы: носителя (буфера); трастузумаб-SMCC-DM1, 10 мг/кг; тимо-трастузумаба (A121C)-SMCC-DM1, 21 мг/кг и тимо-трастузумаба (A121C)-SMCC-DM1, 10 мг/кг.

Образец	Доза	Ti	PR	CR
Носитель (PBS-буфер)		10/10	0/10	0/10
трастузумаб-SMCC-DM1, 3,4 DM1/Ab	10 мг Ab/кг/мышь (490 мкг/м <sup>2</sup> DM1)	10/10	7/10	0/10
тимо-трастузумаб (A121C) - BMPEO-DM1, 1,6 DM1/Ab;	21 мг Ab/кг/мышь (496 мкг/м <sup>2</sup> DM1)	8/10	6/10	4/10
тимо-трастузумаб (A121C) - BMPEO-DM1, 1,6 DM1/Ab;	10 мг Ab/кг/мышь (236 мкг/м <sup>2</sup> DM1)	10/10	0/10	0/10

Как видно на фигуре 25, каждый конъюгат обнаруживает значимый эффект, направленный на замедление роста опухоли по сравнению с плацебо (носитель). Каждой из десяти мышей в четырех вышеуказанных группах вводили одну инъекцию на день 1. При этом, загружали конъюгат "родительское антитело трастузумаб-SMCC-DM1", в котором количество молекул лекарственного средства в два раза (3,4 DM1/Ab) превышало количество лекарственного средства, присутствующего в конъюгате "сконструированный на основе цистеина тимо-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1" (1,6 DM1/Ab). Таким

образом, эффективные количества DM1 в конъюгате "родительское антитело трастузумаб-SMCC-DM1" и в конъюгате тию-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1, вводимом в более высокой дозе (21 мг Ab), были примерно одинаковыми. Эти два образца обнаруживали наибольшую эффективность. Через 14 дней после инъекции, у большинства животных, которым вводили эти конъюгаты, наблюдалась частичная или полная ремиссия. Более низкая эффективность более низкой дозы образца конъюгата "тио-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1" подтверждала зависимость ответа от дозы DM1. Конъюгат "тио-трастузумаб-DM1" вводит дозу антитела (10 мг/кг) или лекарственного средства DM1 (21 мг/кг) в количестве, эквивалентном количеству, вводимому контрольным конъюгатом "трастузумаб-SMCC-DM1". Как видно на фигуре 25, конъюгат тию-BMPEO-DM1 (21 мг/кг) давал несколько лучший ответ, чем конъюгат трастузумаб-SMCC-DM1, о чем свидетельствовал тот факт, что у некоторых животных наблюдался полный ответ на тию-mab-DM1, и лишь частичный ответ на трастузумаб-SMCC-DM1.

#### **ВВЕДЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ "АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"**

Конъюгаты "антитело-лекарственное средство" (ADC) согласно изобретению могут быть введены любым способом, подходящим для лечения конкретного состояния. ADC обычно вводят парентерально, то есть, путем вливания, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, интратекально и эпидурально.

#### **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

Фармацевтические композиции терапевтических конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC) согласно изобретению обычно получают в виде препаратов, представляющих собой

унифицированные лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, то есть, для введения ударной дозы, внутривенного введения, внутриопухолевой инъекции в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения. Конъюгат "антитело-лекарственное средство" (ADC), имеющий нужную степень чистоты, смешивают, но необязательно, с физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), с получением препарата в виде лиофилизованной композиции или водного раствора.

Приемлемые разбавители, носители, наполнители или стабилизаторы в используемых дозах и концентрациях должны быть нетоксичными для реципиентов, и ими являются буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенолоспирт, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (имеющие примерно менее, чем 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, тистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трепалоза или сорбит; солеобразующие

противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные  
5 вещества, такие как твин<sup>TM</sup>, плюроник<sup>TM</sup> или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Так, например, лиофилизированные композиции анти-ErbB2 антитела описаны в заявке WO 97/04801, которая во всей своей  
10 полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Активные фармацевтические ингредиенты могут быть также  
15 заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулы и в  
20 полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в системы для доставки коллоидальных лекарственных средств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и  
25 нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такая методика описана в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).  
30

Могут быть получены препараты пролонгированного  
высвобождения. Подходящими примерами препаратов  
35 пролонгированного высвобождения являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих ADCC, где указанные матрицы имеют форму готовых изделий, например, пленок или  
40 микрокапсул. Примерами матриц пролонгированного высвобождения являются полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-  
45 гидроксипропилметакрилат) или поливиниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  
гамма-этил-L-глутамата, неразлагаемый сополимер этилена-  
50 винилацетата, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой

кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Композиции, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильными, что может быть легко достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Указанными композициями являются композиции, подходящие для введения вышеуказанными способами. Такие композиции могут быть легко приготовлены в виде унифицированной лекарственной формы методами, хорошо известными специалистам-фармацевтам. Общее описание таких методов и композиций можно найти в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Указанные методы включают стадию смешивания активного ингредиента с носителем, который содержит один или несколько дополнительных ингредиентов. В общих чертах, такие композиции получают путем равномерного и тщательного смешивания активного ингредиента с жидкими носителями или с тонкоизмельченными твердыми носителями, или с теми и с другими, с последующим формованием продукта, если это необходимо.

Водные суспензии согласно изобретению содержат активные вещества в смеси с наполнителями, подходящими для получения водных суспензий. Такими наполнителями являются суспендирующий агент, такой как натрий-содержащая карбоксиметилцеллюлоза, кросскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропил-метилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь, и диспергирующие или смачивающие агенты, такие как природный фосфатид (например,

лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксицетанол), и продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром, происходящим от жирной кислоты и ангидрида гексита (например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана). Водная суспензия может также содержать один или несколько консервантов, таких как этил- или н-пропил-п-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, один или несколько ароматизаторов и один или несколько подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

Фармацевтические композиции ADC могут быть приготовлены в виде стерильных препаратов для инъекций, таких как стерильная водная или масляная суспензия для инъекций. Эта суспензия может быть получена известными методами с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, упомянутых выше. Стерильным препаратом для инъекций может быть также стерильный раствор или суспензия для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, такой как раствор в 1,3-бутандиоле или раствор, полученный в виде лиофилизованного порошка. Подходящими носителями и растворителями, которые могут быть использованы, являются вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используются стерильные жирные масла. Для этих целей может быть использовано любое мягкое жирное масло, включая синтетические моно- и диглицериды. Кроме того, препараты для инъекций могут также содержать жирные кислоты, такие как

олеиновая кислота.

Количество активного ингредиента, которое может быть  
5 смешано с материалом носителя для получения разовой  
лекарственной формы, может варьироваться в зависимости от  
конкретного хозяина, подвергаемого лечению, и конкретного  
10 способа введения. Так, например, водный раствор, предназначенный  
для внутривенного вливания, может содержать примерно от 3 до 500  
мкг активного ингредиента на миллилитр раствора, так, чтобы  
15 обеспечивался подходящий объем вливания со скоростью примерно 30  
мл/ч.

20 Композициями, подходящими для парентерального введения,  
являются водные и безводные стерильные растворы для инъекций,  
которые могут содержать антиоксиданты, бактериостаты и  
25 растворимые вещества, которые сообщают данной композиции  
изотоничность с кровью реципиента, и водные и безводные  
стерильные суспензии, которые включают суспендирующие и  
30 загущающие агенты.

Хотя пероральное введение терапевтических белков является  
35 нежелательным из-за их гидролиза или денатурации в кишечнике,  
однако, композиции ADC, подходящие для перорального введения,  
могут быть получены в виде дискретных лекарственных форм, таких  
40 как капсулы, каше или таблетки, содержащие предварительно  
определенное количество ADC.

45 Такие композиции могут быть упакованы в емкости для  
одноразового или многократного приема, например, в запайные  
ампулы и флаконы, и могут храниться в замороженном  
50 (лиофилизированном) состоянии, а затем, непосредственно перед



инъекцией, в эти композиции необходимо лишь добавить стерильный жидкий носитель, например, воду. Растворы и суспензии для  
5 немедленного приема получают из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее. Предпочтительными лекарственными препаратами для однократного приема являются препараты,  
10 содержащие суточную дозу или унифицированную суточную субдозу, описанную выше, или соответствующую фракцию активного  
15 ингредиента.

Настоящее изобретение также относится к ветеринарным композициям, содержащим, по меньшей мере, один активный  
20 ингредиент, определенный выше, в комбинации с ветеринарно-приемлемым носителем. Такими ветеринарно-приемлемыми носителями являются вещества, подходящие для соответствующего введения  
25 указанной композиции, и такие носители могут представлять собой твердые, жидкие или газообразные вещества, которые в той или иной степени являются инертными или приемлемыми для  
30 использования в ветеринарии, а также совместимыми с активным ингредиентом. Такие ветеринарные композиции могут быть введены  
35 парентерально, перорально или любым другим подходящим способом.

#### **ЛЕЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОМ "АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"**

Предполагается, что конъюгаты "антитело-лекарственное  
40 средство" (ADC) согласно изобретению могут быть использованы для лечения различных заболеваний или расстройств,  
45 характеризующихся, например, сверхэкспрессией опухолевого антигена. Репрезентативными состояниями или  
50 гиперпролиферативными расстройствами являются доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз и лимфоидные злокачественные

заболевания. Другими заболеваниями являются расстройства, ассоциированные с нарушением функций нервных клеток, глиальных клеток, гипоталамуса, железистых клеток, макрофагов, эпителия, стромы и бластоцеля, а также воспалительные, антигенные и иммунологические расстройства, включая аутоиммунные расстройства.

ADC-соединения, которые были идентифицированы у животных-моделей и в клеточных анализах, могут быть дополнительно протестированы у высших приматов, имеющих опухоли, и в клинических испытаниях с участием человека. Клинические испытания с участием человека могут быть разработаны по аналогии с клиническими испытаниями, в которых проводят тест на эффективность моноклонального анти-HER2 антитела HERCEPTIN® у пациентов, страдающих HER2-сверхэкспрессирующей раковой опухолью молочной железы с метастазами и прошедших предварительную интенсивную противораковую терапию, описанную Baselga et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744. Клинические испытания могут быть разработаны для оценки эффективности ADC в комбинации с известными терапевтическими схемами лечения, такими как лучевая терапия и/или химиотерапия с использованием известных химиотерапевтических и/или цитотоксических средств.

В общих чертах, заболеванием или расстройством, подвергаемым лечению, является гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примерами подвергаемого лечению рака согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз или лимфоидные злокачественные заболевания. Более конкретными примерами таких

раковых заболеваний являются плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая  
5 мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легких; рак брюшины; гепатоцеллюлярный рак; рак желудка, включая рак  
10 желудочно-кишечного тракта; рак поджелудочной железы; глиобластома; рак шейки матки; рак яичника; рак печени; рак мочевого пузыря; гепатома; рак молочной железы; рак толстой кишки; рак прямой кишки; рак ободочной кишки; карцинома  
20 эндометрия или матки; карцинома слюнных желез; рак почек; рак предстательной железы; рак вульвы; рак щитовидной железы; карцинома печени; карцинома заднего прохода; карцинома пениса; а также рак головы и шеи.

Раковая опухоль может включать HER2-экспрессирующие клетки, с которыми может связываться ADC согласно изобретению. Для  
30 определения уровней экспрессии ErbB2 в раковой опухоли могут быть проведены различные диагностические/прогностические анализы. В одном из вариантов изобретения, уровень  
35 сверхэкспрессии ErbB2 может быть проанализирован с помощью ИНС (иммуногистологического анализа), например, с использованием HERCEPTEST (Dako). Залитые в парафин срезы тканей, взятых путем  
40 биопсии опухоли, могут быть подвергнуты ИНС-анализу в соответствии со следующими критериями оценки интенсивности  
45 окрашивания белка ErbB2: оценка 0, окрашивание отсутствует или наблюдается окрашивание мембраны у менее чем 10% опухолевых  
50 клеток; оценка 1+, очень слабое/едва заметное окрашивание мембраны, детектируемое у более чем 10% опухолевых клеток, при

этом, указанные клетки окрашены только в части своей мембраны; оценка 2+, слабое или умеренное окрашивание всей мембраны, наблюдаемое у более чем 10% опухолевых клеток; оценка 3+, умеренное или сильное окрашивание всей мембраны, наблюдаемое у более чем 10% опухолевых клеток. Опухоли, проанализированные на сверхэкспрессию ErbB2 и получившие оценки 0 или 1+, могут быть охарактеризованы как опухоли, в которых не наблюдается сверхэкспрессия ErbB2, а опухоли с оценками 2+ или 3+ могут быть охарактеризованы как опухоли, сверхэкспрессирующие ErbB2.

Альтернативно или дополнительно, анализы FISH, такие как INFORM™ (Ventana Co., Ariz.) или PATHVISION™ (Vysis, Ill.), могут быть осуществлены на фиксированных формалином и залитых в парафин опухолевых тканях для определения уровня сверхэкспрессии ErbB2 (если она присутствует).

Аутоиммунными заболеваниями, для лечения которых могут быть использованы ADC-соединения, являются ревматоидные расстройства (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Сьегрена, склеродермия, волчанка, такие как СКВ и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, антифосфолипидный синдром и псориазный артрит), остеоартрит, аутоиммунные расстройства желудочно-кишечного тракта и печени (такие как воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютеновая энтеропатия), васкулиты (такие как, например, ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Черга-Штраусса, гранулематоз Вегенера и полиартериит),

аутоиммунные нервные болезни (такие как, например, рассеянный склероз, синдром пляшущих глаз, тяжелая миастения, нейромиелит зрительного нерва, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полиневропатии), почечные заболевания (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные кожные болезни (такие как, например, псориаз, крапивница, сыпи, пузырчатка вульгарная, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические заболевания (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрасфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные нарушения слуха (такие как, например, заболевания внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, отторжение трансплантированного органа и аутоиммунные эндокринные расстройства (такие как, например, ассоциированные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)). Более предпочтительно, если такими заболеваниями являются, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанка, рассеянный склероз, синдром Сьегрена, болезнь Грейвса, ИЗСД, пернициозная анемия, тиреоидит и гломерулонефрит.

Для предупреждения или лечения заболевания, выбор соответствующей дозы ADC зависит от типа подвергаемого лечению заболевания, указанного выше, тяжести и течения этого заболевания, от типа молекулы, вводимой в профилактических или

терапевтических целях, от проводимой ранее терапии, от истории болезни пациента и его восприимчивости к данному антителу, а также от назначения лечащего врача. Указанную молекулу соответствующим образом вводят пациенту за один курс или в течение нескольких курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, начальная доза молекулы, назначенной для введения пациенту, составляет примерно 1 мкг/кг - 15 мкг/кг (например, 0,1-20 мг/кг), и эта доза может быть введена в виде разовой дозы или дробных доз, либо она может быть введена путем непрерывного вливания. Типичная суточная доза может составлять примерно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. Репрезентативная доза ADC, вводимая пациенту, составляет примерно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела пациента.

Для повторного введения в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния пациента, лечение может быть продолжено до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое ослабление симптомов заболевания. Репрезентативная схема введения доз включает введение начальной ударной дозы примерно 4 мг/кг, а затем еженедельное введение поддерживающей дозы анти-ErbB2 антитела, составляющей примерно 2 мг/кг. При этом, могут быть применены и другие схемы введения доз. Эффект такой терапии может быть легко прослежен с применением стандартных методов и анализов.

#### **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ**

Конъюгат "антитело-лекарственное средство" (ADC) согласно изобретению может быть объединен со вторым соединением,

обладающим противораковыми свойствами, с получением  
комбинированной фармацевтической композиции, либо он может быть  
5 применен вместе с другими курсами лечения в виде комбинированной  
терапии. Указанное второе соединение такой фармацевтической  
комбинированной композиции или комбинированного курса лечения  
10 обеспечивает дополнительную активность комбинации ADC, при  
условии, что компоненты такой комбинированной комбинации не  
15 оказывают негативного воздействия друг на друга.

Таким вторым соединением может быть химиотерапевтическое  
средство, цитотоксическое средство, цитокин, средство,  
20 ингибирующее рост клеток, противогормональное средство и/или  
средство для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.  
25 Указанные молекулы обычно присутствуют в комбинации в  
количествах, которые являются эффективными для достижения данной  
цели. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC согласно  
30 изобретению, может также содержать терапевтически эффективное  
количество химиотерапевтического средства, такого как ингибитор  
образования тубулина, ингибитор топоизомеразы или ДНК-  
35 связывающий агент.

Другие курсы терапии могут быть объединены с введением  
40 противоракового средства согласно изобретению. Комбинированная  
терапия может быть осуществлена путем одновременного или  
последовательного проведения отдельных курсов лечения. При  
45 последовательном режиме проведения таких курсов, указанная  
комбинация лекарственных средств может быть введена в два этапа  
или в несколько этапов. Такая комбинированная терапия включает  
50 совместное введение отдельных препаратов или одного

фармацевтического препарата, и последующее их введение в любом порядке, предпочтительно, в течение периода времени, за который  
5 оба (или все) активных агента одновременно проявляют свою биологическую активность.

В одном из вариантов изобретения, лечение с использованием  
10 ADC включает комбинированное введение идентифицированного здесь противоракового средства и одного или нескольких химиотерапевтических средств или ингибиторов роста, включая  
15 совместное введение смеси из различных химиотерапевтических средств. Химиотерапевтическими средствами являются таксаны (такие как паклитаксел и доцетаксел) и/или антрациклиновые  
20 антибиотики. Способы получения и схемы введения таких химиотерапевтических средств могут быть проведены в соответствии с инструкциями производителя, либо они могут эмпирически  
25 подобраны специалистом. Способы получения и схемы введения химиотерапевтических средств также описаны в публикации "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

35 ADC может быть объединен с противогормональным соединением, например, антиэстрогенным соединением, таким как тамоксифен; антипрогестероновым соединением, таким как онапристон (EP  
40 616812); или антиандрогеновым соединением, таким как флутамид, в дозах, обычно применяемых для введения таких молекул. Если  
45 раком, подвергаемым лечению, является гормоно-зависимый рак, то пациент может быть предварительно подвергнут антигормональной терапии, а затем, после того, как рак станет гормоно-  
50 независимым, пациенту может быть введен ADC (и необязательно



другие описанные здесь средства). Может также оказаться желательным совместное введение пациенту средства для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (для предупреждения или снижения нарушения функции миокарда, ассоциированного с данной терапией), или одного или нескольких цитокинов. Помимо вышеуказанных терапевтических схем лечения, пациент может быть подвергнут хирургической операции по удалению раковых клеток и/или он может быть подвергнут лучевой терапии.

Подходящими дозами для любых из вышеуказанных совместно вводимых средств являются используемые здесь дозы, и эти дозы могут быть снижены благодаря комбинированному (синергическому) действию новых идентифицированных средств и других химиотерапевтических средств или способов лечения.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и "синергическое действие" активных ингредиентов, то есть, когда эффект, достигаемый в случае совместного использования активных ингредиентов, превышает сумму эффектов, достигаемых при отдельном использовании данных соединений. Синергический эффект может достигаться в том случае, если активные ингредиенты (1) приготовлены в смеси друг с другом и введены или доставлены одновременно в виде комбинированной унифицированной лекарственной формы; (2) доставлены путем поочередного или параллельного введения в виде отдельных препаратов; или (3) доставлены в соответствии с некоторыми другими схемами введения. При введении посредством альтернативной терапии, синергический эффект может быть достигнут в том случае, если указанное соединение вводят или доставляют последовательно, например,

путем различных инъекций в отдельных шприцах. В общих чертах, во время альтернативной терапии, эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть, поочередно, а во время комбинированной терапии, эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

#### **МЕТАБОЛИТЫ КОНЬЮГАТОВ "АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО"**

В объем настоящего изобретения также входят продукты *in vivo* метаболизма описанных здесь ADC-соединений, при условии, что такие продукты являются новыми и неочевидными с точки зрения предшествующего уровня техники. Такие продукты могут быть получены в результате, например, окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, этерификации, ферментативного расщепления указанного вводимого соединения и т.п. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к новым и неочевидным соединениям, полученным способом, включающим контактирование соединения согласно изобретению с организмом млекопитающего в течение периода времени, достаточного для получения продукта его метаболизма.

Продукты метаболизма обычно идентифицируют путем получения радиоактивно меченного (например,  $^{14}\text{C}$  или  $^3\text{H}$ ) ADC; его парентерального введения в детектируемой дозе (например, более, чем примерно 0,5 мг/кг) животному, такому как крыса, мышь, морская свинка, обезьяна или человек; обеспечения прохождения периода времени, достаточного для метаболизма (обычно от 30 секунд до 30 часов); и выделения продуктов его метаболизма из мочи, крови или других биологических образцов. Эти продукты могут быть легко выделены, поскольку они являются мечеными

(другие продукты выделяют с использованием антител, способных связываться с эпитопами, находящимися в данном метаболите).

Структуры метаболита определяют стандартными методами, например, с помощью МС-, ЖХ/МС- или ЯМР-анализа. В общих чертах, анализ метаболитов проводят способом, аналогичным стандартным способам исследования метаболизма лекарственных средств, хорошо известным специалистам. Продукты метаболизма, при условии, что они образуются *in vivo*, могут быть использованы в диагностических анализах для определения терапевтических доз АСД-соединений согласно изобретению.

#### МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МЕЧЕНОГО АНТИТЕЛА

В другом варианте изобретения, для проведения экспериментов по визуализации в диагностических, фармакодинамических и терапевтических целях, сконструированные на основе цистеина антитела могут быть помечены через тиол цистеина, радионуклидами; флуоресцентными красителями; молекулами субстратов, инициирующими биолюминесценцию; молекулами субстратов, инициирующими хемилюминесценцию; ферментами и другими детектируемыми метками. Обычно, меченое сконструированное на основе цистеина антитело, то есть, "биомаркер" или "зонд", может быть введено путем инъекции, вливания или перорально в живой организм, например, человека, грызуна или другого мелкого животного, либо оно может быть введено в перфузированный орган или образец ткани. Распределение данного зонда может быть детектировано в течение всей процедуры мечения и представлено посредством визуализации.

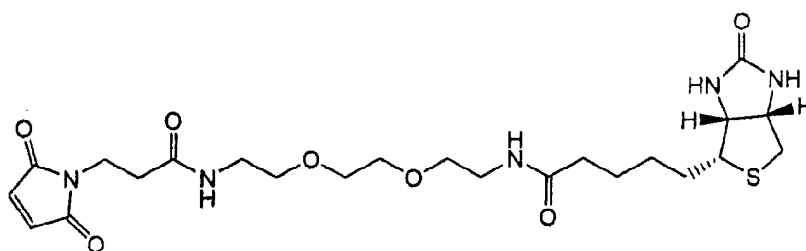
**ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ**

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к  
5 промышленному изделию или "набору", содержащему материалы,  
используемые для лечения описанных выше расстройств. Такое  
промышленное изделие содержит упаковку, а также этикетку,  
10 наклеенную на эту упаковку, или вкладыш, вложенный в такую  
упаковку. Подходящими упаковками являются, например, бутылки,  
флаконы, шприцы, блистерные упаковки и т.п. Такие упаковки могут  
15 быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или  
пластик. Указанная упаковка содержит композицию конъюгата  
"антитело-лекарственное средство" (ADC), которая является  
эффективной для лечения указанного состояния, и может иметь  
стерильное входное отверстие (например, такой упаковкой может  
25 быть пакет для внутривенного введения раствора или сосуд,  
имеющий пробку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций). По  
меньшей мере, одним активным агентом в указанной композиции  
30 является ADC. На этикетке или во вкладыше, вложенном в упаковку,  
должно быть указано, что такая композиция используется для  
лечения конкретного заболевания, такого как рак. Альтернативно  
35 или дополнительно, указанное промышленное изделие может также  
включать вторую (или третью) упаковку, содержащую  
40 фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая  
вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический  
раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, такое  
45 изделие может также включать и другие материалы, необходимые с  
точки зрения коммерческого производства и потребителя, включая  
50 другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1 - Получение биотинилированного тιο-Fab-фага**

5        Тιο-Fab-фаг ( $5 \times 10^{12}$  фаговых частиц) подвергали реакции со  
 150-кратным избытком биотин-PEO-малеимида ((+)-биотинил-3-  
 10        малеимидопропионамидил-3,6-диоксооктаиндиамин, Oda et al.,  
 (2001) Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology,  
 Inc.) в течение 3 часов при комнатной температуре. Избыток  
 15        биотин-PEO-малеимида удаляли из конъюгированного с биотином фага  
 путем многократных ПЭГ-преципитаций (3-4 раза). При этом, могут  
 быть использованы и другие коммерчески доступные биотиновые  
 20        реагенты с электрофильными группами, способными реагировать с  
 тиоловыми группами цистеина, включая биотин-BMCC, PEO-  
 иодоацетилбиотин, иодоацетил-LC-биотин, биотин-HPDP (Pierce  
 25        Biotechnology, Inc.) и N<sup>α</sup>-(3-малеимидилпропионил)биоцитин (MPB,  
 Molecular Probes, Eugene, OR). Другими коммерческими  
 30        поставщиками реагентов, используемых для биотинилирования, а  
 также бифункциональных и мультифункциональных линкерных  
 реагентов являются фирмы Molecular Probes, Eugene, OR и Sigma,  
 35        St. Louis, MO.



Биотин-PEO-малеимид

**Пример 2 - Анализ PHESELECTOR**

50        Альбумин бычьей сыворотки (BSA), внеклеточный домен erbB2

(HER2) и стрептавидин (100 мкл 2 мкг/мл) отдельно наносили на 96-луночные планшеты Maxisorp. После блокирования 0,5% твином-20 (в PBS), биотинилированный и небитинилированный hu4D5Fabv8-ThioFab-фаг ( $2 \times 10^{10}$  фаговых частиц) инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем инкубировали со "вторым" антителом (антителом против оболочечного белка фага M13, белка pVIII), меченным пероксидазой хрена (ПХ). На фигуре 8 проиллюстрирован анализ PHESELECTOR, где схематически показано связывание Fab или тιο-Fab с HER2 (вверху) и биотинилированного тιο-Fab со стрептавидином (внизу).

Затем осуществляли стандартную ПХ-реакцию и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Тиоловую реактивность измеряли путем вычисления отношения  $OD_{450\text{ нм}}$  для стрептавидина/ $OD_{450\text{ нм}}$  для HER2. Величина тиоловой реактивности, равная 1, указывает на полное биотинилирование тиола цистеина. В случае измерения уровня связывания Fab-белка, сначала использовали hu4D5Fabv8 (2-20 нг), а затем его инкубировали с ПХ-мечеными козьими поликлональными анти-Fab антителами.

### **Пример 3а - Экспрессия и очистка тιο-Fab**

Тιο-Fab экспрессируется после индуцирования в 34B8, несупрессорном штамме *E.coli* (Basa et al. (1997) Journal Biological Chemistry 272(16): 10678-84). Осадок собранных клеток ресуспендировали в PBS (забуференном фосфатом физиологическом растворе), полный лизис клеток осуществляли путем пропускания через микрофлюидизатор, и Тιο-Fab очищали с помощью аффинной хроматографии на G-белке с сефарозой<sup>TM</sup> (Amersham).

Варианты L-V15C, L-V110C, H-A88C и H-A121C тιο-Fab

экспрессировали и очищали с помощью хроматографии на колонке с G-белком - сефарозой™. Олигомерный Fab присутствовал во фракциях 26-30, а большинство мономерных форм присутствовали во фракциях 31-34. Фракции, состоящие из мономерной формы, объединяли и анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а также анализировали hu4D5Fabv8 дикого типа с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих (с использованием DTT или BME) и в невосстанавливающих (без DTT или BME) условиях. После гель-филтрации, фракции A121C-тио-Fab анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях.

Тио-Fab конъюгировали с биотин-PEO-малеимидом как описано выше, и биотинилированные тио-Fab дополнительно очищали с помощью гель-филтрации на Superdex-200™ (Amersham), в результате чего были удалены биотин-PEO-малеимид и олигомерная фракция тио-Fab. hu4D5Fabv8 дикого типа и вариант A121C-тио-Fab hu4D5Fabv8 (в количестве 0,5 мг) отдельно инкубировали со 100-кратным молярным избытком биотин-PEO-малеимида в течение 3 часов при комнатной температуре и загружали на гель-филтрационную колонку с Superdex-200 для отделения свободного биотина, а также олигомерных Fab от мономерной формы.

#### **Пример 3b - Анализ тио-Fab**

Фрагменты биотинилированного hu4D5Fabv8 (A121C) тио-Fab и hu4D5Fabv8 дикого типа, образованные в результате ферментативного гидролиза, анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в сочетании с жидкостной хроматографией (LC-ESI-MS). Разность между исходной массой 48294,5 биотинилированного hu4D5Fabv8 (A121C) и исходной

массой 47737,0 hu4D5Fabv8 дикого типа составляла 557,5. Этот фрагмент указывает на присутствие одной молекулы биотин-PEO-  
 5 малеимида ( $C_{23}H_{36}N_5O_7S_2$ ). В таблице 4 указаны присвоенные фрагментам величины, подтверждающие данную последовательность.

Таблица 4

10 LC-ESI-Масс-спектрометрический анализ биотинилированного  
 hu4D5Fabv8 A121C тио-Fab после гидролиза трипсином

15	Аминокислота	фрагмент b	фрагмент y
	A (аланин)	72	
	M (метионин)	203	2505
20	D (аспарагиновая кислота)	318	2374
	Y (тирозин)	481	2259
25	W (триптофан)	667	2096
	G (глицин)	724	1910
	Q (глутамин)	852	1853
30	G (глицин)	909	1725
	T (треонин)	1010	1668
35	L (лейцин)	1123	1567
	V (валин)	1222	1454
	T (треонин)	1323	1355
40	V (валин)	1422	1254
	S (серин)	1509	1155
	S (серин)	1596	1068
45	<b>C (цистеин) + биотин</b>	<b>2242</b>	<b>981</b>
	S (серин)	2329	335
50	T (треонин)	2430	248



К (лизин)		175
-----------	--	-----

До и после гель-фильтрации на Superdex-200 проводили анализ биотинилированного ABP-hu4D5Fabv8-A121C, биотинилированного ABP-hu4D5Fabv8-V110C, биотинилированного ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A88C) с двумя Cys и биотинилированного ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A121C) с двумя Cys, где указанный анализ осуществляли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, то есть, с использованием или без использования DTT или BME.

Масс-спектрометрический анализ (МС/МС) для hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (после очистки с помощью гель-фильтрации на Superdex-200): Fab+151607,5, Fab 50515,5. Эти данные указывают на 91,2% конъюгирование. МС/МС-анализ для hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPEO-DM1 (восстановленного): LC 23447,2, LC+124537,3, HC (Fab) 27072,5. Эти данные указывают на то, что все реакции конъюгирования DM1 происходят на легкой цепи Fab.

#### **Пример 4 - Получение ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-МС-ММАЕ путем конъюгирования ABP-hu4D5Fabv8-(V110C) и МС-ММАЕ**

Реагент "лекарственное средство-линкер", малеимидокапроил-монометилауристатин Е (ММАЕ), то есть, МС-ММАЕ, растворенный в ДМСО, разводили в ацетонитриле и воде в известной концентрации и добавляли к охлажденному ABP-hu4D5Fabv8-(V110C)-тио-Fab в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS). Примерно через один час добавляли избыток малеимида для гашения реакции и кэпирования любых непрореагировавших тиоловых групп антитела. Реакционную смесь концентрировали путем ультрафильтрации на

центрифуге, и АВР-hu4D5Fabv8-(V110C)-МС-ММАЕ очищали и обессоливали путем элюирования через смолу G25 в PBS, а затем  
 5 фильтровали через 0,2 мкм-фильтры в стерильных условиях и замораживали для хранения.

**Пример 5 - Получение АВР-hu4D5Fabv8-(V110C)-МС-ММАФ путем конъюгирования АВР-hu4D5Fabv8-(V110C) и МС-ММАФ**

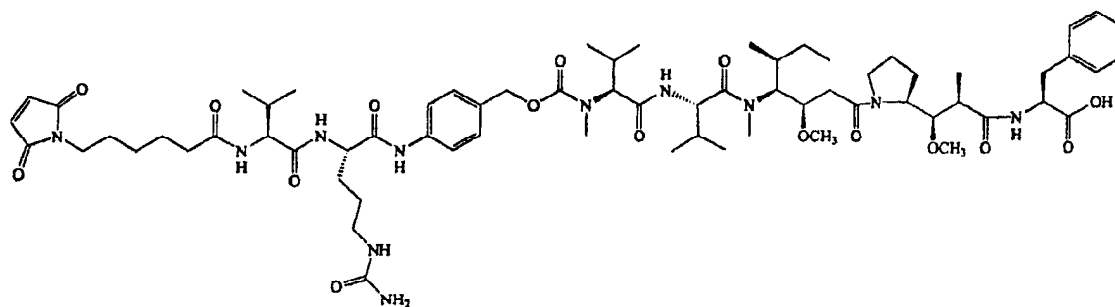
АВР-hu4D5Fabv8-(V110C)-МС-ММАФ получали путем конъюгирования АВР-hu4D5Fabv8-(V110C)-тио-Fab и МС-ММАФ в  
 15 соответствии с процедурой, описанной в примере 4.

**Пример 6 - Получение АВР-A121C-ThioFab-МС-val-cit-PAB-ММАЕ путем конъюгирования АВР-A121C-ThioFab и МС-val-cit-PAB-ММАЕ**

АВР-hu4D5Fabv8-(A121C)-МС-val-cit-PAB-ММАЕ получали путем конъюгирования АВР-hu4D5Fabv8-(A121C) и МС-val-cit-PAB-ММАЕ в  
 25 соответствии с процедурой, описанной в примере 4.

**Пример 7 - Получение АВР-A121C-ThioFab-МС-val-cit-PAB-ММАФ путем конъюгирования АВР-A121C-ThioFab и МС-val-cit-PAB-ММАФ**

АВР-hu4D5Fabv8-(A121C)-МС-val-cit-PAB-ММАФ получали путем конъюгирования АВР-hu4D5Fabv8-(A121C) и МС-val-cit-PAB-ММАФ в  
 35 соответствии с процедурой, описанной в примере 4.



MC-val-cit-PAB-MMAF

**Пример 8 - Получение hu4D5Fabv8-(V110C)-ThioFab-BMPEO-DM1**

Свободный цистеин на hu4D5Fabv8-(V110C)-ThioFab

модифицировали бис-малеими́до-реагентом  $\text{BM}(\text{PEO})_4$  (Pierce Chemical), с удалением непрореагировавшей малеими́до-группы, присутствующей на поверхности антитела. Для этого,  $\text{BM}(\text{PEO})_4$  растворяли в смеси 50% этанол/вода до концентрации 10 мМ и добавляли 10-кратный молярный избыток  $\text{BM}(\text{PEO})_4$  к раствору, содержащему hu4D5Fabv8-(V110C)-ThioFab в забуференном фосфатом физиологическом растворе, при концентрации примерно 1,6 мг/мл (10 микромоль), а затем смесь оставляли на 1 час для реакции. Избыток  $\text{BM}(\text{PEO})_4$  удаляли путем гель-фильтрации (на колонке HiTrap, Pharmacia) в 30 мМ цитрате, pH 6, и 150 мМ NaCl-буфере. Приблизительно 10-кратный молярный избыток DM1, растворенного в диметилацетамиде (DMA), добавляли к промежуточному соединению hu4D5Fabv8-(V110C)-ThioFab-BMPEO. Для растворения лекарственного средства может быть также использован диметилформамид (ДМФ). Реакционную смесь оставляли на ночь для реакции, а затем подвергали гель-фильтрации или диализу в PBS для удаления непрореагировавшего лекарственного средства. Для удаления высокомолекулярных агрегатов и выделения очищенных hu4D5Fabv8-(V110C)-ThioFab-BMPEO-DM1 проводили гель-фильтрацию на колонках S200 в PBS.

В соответствии с тем же самым протоколом получали hu4D5Fabv8 (A121C)-ThioFab-BMPEO-DM1.

#### **Пример 9 - Анализ на *in vitro* пролиферацию клеток**

Эффективность ADC может быть измерена с помощью анализа на пролиферацию клеток в соответствии с нижеследующим протоколом (CellTiter Glo Luminiscent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al. (2002) Cancer Res.

62:5485-5488):

1. Аликвоту 100 мкл клеточной культуры, содержащей примерно  
5  $10^4$  клеток (SKBR-3, BT474, MCF7 или MDA-MB-468) в среде, осаждали  
в каждую лунку 96-луночного планшета с непрозрачными стенками.

2. Получали контрольные лунки, содержащие среду и не  
10 содержащие клеток.

3. В экспериментальные лунки добавляли ADC и проводили  
15 инкубирование в течение 3-5 дней.

4. Планшеты уравнивали до комнатной температуры в  
течение примерно 30 минут.

20 5. В каждую лунку добавляли объем реагента CellTiter-Glo,  
равный объему присутствующей среды клеточной культуры.

25 6. Содержимое лунок смешивали в течение 2 минут на  
орбитальном шейкере для индуцирования лизиса клеток.

30 7. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение  
10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала.

8. Люминесценцию регистрировали и представляли на графиках  
как RLU=относительные единицы люминесценции.

35 Некоторую часть клеток высевали при плотности 1000-  
2000/лунку (линии PC3) или 2000-3000/лунку (OVCA-3) в 96-  
луночный планшет, 50 мкл/лунку. Через один (PC3) или два (OVCA-  
40 3) дня добавляли ADC в объемах 50 мкл до конечной концентрации  
9000, 3000, 1000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1, или 1,4 нг/мл, а в  
45 контрольные лунки "без ADC" добавляли только среду. При этом,  
эксперимент проводили с двумя или тремя повторностями. Через 3  
(PC3) или 4-5 (OVCA-3) дней добавляли 100 мкл/лунку реагента  
50 Cell TiterGlo II (анализ с использованием люциферазы;

пролиферацию клеток измеряли на уровнях АТР) и клетки подсчитывали на люминометре. Полученные данные использовали для построения кривой средних величин люминесценции для каждой серии дубликатов, с вычислением величин среднеквадратической ошибки. Указанный протокол представляет собой модифицированный люминесцентный анализ на жизнеспособность клеток (CellTiter Glo Luminiscent Cell Viability Assay) (Promega):

1. Высеивали 1000 клеток/лунку PC3/Muc16, PC3/neo в 50 мкл среды/лунку. Клетки Ovcар3 должны быть засеяны при плотности 2000 клеток/лунку (в 50 мкл) в их среде (описанной ниже). Клетки оставляли на ночь для связывания.

2. ADC серийно разводили в среде в отношении 1:3, начиная с рабочей концентрации 18 мкг/мл (это разведение давало конечную концентрацию 9 мкг/мл). 50 мкл разведенного ADC добавляли к 50 мкл клеток и среды, уже присутствующих в лунках.

3. Инкубировали в течение 72-96 часов (стандарт - 72 часа, но при достижении концентрации 0 мкг/мл, анализ прекращали, если клетки достигали конфлюентности 85-95%).

4. Добавляли 100 мкл/лунку реагента Cell Titer Glo, Promega, встряхивали в течение 3 минут и данные считывали на люминометре.

Среда: PC3/neo и PC3/MUC16 культивировали в 50/50/10%FBS/глутамин/250 мкг/мл G-418, а OVCAР-3 культивировали в RPMI/20%FBS/глутамине.

Пример 10 - Ингибирование роста опухоли; *in vivo*  
эффективность у трансгенных мышей с эксплантатом,  
экспрессирующим высокие уровни HER2

Животные, подходящие для трансгенных экспериментов, могут  
быть получены из стандартных коммерчески доступных источников,  
таких как Taconic (Germantown, N.Y.). Для этих экспериментов  
подходящими являются животные многих видов, но предпочтительными  
являются самки мышей FVB, поскольку они наиболее чувствительны к  
образованию опухолей. Самцы FVB могут быть использованы для  
спаривания, а выведенная популяция вазэктомизированных мышей  
CD.1 может быть использована для стимуляции псевдобеременности.  
Вазэктомизированные мыши могут быть получены из любого  
коммерчески доступного источника. Животные-родоначальники могут  
быть скрещены либо с мышами FVB, либо с мышами 129/BL6 x FVB,  
гетерозиготными по p53. Мыши, гетерозиготные по аллелю p53, были  
использованы как потенциальные животные с повышенной  
способностью к образованию опухолей. Однако, как оказалось, в  
этом не было необходимости. Поэтому, некоторые опухоли F1  
происходят от смешанных видов. Опухолями мышей-родоначальников  
были только опухоли типа FVB. Было получено шесть мышей-  
родоначальников с развивающимися опухолями некоторых типов,  
которые не давали потомства.

Животные, имеющие опухоли (аллотрансплантат,  
культивированный у трансгенных mmtv-мышей Fo5), были обработаны  
одной или несколькими дозами ADC путем внутривенной (i.v.)  
инъекции. Объем опухоли определяли через различные периоды  
времени после инъекции.

Опухоли быстро развивались у тех трансгенных мышей, которые экспрессировали активированную мутацией форму *neu*, крысиного гомолога HER2, но HER2, сверхэкспрессирующийся в раковой опухоли молочной железы человека, не был мутирован, и образование опухоли у трансгенных мышей, у которых экспрессировался немутированный HER2, было гораздо менее стабильным (Webster et al. (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5:69-76).

Для стимуляции образования опухоли с немутированным HER2, трансгенных мышей получали путем введения с HER2-кодирующей кДНК-плазмиды, в которой вышерасположенный ATG был делетирован для предупреждения инициации трансляции в таких вышерасположенных кодонах ATG, что должно, так или иначе, снижать частоту событий инициации трансляции от нижерасположенного аутентичного иницирующего кодона HER2 (см., например, Child et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 24335-24341). Кроме того, к 5'-концу был добавлен химерный интрон, который также должен повышать уровень экспрессии, как было описано ранее (Neuberger and Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713; Buchman and Berg (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:4395; Brinster et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836). Химерный интрон был получен из вектора Promega, экспрессионного вектора млекопитающих Pci-neo (п.н. 890-1022). 3'-конец кДНК был фланкирован экзонами 4 и 5 человеческого гормона роста и последовательностями полиаденилирования. Кроме того, FVB-мыши были использованы потому, что этот вид является более восприимчивым к развитию опухоли. Для гарантии тканеспецифической экспрессии HER2 в молочной железе

использовали промотор от MMTV-LTR. Для повышения восприимчивости к образованию опухоли у животных, этим животным давали корм AIN 76A (Rao et al. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

**Пример 11 - Восстановление/окисление тио-Mab для конъюгирования**

Полноразмерные сконструированные на основе цистеина моноклональные антитела (тио-Mab), экспрессируемые в клетках CHO, восстанавливали примерно 50-кратным избытком ТСЕР (гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) в течение 3 часов при 37°C. Восстановленное тио-Mab (фигура 15) разводили и загружали на колонку HiTrap S в 10 мМ ацетате натрия, pH 5, и элюировали PBS, содержащим 0,3М хлорид натрия. Элюированный восстановленный тио-Mab обрабатывали 200 нМ водного сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>) при комнатной температуре в течение ночи. Окисление атмосферным кислородом также является эффективным.

**Пример 12 - Конъюгирование тио-Mab**

Повторно окисленные тио-Mab примера 11, включая тио-трастузумаб (A121C), тио-2H9 (A121C) и тио-3A5 (A121C), объединяли с 10-кратным избытком промежуточного соединения "лекарственное средство-линкер", BM(PEO)<sub>4</sub>-DM1, смешивали и оставляли примерно на один час при комнатной температуре для осуществления конъюгирования и образования конъюгатов "антитело тио-Mab-лекарственное средство", включая тио-трастузумаб (A121C)-BMPEO-DM1, тио-2H9 (A121C)-BMPEO-DM1 и тио-3A5 (A121C)-BMPEO-DM1. Конъюгированную смесь подвергали гель-фильтрации или



загружали на колонку HiTrap S и элюировали с этой колонки для  
удаления избытка промежуточного соединения "лекарственное  
5 средство-линкер" и других примесей.

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными  
вариантами его осуществления, описанными в примерах, которые  
10 приводятся лишь для иллюстрации некоторых аспектов изобретения,  
и в объем настоящего изобретения входят любые функционально  
эквивалентные варианты. Для специалиста в данной области  
15 совершенно очевидно, что в настоящее изобретение, помимо уже  
проиллюстрированных и описанных здесь вариантов, могут быть  
20 внесены различные модификации, не выходящие за рамки объема  
прилагаемой формулы изобретения.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.  
 EIGENBROT, Charles W.  
 JUNUTULA, Jagath Reddy  
 5 LOWMAN, Henry  
 RAAB, Helga E.  
 VANDLEN, Richard

<120> АНТИТЕЛА, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИНОВ, И ИХ КОНЬЮГАТЫ

10 <130> P2066R1 PCT

<140> PCT/US2005/034353  
 <141> 2005-09-22

15 <150> US 60/696,353  
 <151> 2005-06-30

<150> US 60/612,468  
 <151> 2004-09-23

<160> 49

20 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

25 <220>  
 <223> искусственные пептиды

<400> 1  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu  
 1 5 10 15

30 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe  
 20 25 30

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 35 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> искусственные пептиды

<400> 2  
 40 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu  
 1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe  
 20

45 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 50 <223> искусственные пептиды

<400> 3  
 Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu

	1	5	10	15
	Trp Glu Asp Asp Phe			
		20		
5	<210> 4			
	<211> 18			
	<212> БЕЛОК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
10	<223> искусственные пептиды			
	<400> 4			
	Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp			
	1	5	10	15
15	Glu Asp Asp			
	<210> 5			
	<211> 11			
	<212> БЕЛОК			
20	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<223> искусственные пептиды			
	<400> 5			
25	Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp			
		5	10	
	<210> 6			
	<211> 450			
	<212> БЕЛОК			
30	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<223> искусственный белок			
	<400> 6			
35	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
	1	5	10	15
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys			
		20	25	30
40	Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
		35	40	45
	Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr			
		50	55	60
45	Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser			
		65	70	75
	Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp			
		80	85	90
50	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr			
		95	100	105
	Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
		110	115	120

RU 2412947 C2

	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	125	130	135
5	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys	140	145	150
	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	155	160	165
10	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	170	175	180
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	185	190	195
15	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200	205	210
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
20	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230	235	240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245	250	255
25	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
30	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
35	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
40	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375
45	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	380	385	390
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	395	400	405
50	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	410	415	420
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	425	430	435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
440 445 450

<210> 7  
<211> 450  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> искусственный белок

<400> 7  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys  
20 25 30  
Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr  
50 55 60  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
65 70 75  
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr  
95 100 105  
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120  
Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
125 130 135  
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
140 145 150  
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
155 160 165  
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
170 175 180  
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
185 190 195  
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
200 205 210  
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
215 220 225  
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
230 235 240  
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255  
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

		260		265		270
		His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val				
		275		280		285
5		Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn				
		290		295		300
		Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp				
		305		310		315
10		Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala				
		320		325		330
		Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln				
		335		340		345
15		Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu				
		350		355		360
		Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe				
		365		370		375
20		Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro				
		380		385		390
		Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly				
		395		400		405
25		Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp				
		410		415		420
		Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu				
		425		430		435
30		His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
		440		445		450
		<210> 8				
		<211> 214				
		<212> БЕЛОК				
35		<213> Искусственная последовательность				
		<220>				
		<223> искусственный белок				
		<400> 8				
40		Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val				
		1	5	10		15
		Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn				
		20	25			30
45		Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys				
		35	40			45
		Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser				
		50	55			60
50		Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile				
		65	70			75
		Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln				
		80	85			90

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105  
 Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 110 115 120  
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 125 130 135  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 140 145 150  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
 155 160 165  
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr  
 170 175 180  
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu  
 185 190 195  
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn  
 200 205 210  
 Arg Gly Glu Cys  
 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 9  
 Trp Val Arg Gln Cys Pro Gly Lys Gly Leu  
 5 10  
 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 10  
 Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val  
 5 10  
 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 11  
 Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 5 10

```
<210> 12
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

5 <220>  
<223> искусственный белок

```
<400> 12
  Leu Val Thr Val Ser Cys Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
                5                10
```

10

<210>	13
<211>	13
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

15 <220>  
<223> искусственный белок

```
<400> 13
  Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser
                5                10
```

20

<210>	14
<211>	13
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

25 <220>  
<223> искусственный белок

```
<400> 14
  Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Cys Thr Lys Gly Pro Ser
           5              10
```

30

<210>	15
<211>	14
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

35 <220>  
<223> искусственный белок

```
<400> 15
  His Thr Phe Pro Cys Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                5                10
```

40

<210>	16
<211>	14
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

45 <220>  
<223> искусственный белок

```
<400> 16
  His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Cys Ser Gly Leu Tyr Ser
                5                10
```

50

<210>	17
<211>	11
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность



$\langle 220 \rangle$ 

<223> искусственный белок

<400> 17

Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr  
5 10

<210> 18

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> искусственный белок

<400> 18

Gln Lys Pro Gly Lys Cys Pro Lys Leu Leu Ile  
5 10

<210> 19

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> искусственный белок

<400> 19

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val  
5 10

<210> 20

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> искусственный белок

<400> 20

Thr Cys Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro Pro  
5 10

<210> 21

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> искусственный белок

<400> 21

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys  
5 10

<210> 22

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> искусственный белок

```

5
    <400> 22
      Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
                        5                               10

10
    <210> 23
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

15
    <400> 23
      Phe Tyr Pro Arg Glu Cys Lys Val Gln Trp Lys
                        5                               10

20
    <210> 24
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

25
    <400> 24
      Trp Lys Val Asp Asn Cys Leu Gln Ser Gly Asn
                        5                               10

30
    <210> 25
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

35
    <400> 25
      Ala Leu Gln Ser Gly Cys Ser Gln Glu Ser Val
                        5                               10

40
    <210> 26
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

45
    <400> 26
      Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
                        5                               10

50
    <210> 27
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

    <400> 27
      Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
                        5                               10

```

<210> 28  
 <211> 450  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

5

<220>  
 <223> искусственный белок

<400> 28

10

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30

Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45

15

Glu Trp Val Gly Phe Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr  
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75

20

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Pro Lys Ile Pro Arg His  
 95 100 105

25

Ala Asn Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 125 130 135

30

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 155 160 165

35

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 185 190 195

40

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 215 220 225

45

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

50

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

## RU 2 412 947 C2

					275					280					285
	Glu	Val	His	Asn	Ala 290	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 295	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 300
5	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 305	Val	Ser	Val	Leu	Thr 310	Val	Leu	His	Gln	Asp 315
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 320	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 325	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 330
10	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 335	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 340	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 345
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 350	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 355	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 360
15	Met	Thr	Lys	Asn	Gln 365	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 370	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 375
	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 380	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 385	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 390
20	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 395	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 400	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 405
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr 410	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 415	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 420
25	Gln	Gln	Gly	Asn	Val 425	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 430	Met	His	Glu	Ala	Leu 435
	His	Asn	His	Tyr	Thr 440	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 445	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 450
30	<210>	29													
	<211>	25													
	<212>	БЕЛОК													
	<213>	Искусственная последовательность													
	<220>														
35	<223>	искусственный белок													
	<400>	29													
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Cys	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	1				5					10					15
40	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg					
					20					25					
	<210>	30													
	<211>	25													
	<212>	БЕЛОК													
	<213>	Искусственная последовательность													
45	<220>														
	<223>	искусственный белок													
	<400>	30													
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Cys	Asp	Gly	Val
50	1				5					10					15
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg					
					20					25					

<210> 31  
 <211> 25  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 5 <220>  
 <223> искусственный белок  
  
 <400> 31  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Cys  
 1 5 10 15  
 10 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 20 25  
  
 <210> 32  
 <211> 25  
 15 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
  
 20 <400> 32  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 1 5 10 15  
 Glu Cys His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 20 25  
 25 <210> 33  
 <211> 25  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 30 <220>  
 <223> искусственный белок  
  
 <400> 33  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 1 5 10 15  
 35 Glu Val His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg  
 20 25  
  
 <210> 34  
 <211> 11  
 40 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
  
 45 <400> 34  
 Tyr Lys Cys Lys Val Cys Asn Lys Ala Leu Pro  
 5 10  
  
 <210> 35  
 <211> 13  
 50 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> искусственный белок  
 <400> 35  
 Ile Glu Lys Thr Ile Cys Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
                                   5                                  10  
 5  
 <210> 36  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 10  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 36  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Cys Lys Gly Gln Pro Arg  
                                   5                                  10  
 15  
 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 20  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 37  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu  
                                   5                                  10  
 25  
 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 30  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 38  
 Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe  
                                   5                                  10  
 35  
 <210> 39  
 <211> 446  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 40  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 39  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser  
   1                                  5                                  10                                  15  
 45  
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
                                   20                                  25                                  30  
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys  
                                   35                                  40                                  45  
 50  
 Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr  
                                   50                                  55                                  60  
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser

RU 2412947 C2

					65						70								75
					Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	His	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp
					80									85					90
5					Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Asp	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr
					95									100					105
					Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Cys	Ser	Thr	Lys
					110									115					120
10					Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
					125									130					135
					Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
					140									145					150
15					Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
					155									160					165
					Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
					170									175					180
20					Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
					185									190					195
					Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
					200									205					210
25					Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
					215									220					225
					Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
					230									235					240
30					Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
					245									250					255
					Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
					260									265					270
35					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
					290									295					300
40					Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					305									310					315
					Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
					320									325					330
45					Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
					335									340					345
					Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
					350									355					360
50					Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
					365									370					375
					Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
					380									385					390

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 395 400 405  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 410 415 420  
 5 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 425 430 435  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 440 445  
 10  
 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 15  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 40  
 Asn Trp Ile Arg Gln Cys Pro Gly Asn Lys  
 5 10  
 20  
 <210> 41  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 25  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 41  
 Leu Asn Ser Cys Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 5 10  
 30  
 <210> 42  
 <211> 21  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 35  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 42  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Cys Ser Thr Lys Gly  
 1 5 10 15  
 40  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 20  
 <210> 43  
 <211> 14  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 45  
 <220>  
 <223> искусственный белок  
 <400> 43  
 His Thr Phe Pro Cys Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 5 10  
 50



```

5
    <210> 44
    <211> 14
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

    <400> 44
    His Thr Phe Pro Ala Cys Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
              5                      10

10
    <210> 45
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

    <400> 45
    Phe Leu Ser Val Ser Cys Gly Gly Arg Val Thr
              5                      10

20
    <210> 46
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

25
    <400> 46
    Gln Lys Pro Gly Asn Cys Pro Arg Leu Leu Ile
              5                      10

30
    <210> 47
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

35
    <400> 47
    Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
              5                      10

40
    <210> 48
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

    <220>
    <223> искусственный белок

45
    <400> 48
    Phe Tyr Pro Arg Glu Cys Lys Val Gln Trp Lys
              5                      10

50
    <210> 49
    <211> 11
    <212> БЕЛОК
    <213> Искусственная последовательность

```

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; искусственный белок

&lt;400&gt; 49

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr

5

5

10

## Формула изобретения

1. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами, предназначенное для конъюгирования с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, аффинными лигандами и детектируемыми метками,

содержащее один или несколько свободных цистеиновых остатков с величиной тиоловой реактивности в пределах от 0,6 до 1,0 и последовательность в тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 15:

15

LVTVCSTKGPS	(SEQ ID NO: 11)
LVTVSCSTKGPS	(SEQ ID NO: 12)
LVTVSSCSTKGPS	(SEQ ID NO: 13)
HTFPCVLQSSGLYS	(SEQ ID NO: 15)

20

или последовательность в легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 45 и 46;

25

SLASASCGDRV	(SEQ ID NO: 17)
QKPGKCPKLLI	(SEQ ID NO: 18)
EIKRTCAAPSV	(SEQ ID NO: 19)
TCAAPCVFIFPP	(SEQ ID NO: 20)
FIFPPCDEQLK	(SEQ ID NO: 21)
DEQLKCGTASV	(SEQ ID NO: 22)
FYPRECKVQWK	(SEQ ID NO: 23)

30

WKVDNCLQSGN	(SEQ ID NO: 24)
ALQSGCSQESV	(SEQ ID NO: 25)
VTEQDCKDSTY	(SEQ ID NO: 26)
GLSSPCTKSFN	(SEQ ID NO: 27)
FLSVSCGGRVT	(SEQ ID NO: 45)
QKPGNCPRLI	(SEQ ID NO: 46)

35

где указанное сконструированное антитело с цистеиновыми заменами получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела свободным цистеиновым остатком, где родительское антитело селективно связывается с антигеном, а сконструированное антитело с цистеиновыми заменами селективно связывается с тем же антигеном, что и родительское антитело.

40

2. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, полученное способом, включающим:

45

- (i) мутагенез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированное антитело с цистеиновыми заменами;
- (ii) экспрессию сконструированного антитела с цистеиновыми заменами и
- (iii) выделение и очистку сконструированного антитела с цистеиновыми заменами.

50

3. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.2, полученное способом, дополнительно включающим:

- (i) взаимодействие сконструированного антитела с цистеиновыми заменами с

реагентом, обладающим аффинностью по отношению к реакционноспособному тиолу, с получением аффинно-меченного сконструированного антитела с цистеиновыми заменами; и

(ii) определение уровня связывания указанного аффинно-меченного сконструированного антитела с цистеиновыми заменами со средой для захвата.

4. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.3, где указанный реагент, обладающий аффинностью в отношении реакционноспособного тиола, содержит биотиновую молекулу и малеимидную молекулу.

5. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.3, где указанная среда для захвата содержит стрептавидин.

6. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где родительским антителом является слитый белок, содержащий альбумин-связывающий пептид (ABP), выбранный из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

7. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где родительское антитело выбрано из моноклонального антитела, биспецифического антитела, химерного антитела, антитела человека, гуманизированного антитела и фрагмента антитела.

8. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.7, где родительское антитело выбрано из huMAb4D5-8 (трастузумаб), анти-EphB2R антитела и анти-MUC16 антитела.

9. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 39.

10. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где родительским антителом является интактное антитело, выбранное из IgA, IgD, IgE, IgG и IgM.

11. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.10, где IgG выбран из подклассов IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4.

12. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами или родительское антитело связывается с одним или несколькими рецепторами (1)-(36), а именно:

(1) BMPR1B (рецептор белка морфогенеза кости типа IB);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5);

(3) STEAP1 (шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы);

(4) 0772P (CA125, MUC16);

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцитарный потенцирующий фактор, мезотелин);

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, член 2 семейства растворимых носителей 34 (фосфат натрия), натрий-зависимый фосфат-переносящий белок 3b типа II);

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Nlog, сема-домен, семидоменные повторы тромбоспондина (типа 1 и подобный типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен (семафорин) 5B);

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, кДНК RIKEN 2700050C12, кДНК гена RIKEN 2700050C12);

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B);

(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315);

(11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестидоменный трансмембранный белок предстательной железы);

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, рецептор, быстрый потенциал-зависимый катионный канал, член 4 подсемейства M);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, происходящий от тератокарциномы);

(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или Hs.73792);

(15) CD79b (CD79B, CD79p, Igb (бета-белок, связанный с иммуноглобулином), B29);

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (фосфатазный якорный белок 1a, содержащий домен SH2), SPAP1B, SPAP1C);

(17) HER2;

(18) NCA;

(19) MDP;

(20) IL20R $\alpha$ ;

(21) Brevican;

(22) EphB2R;

(23) ASLG659;

(24) PSCA;

(25) GEDA;

(26) BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, рецептор 3 BlyS, BR3);

(27) CD22 (CB22-В-изоформа В-клеточного рецептора);

(28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , связанный с иммуноглобулином альфа-белок, В-клетко-специфический белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс с молекулами IgM на поверхности клеток, передает сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток);

(29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, связанный с G-белком рецептор, который активируется хемокином CXCL13, обеспечивает миграцию лимфоцитов и гуморальную защиту, а также играет определенную роль в инфицировании вирусом ВИЧ-2, и, вероятно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза);

(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы МНС класса II (антиген 1a), которая связывается с пептидами и презентрует их CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам);

(31) P2X5 (ионный канал, открываемый лигандом пуринаргического рецептора P2X5; ионный канал, открываемый внеклеточным АТР, может участвовать в синаптической передаче и в нейрогенезе, а его дефицит может играть определенную роль в патофизиологии идиопатической дисфункции мочевого пузыря);

(32) CD72 (антиген CD72 линии В-клеточной дифференцировки, Lyb-2);

(33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства богатых лейцином повторов (LRR) типа I, который регулирует активацию и апоптоз В-клеток, и потеря его функции ассоциируется с прогрессированием заболевания у пациентов с системной красной волчанкой);

(34) FcRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый рецептор для Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные домены типа C2 и домены ITAM, может играть определенную роль в дифференцировке В-лимфоцитов);

(35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор суперсемейства иммуноглобулина 2, предполагаемый иммунорецептор, который, возможно, играет определенную роль в развитии В-клеток и лимфомагенезе; в некоторых злокачественных В-клетках наблюдается нарушение регуляции гена посредством транслокации); и

(36) TENB2 (предполагаемый трансмембранный протеогликан, родственник семейству факторов роста EGF/герегулинов и фоллистатину).

13. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.1, где антитело ковалентно связано с меткой для захвата, с детектируемой меткой или с твердой подложкой.

14. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.13, где указанное антитело ковалентно связано с детектируемой меткой, являющейся флуоресцентным красителем, выбранным из красителей типа флуоресцеина и родамина; данзила; лиссамина; цианина; фикоэритрина; техасского красного и их аналогов.

15. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.13, где указанное антитело ковалентно связано с радионуклидной детектируемой меткой, выбранной из  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  и  $^{213}\text{Bi}$ .

16. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами по п.13, где указанное антитело ковалентно связано с детектируемой меткой посредством хелатообразующего лиганда, выбранного из DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA.

17. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами, предназначенное для конъюгирования с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, аффинными лигандами и детектируемыми метками,

содержащее сводный цистеиновый остаток с величиной тиоловой реактивности в пределах от 0,6 до 1,0, и указанный свободный цистеиновый остаток расположен в тяжелой цепи в положении, выбранном из 112, 113, 114, и 168, в соответствии с нумерацией по Кабату;

где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела свободным цистеиновым остатком, где родительское антитело селективно связывается с антигеном, а сконструированное антитело с цистеиновыми заменами селективно связывается с тем же антигеном, что и родительское антитело.

18. Сконструированное антитело с цистеиновыми заменами, предназначенное для конъюгирования с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, аффинными лигандами и детектируемыми метками,

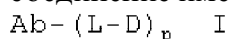
содержащее свободный цистеиновый остаток с величиной тиоловой реактивности в пределах от 0,6 до 1,0; и одну или несколько последовательностей в тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 15:

LVTVCSTKGPS	SEQ ID NO: 11
LTVSCSTKGPS	SEQ ID NO: 12
LTVSSCSTKGPS	SEQ ID NO: 13
HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO: 15

где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела свободным цистеиновым остатком, где родительское

антитело селективно связывается с антигеном, а сконструированное антитело с цистеиновыми заменами селективно связывается с тем же антигеном, что и родительское антитело.

19. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство", содержащее сконструированное антитело с цистеиновыми заменами (Ab) по любому из пп.1-18, содержащее свободный цистеиновый остаток с величиной тиоловой реактивности в пределах от 0,6 до 1,0; и лекарственное средство (D), выбранное из майтанзиноида, ауристатина, доластатина, калихеамицина, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами присоединено к молекуле D через один или несколько свободных цистеиновых остатков посредством линкерной группы (L); причем соединение имеет формулу I:



где p равно 1, 2, 3 или 4; и где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами получают способом, включающим замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела одним или несколькими свободными цистеиновыми остатками, где родительское антитело селективно связывается с антигеном, а сконструированное антитело с цистеиновыми заменами селективно связывается с тем же антигеном, что и родительское антитело.

20. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где свободный цистеиновый остаток расположен в тяжелой цепи в положении, выбранном из 112, 113, 114, и 168, в соответствии с нумерацией по Кабату.

21. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, содержащее одну или несколько последовательностей в тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 15:

LVTVCSCASTKGPS	SEQ ID NO: 11
LVTVSCASTKGPS	SEQ ID NO: 12
LVTVSSCSTKGPS	SEQ ID NO: 13
HTFPCVLQSSGLYS	SEQ ID NO: 15.

22. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами получают способом, включающим:

(a) замену одного или нескольких аминокислотных остатков родительского антитела цистеином и

(b) определение реакционной способности тиоловой группы сконструированного антитела с цистеиновыми заменами путем проведения взаимодействия сконструированного антитела с цистеиновыми заменами с реагентом, взаимодействующим с тиолом;

где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами более активно реагирует с реагентом, взаимодействующим с тиолом, по сравнению с родительским антителом.

23. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, которое дополнительно содержит последовательность альбумин-связывающего пептида (ABP), выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

24. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами связывается с рецептором ErbB, выбранным из EGFR, HER2, HER3 и HER4.

25. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами связывается с одним или несколькими рецепторами (1)-(36), такими как:

- (1) BMPR1B (рецептор белка морфогенеза кости типа IB);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
- (3) STEAP1 (шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы);
- (4) 0772P (CA125, MUC16);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцитарный потенцирующий фактор, мезотелин);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, член 2 семейства растворимых носителей 34 (фосфат натрия), натрий-зависимый фосфат-переносящий белок 3b типа II);
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Nlog, сема-домен, семидоменные повторы тромбоспондина (типа 1 и подобный типу 1), трансмембранный домен (ТМ) и короткий цитоплазматический домен (семафорин) 5B);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C53 0008016Rik, кДНК RIKEN 2700050C12, кДНК гена RIKEN 2700050C12);
- (9) ETBR (рецептор эндотелина типа В);
- (10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315);
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, шестидоменный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестидоменный трансмембранный белок предстательной железы);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, рецептор, быстрый потенциал-зависимый катионный канал, член 4 подсемейства М);
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, происходящий от тератокарциномы);
- (14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или Hs.73792);
- (15) CD79b (CD79B, CD79b, Igb (бета-белок, связанный с иммуноглобулином), B29);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (фосфатазный якорный белок 1a, содержащий домен SH2), SPAP1B, SPAP1C);
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R $\alpha$ ;
- (21) Brevican;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, рецептор 3 BlyS, BR3);
- (27) CD22 (СП22-В-изоформа В-клеточного рецептора);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , связанный с иммуноглобулином альфа- белок, В-клеткоспецифический белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B))

и образует комплекс с молекулами IgM на поверхности клеток, передавая сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток);

(29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, связанный с G-белком рецептор, который активируется хемокином CXCL13, обеспечивает миграцию лимфоцитов и гуморальную защиту, а также играет определенную роль в инфицировании вирусом ВИЧ-2, и, вероятно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза);

(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы МНС класса II (антиген Ia), которая связывается с пептидами и презентрует их CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам);

(31) P2X5 (ионный канал, открываемый лигандом пуриnergического рецептора P2X5; ионный канал, открываемый внеклеточным АТР, может участвовать в синаптической передаче и в нейрогенезе, а его дефицит может играть определенную роль в патофизиологии идиопатической дисфункции мочевого пузыря);

(32) CD72 (антиген CD72 линии В-клеточной дифференцировки, Lyb-2);

(33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства богатых лейцином повторов (LRR) типа I, который регулирует активацию и апоптоз В-клеток, и потеря его функции ассоциируется с прогрессированием заболевания у пациентов с системной красной волчанкой);

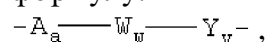
(34) FcRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1, предполагаемый рецептор для Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные домены типа C2 и домены ITAM, может играть определенную роль в дифференцировке В-лимфоцитов);

(35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор суперсемейства иммуноглобулина 2, предполагаемый иммунорецептор, который, возможно, играет определенную роль в развитии В-клеток и лимфомагенезе; в некоторых злокачественных В-клетках наблюдается нарушение регуляции гена посредством транслокации); и

(36) TENB2 (предполагаемый трансмембранный протеогликан, родственник семейству факторов роста EGF/геретулинов и фоллистатину).

26. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где  $r$  равно 1 или 2.

27. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где  $L$  имеет формулу:



где  $A$  представляет собой удлиняющий компонент, ковалентно присоединенный к тиолу сконструированного антитела с цистеиновыми заменами ( $Ab$ );

$a$  равно 0 или 1;

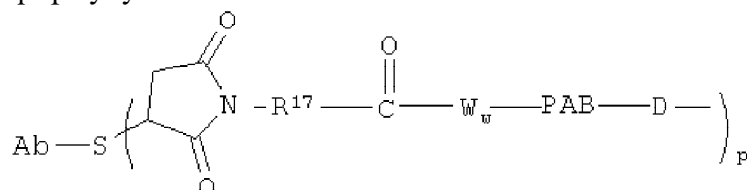
каждый  $W$  независимо представляет собой аминокислоту;

$w$  независимо представляет собой целое число от 0 до 12;

$Y$  означает спейсерный компонент, ковалентно связанный с молекулой лекарственного средства; и

$y$  равно 0, 1 или 2.

28. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.27, имеющее формулу:



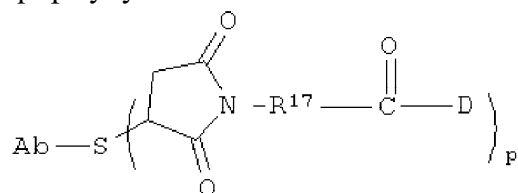


где РАВ представляет собой пара-аминобензилкарбамоил, а  $R^{17}$  представляет собой двухвалентный радикал, выбранный из  $(CH_2)_r$ ,  $C_3$ - $C_8$  карбоциклила,  $-O-(CH_2)_r$ , арилена,  $(CH_2)_r$ -арилена, арилен- $(CH_2)_r$ ,  $(CH_2)_r$ -( $C_3$ - $C_8$ -карбоциклила), ( $C_3$ - $C_8$ -карбоциклил)- $(CH_2)_r$ -,  $-(C_3$ - $C_8$ -гетероциклила),  $(CH_2)_r$ -( $C_3$ - $C_8$ -гетероциклила), ( $C_3$ - $C_8$ -гетероциклил)- $(CH_2)_r$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ -,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ - и  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -, где  $R^b$  представляет собой H,  $C_1$ - $C_6$ алкил, фенил или бензил, а r независимо представляет собой целое число от 1 до 10.

29. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.28, где  $W_w$  представляет собой валин-цитруллин.

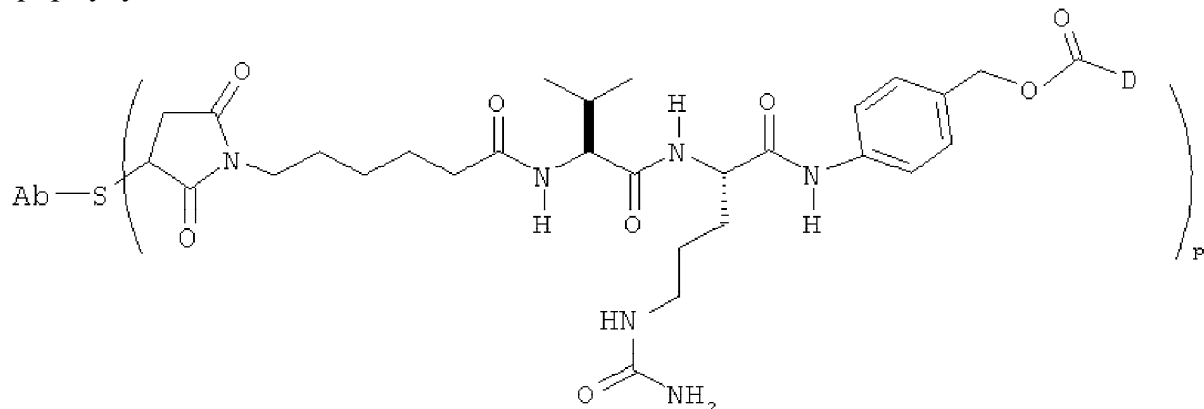
30. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.28, где  $R^{17}$  представляет собой  $(CH_2)_5$  или  $(CH_2)_2$ .

31. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.28, имеющее формулу:



32. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.31, где  $R^{17}$  представляет собой  $(CH_2)_5$  или  $(CH_2)_2$ .

33. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.28, имеющее формулу:

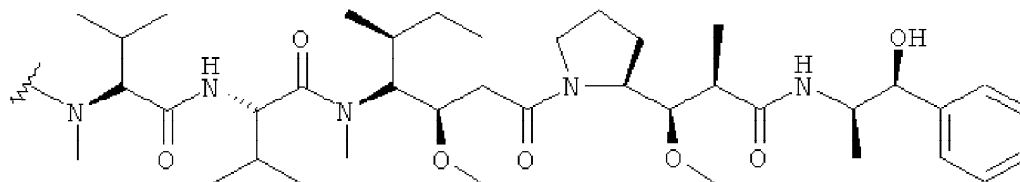


34. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где L образован из линкерного реагента SMCC или BMPEO.

35. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где молекула лекарственного средства D выбрана из ингибитора микротубулина, ингибитора митоза, ингибитора топоизомеразы и ДНК-интеркалирующего агента.

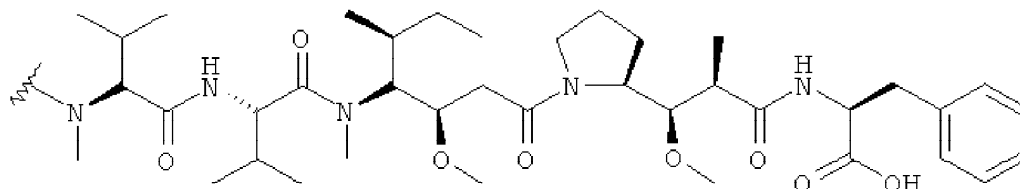
36. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где молекула лекарственного средства D выбрана из майтанзиноида, ауристатина, доластатина и калихеамицина.

37. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где D представляет собой ММАЕ со структурой:



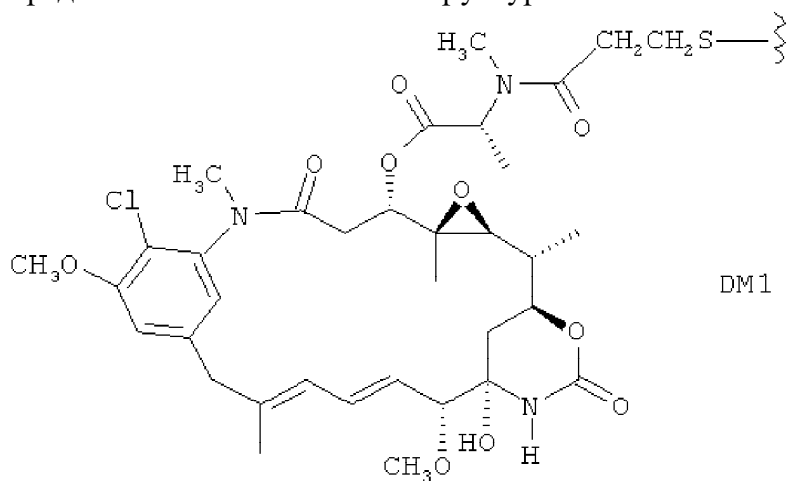
где волнистая линия указывает на сайт присоединения к линкеру L.

38. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где D представляет собой MMAF со структурой:

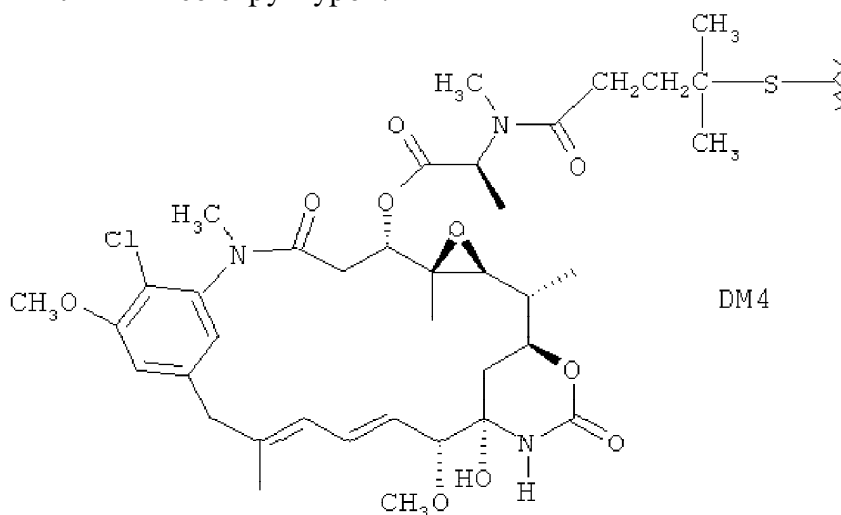


где волнистая линия указывает на сайт присоединения к линкеру L.

39. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство по п.19, где D представляет собой DM1 со структурой:



или DM4 со структурой:



где волнистая линия указывает на сайт присоединения к линкеру L.

40. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где указанное родительское антитело выбрано из моноклонального антитела,

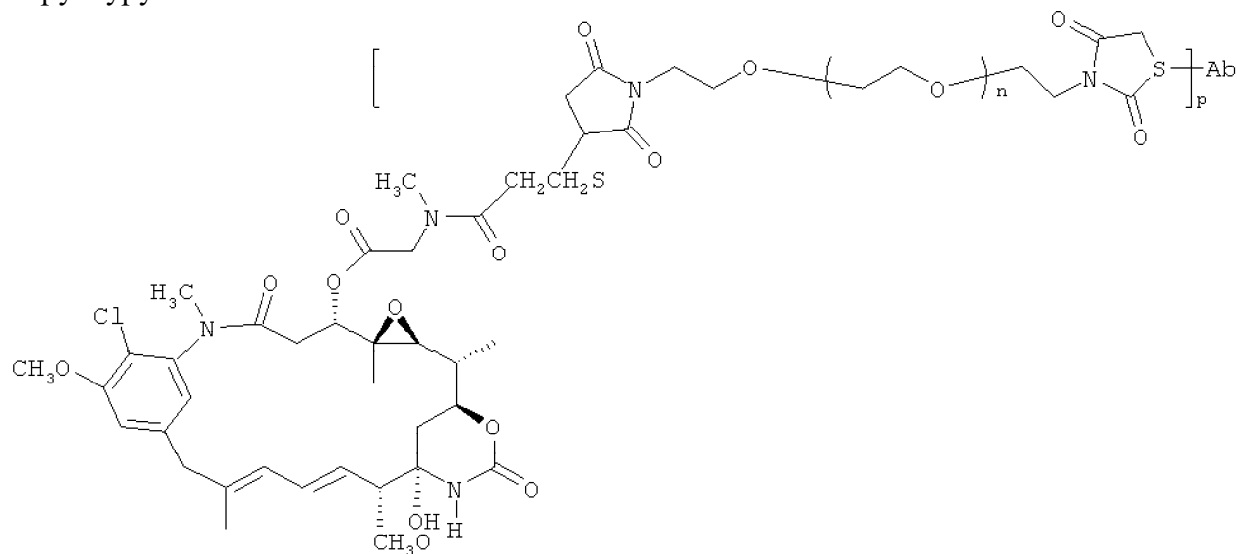
биспецифического антитела, химерного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела и фрагмента антитела.

41. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где родительским антителом является huMAb4D5-8 (трастузумаб), анти-ErbB2 антитело, анти-EphB2R антитело, анти-CD22 антитело, анти-MUC16 антитело.

42. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, где указанным родительским антителом является интактное антитело, выбранное из IgA, IgD, IgE, IgG и IgM.

43. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.42, где IgG выбран из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

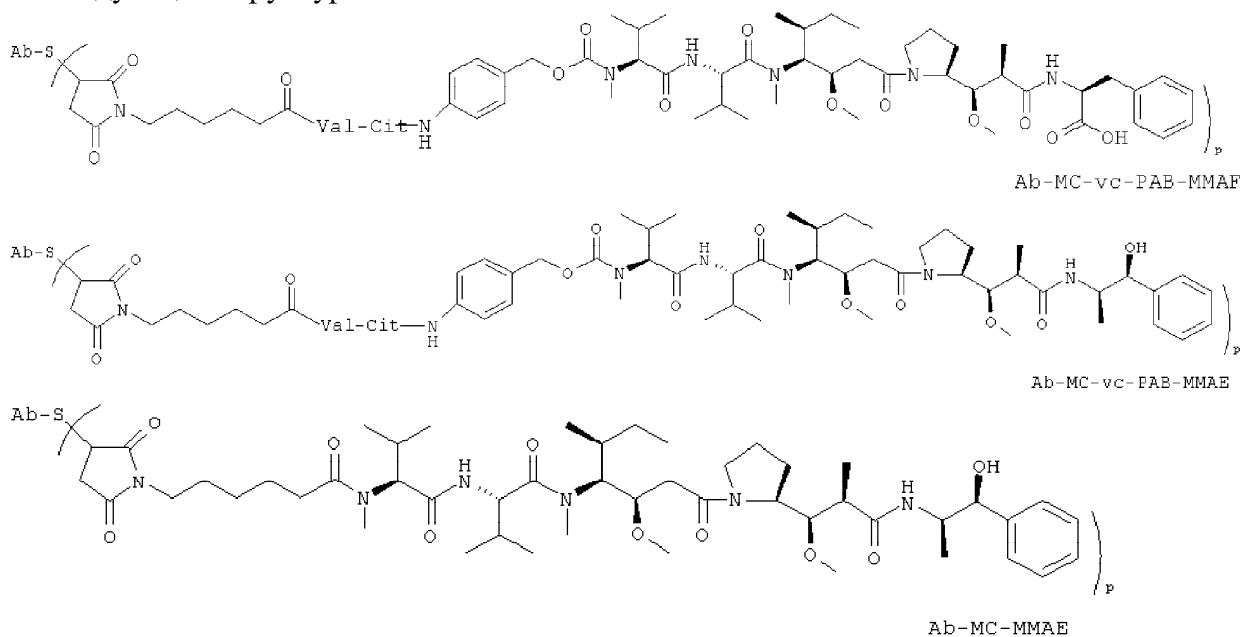
44. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, имеющий структуру:

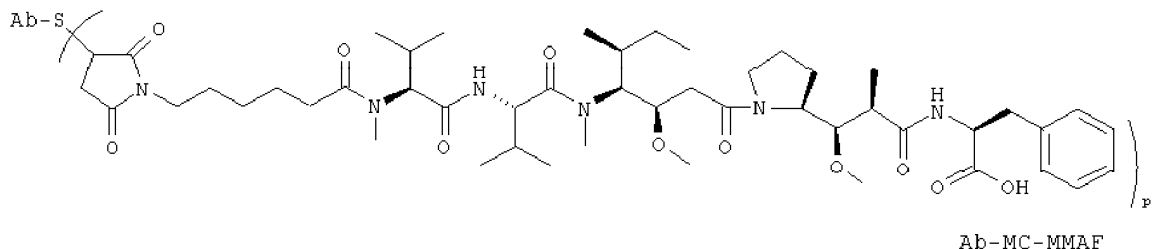


где n равно 0, 1, или 2; и

Ab представляет собой сконструированное антитело с цистеиновыми заменами.

45. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, выбранное из следующих структур:

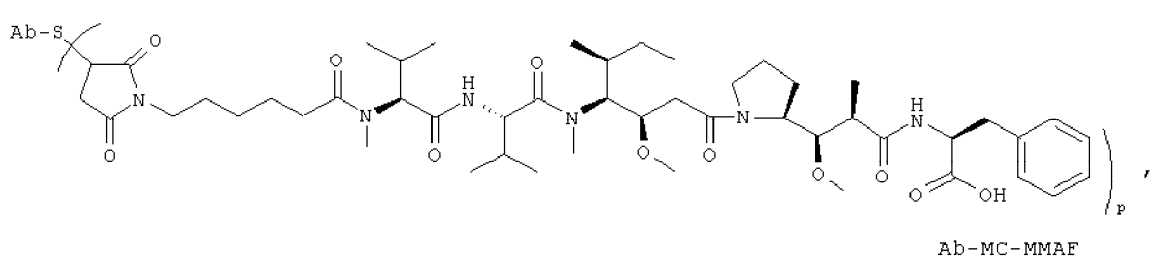
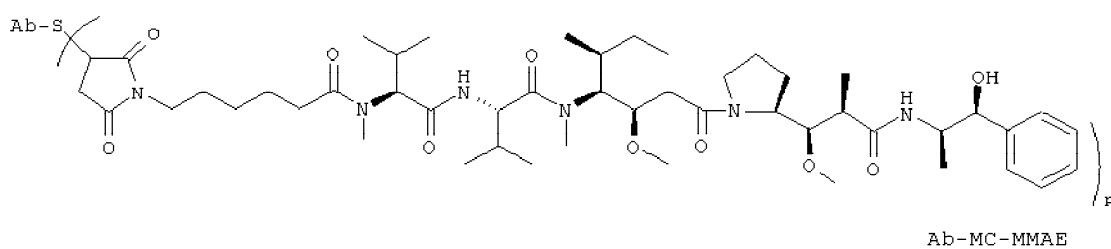
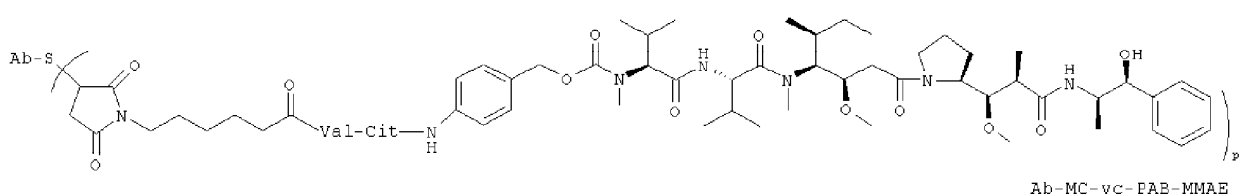
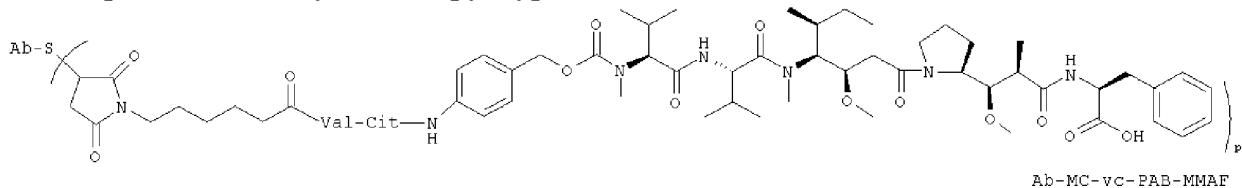




где Val представляет собой валин, и

Cit представляет собой цитруллин.

46. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство", предназначенное для конъюгирования с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, аффинными лигандами и детектируемыми метками, выбранное из следующих структур:



где Val представляет собой валин;

Cit представляет собой цитруллин;

p равно 1, 2, 3 или 4; и

Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-18.

47. Соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19, используемое для лечения рака.

48. Фармацевтическая композиция, используемая в качестве иммуноконъюгата, содержащая соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19 или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель.

49. Фармацевтическая композиция по п.48, которая дополнительно содержит терапевтически эффективное количество дополнительного химиотерапевтического средства.

50. Промышленное изделие, содержащее:

соединение-конъюгат "антитело-лекарственное средство" по п.19,  
контейнер и

5 вкладыш, вложенный в контейнер, или этикетку на упаковке, указывающий, что  
соединение может быть использовано для лечения рака.

51. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.19, содержащее одну или  
несколько последовательностей в легкой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 17, 18, 19,  
20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 45 и 46:

10 SLASASCGDRVT (SEQ ID NO: 17)  
QKPGKCPKLLI (SEQ ID NO: 18)  
EIKRTCAAPSV (SEQ ID NO: 19)  
TCAAPCVFIFPP (SEQ ID NO: 20)  
15 FIFPPCDEQLK (SEQ ID NO: 21)  
DEQLKCGTASV (SEQ ID NO: 22)  
FYPRECKVQWK (SEQ ID NO: 23)  
WKVDNCLQSGN (SEQ ID NO: 24)  
ALQSGCSQESV (SEQ ID NO: 25)  
20 VTEQDCKDSTY (SEQ ID NO: 26)  
GLSSPCTKSFN (SEQ ID NO: 27)  
FLSVSCGGRVT (SEQ ID NO: 45)  
QKPGNCPRLLI (SEQ ID NO: 46).

25

30

35

40

45

50

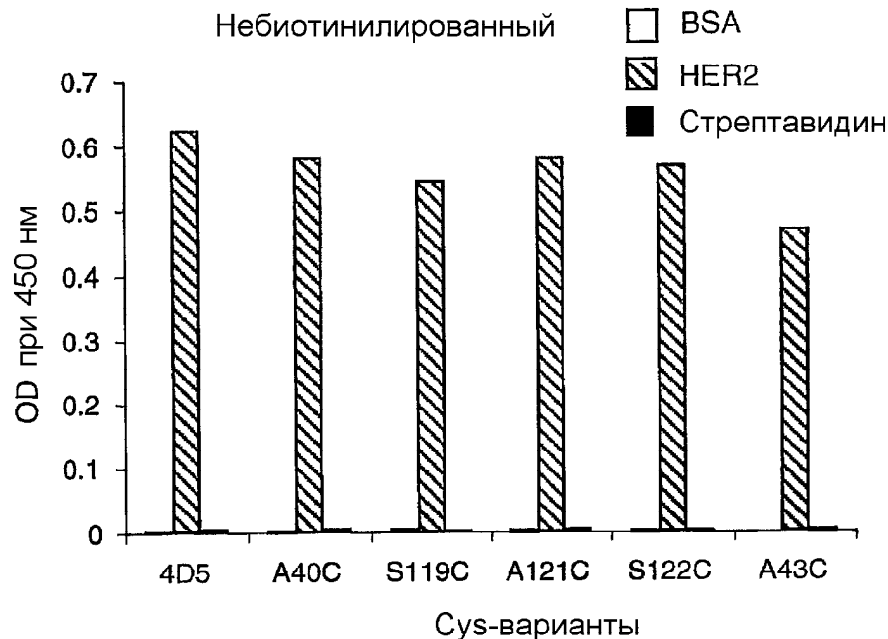
Последовательная нумерация

	10	20	30
4d5v7fabH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW		
	*****		
4d5v7fabH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW		
	10	20	30

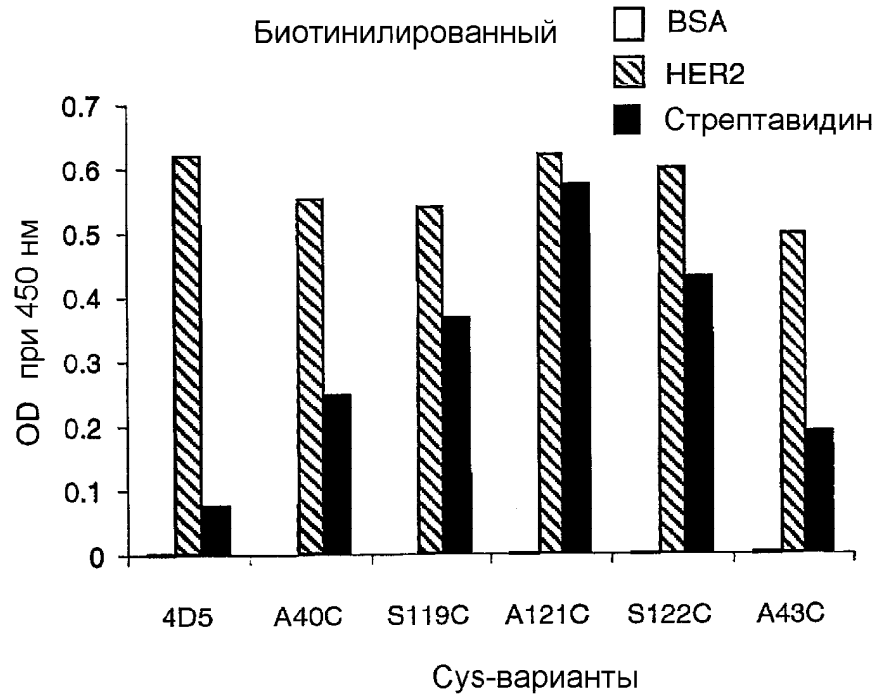
Нумерация по Кэбату

	40	50	60	70	80
4d5v7fabH	VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL				
	*****				
4d5v7fabH	VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL				
	40	50	a	60	70
					80
					abc
	90	100	110	120	130
4d5v7fabH	RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK				
	*****				
4d5v7fabH	RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK				
	90	100	abc	110	120
	140	150	160	170	180
4d5v7fabH	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS				
	*****				
4d5v7fabH	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS				
	130	140	150	160	170
	190	200	210	220	
4d5v7fabH	SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC				
	*****				
4d5v7fabH	SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC				
	180	190	200	210	

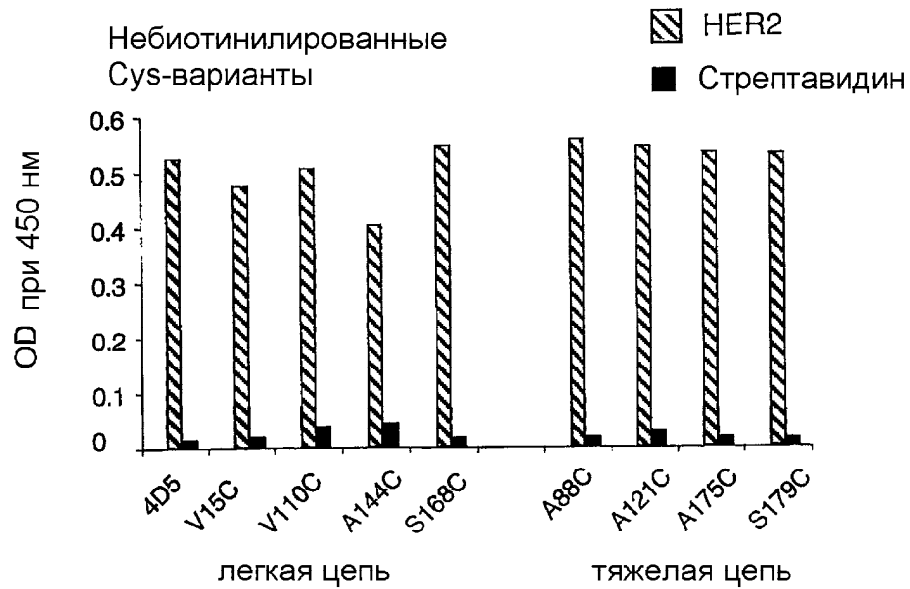
ФИГ.1В



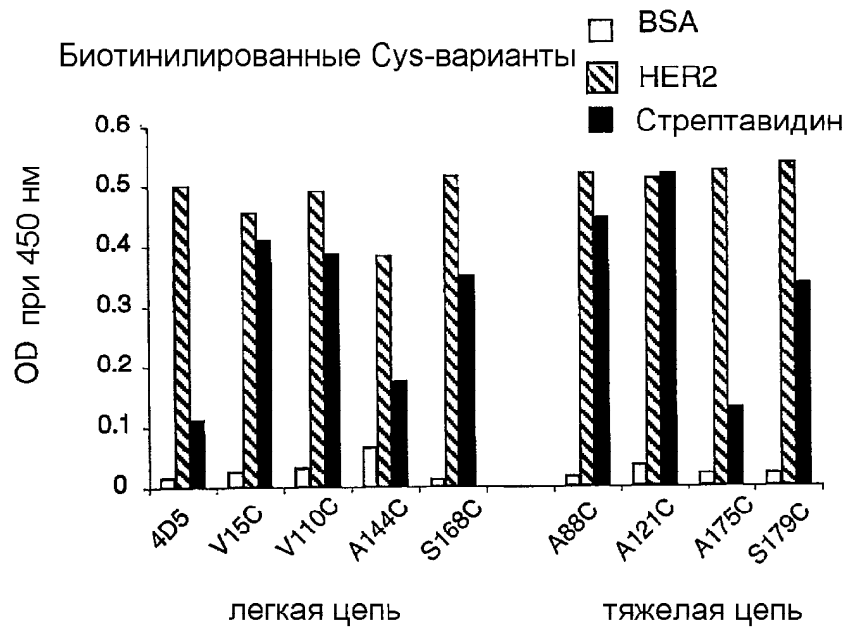
ФИГ.2А



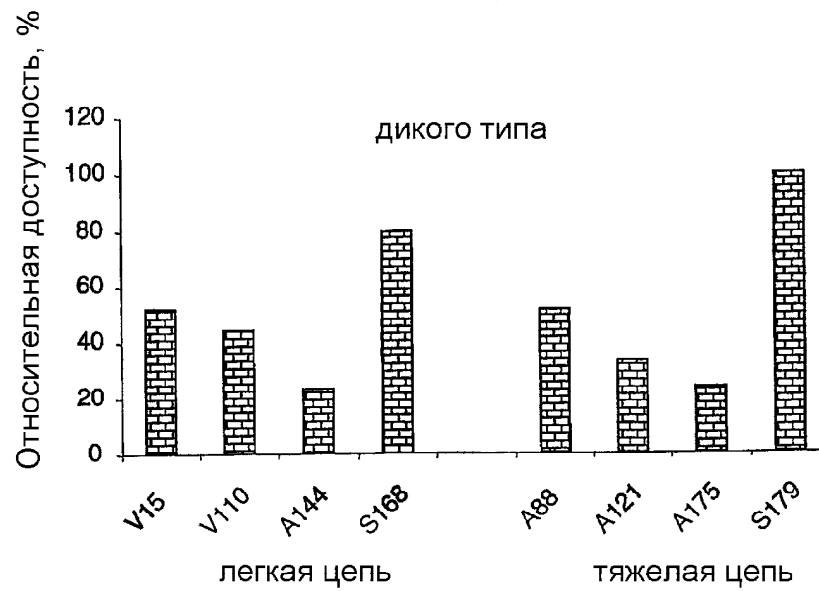
ФИГ.2В



ФИГ.3А

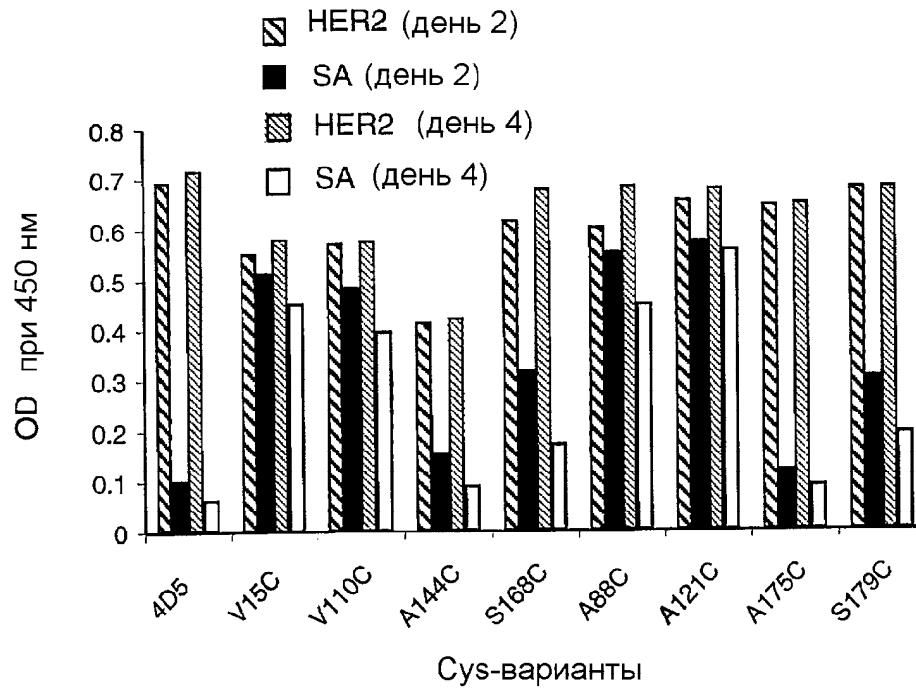


ФИГ.3В



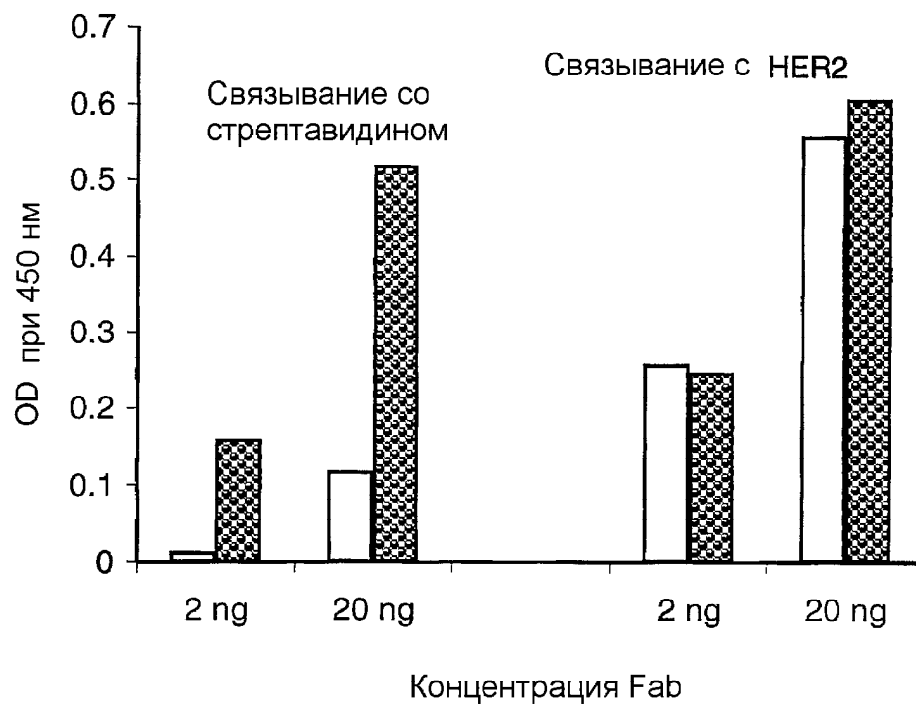
ФИГ.4А



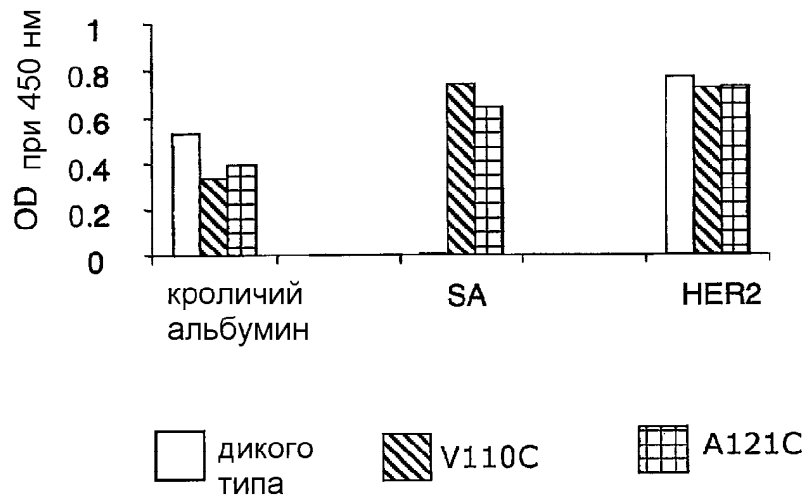


ФИГ.4В

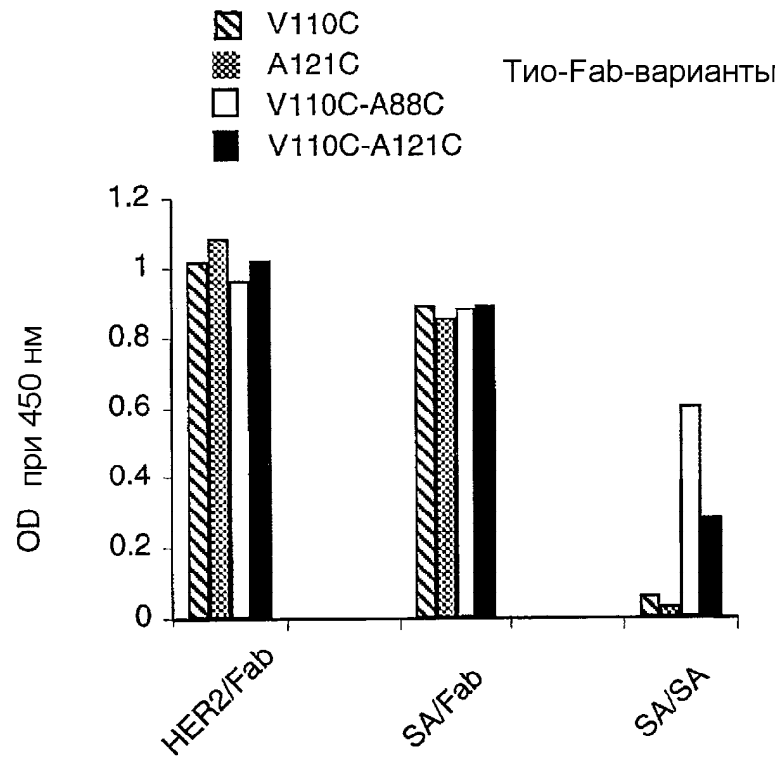
дикого типа
  A121C



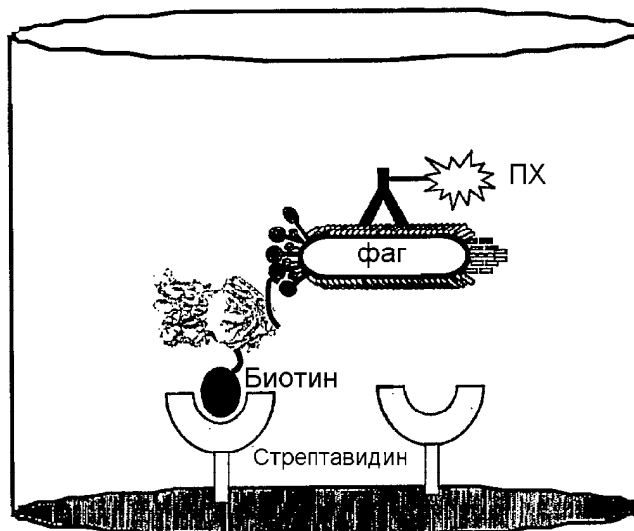
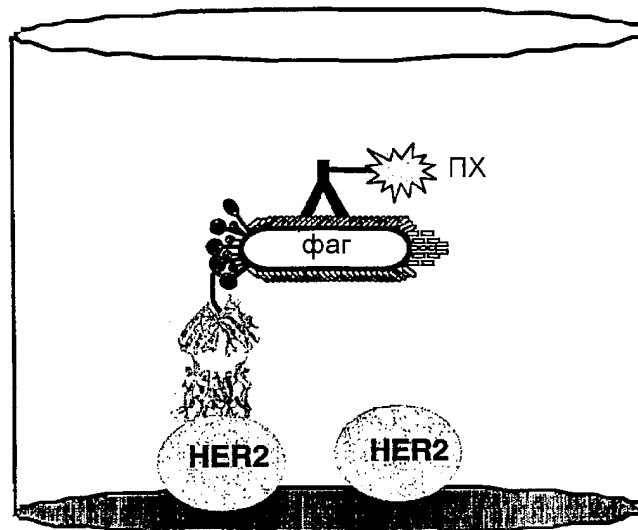
ФИГ.5



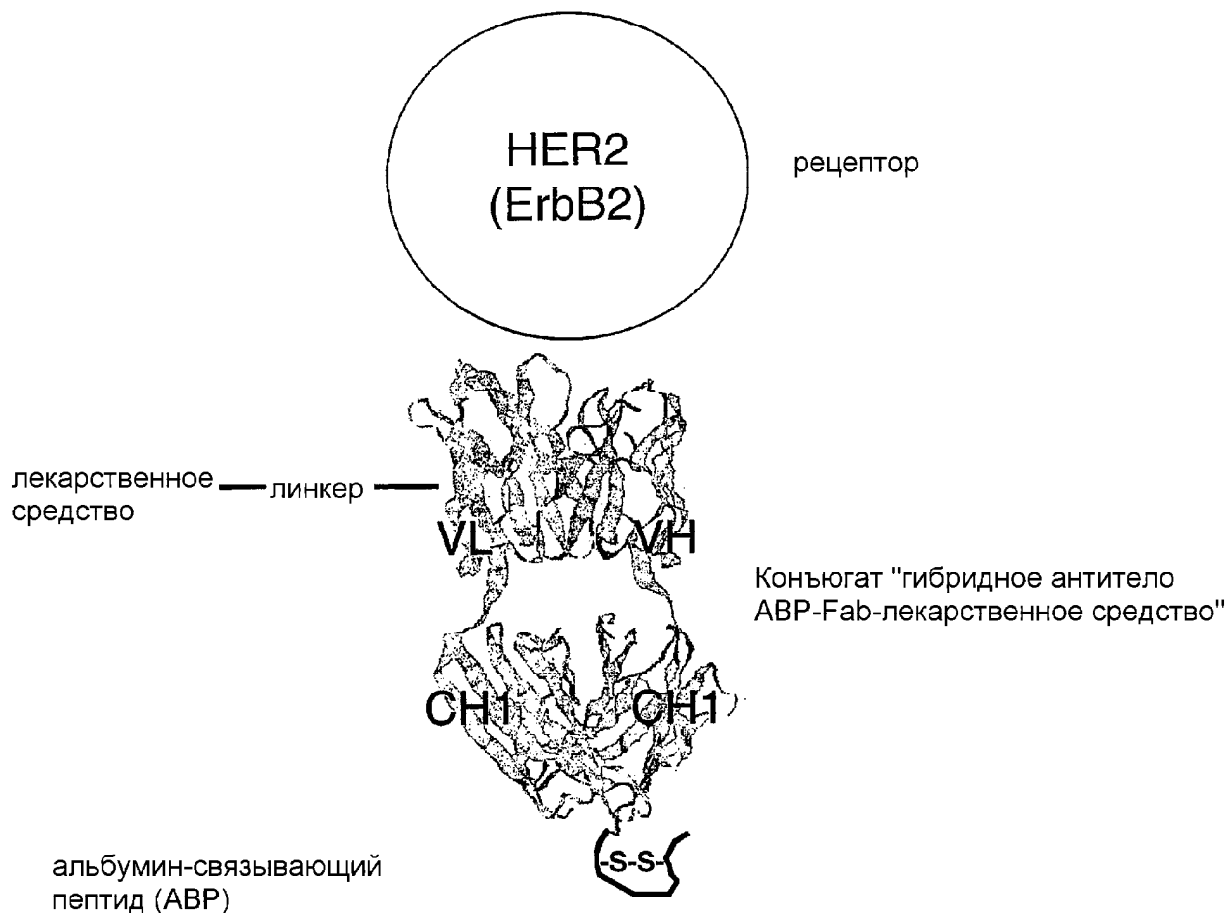
ФИГ.6



ФИГ.7

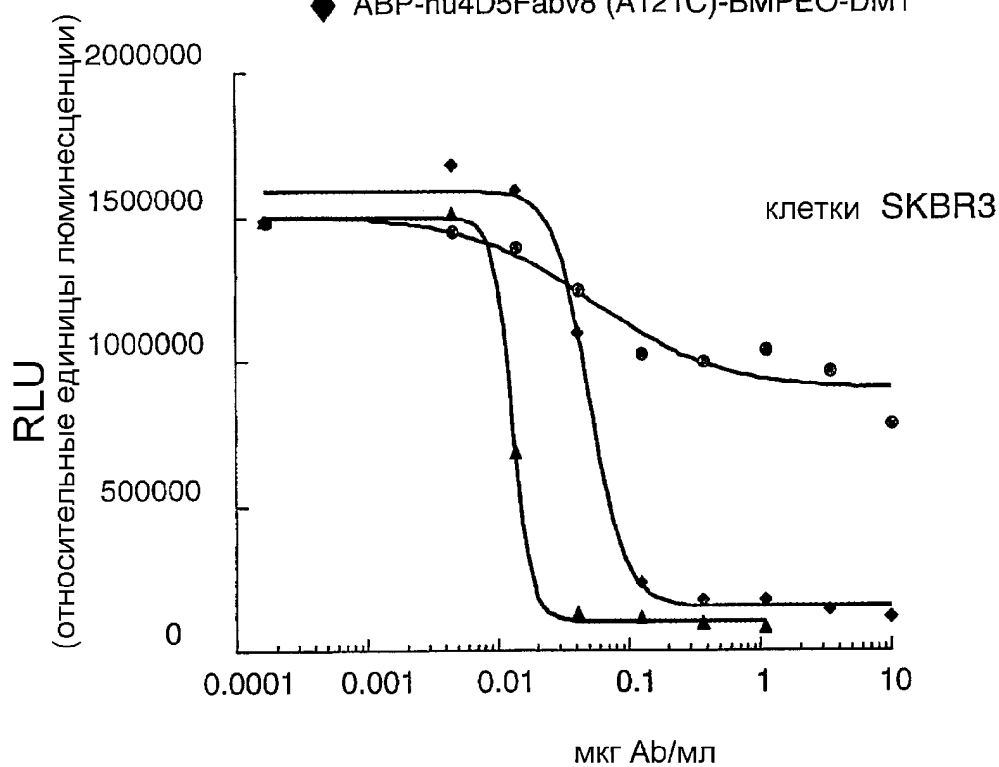


ФИГ.8

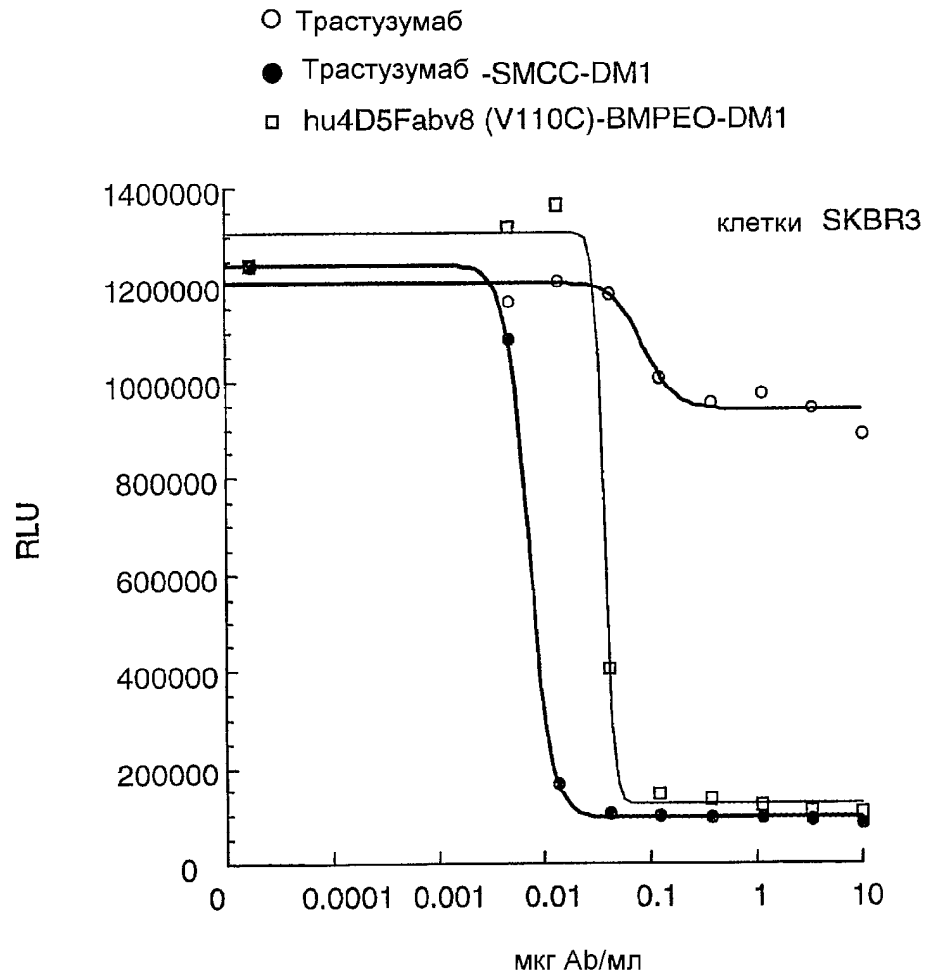


ФИГ.9

- Трастузумаб
- ▲ Трастузумаб -SMCC-DM1
- ◆ ABP-hu4D5Fabv8 (A121C)-BMPEO-DM1



ФИГ.10

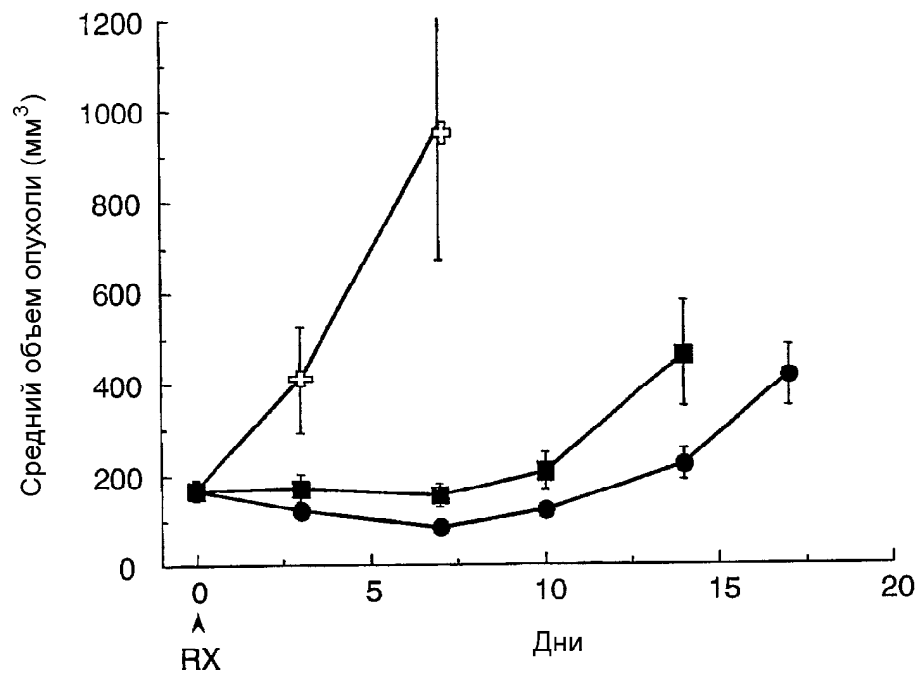


ФИГ.11

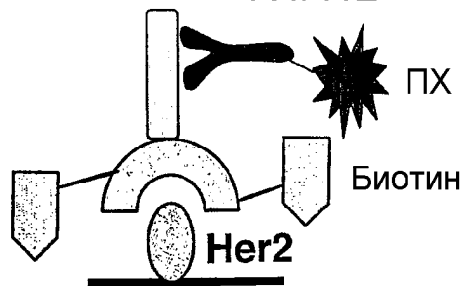
⊕ Носитель

■ ABP-hu4D5Fabv8 (V110C легкая цепь)-DM1

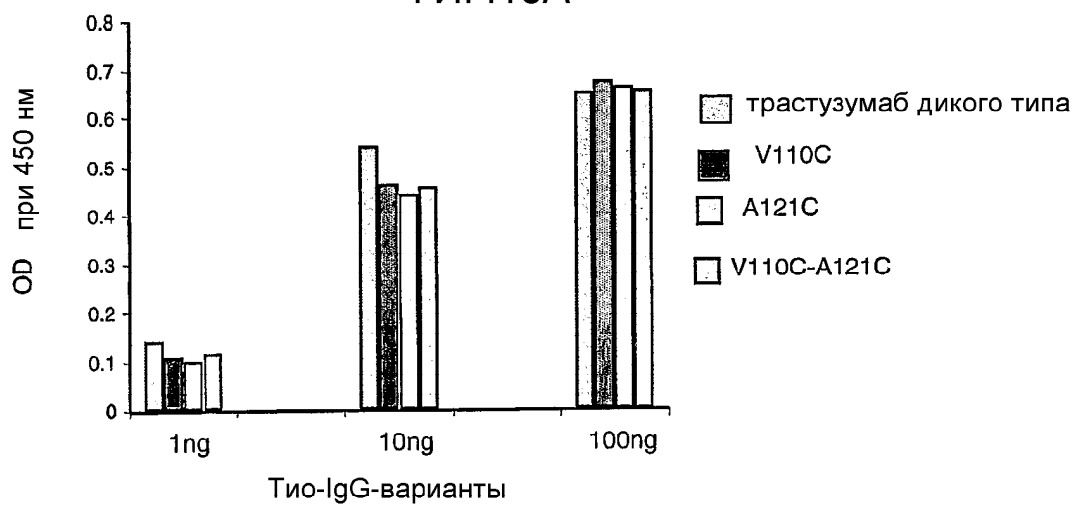
● ABP-hu4D5Fabv8 (A121C тяжелая цепь)-DM1



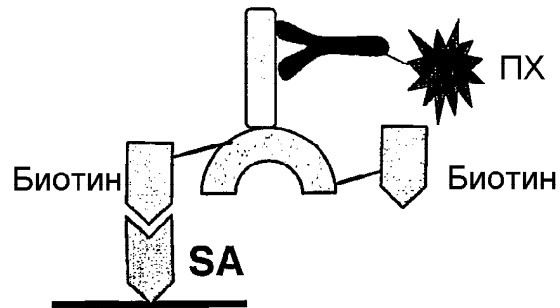
ФИГ.12



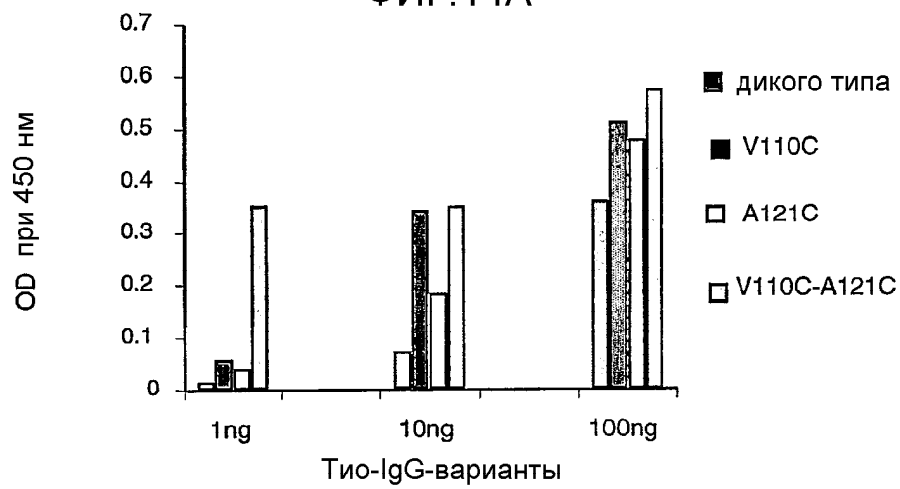
ФИГ.13А



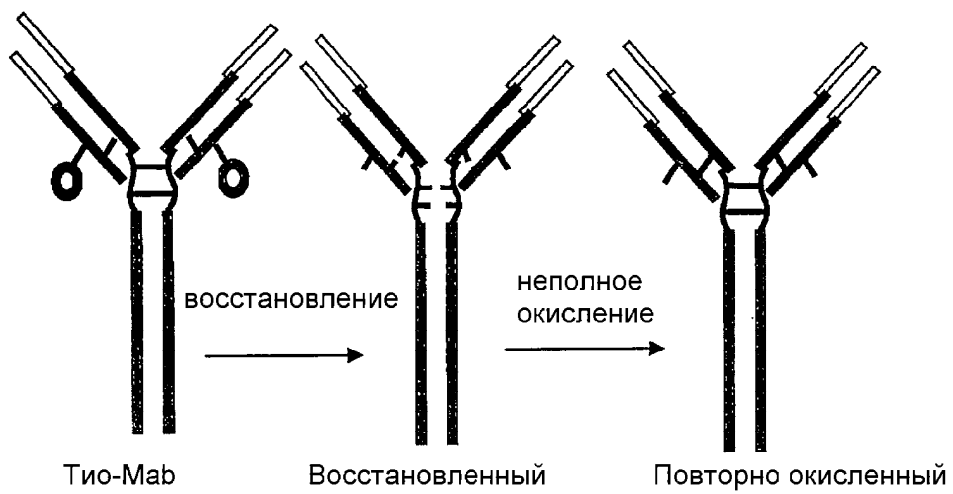
ФИГ.13В



ФИГ.14А

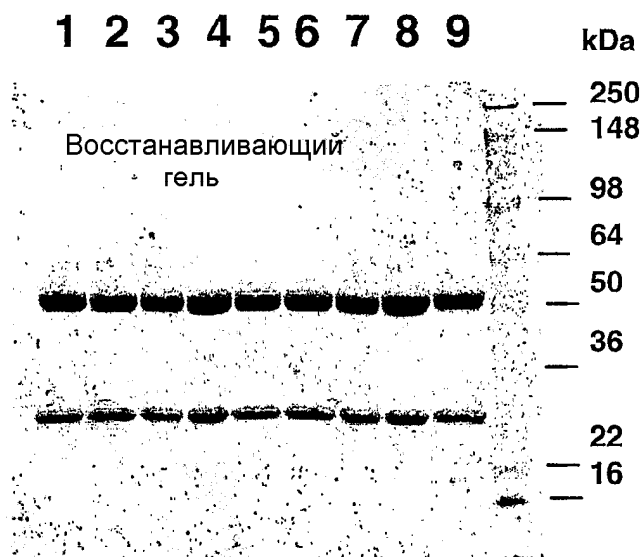
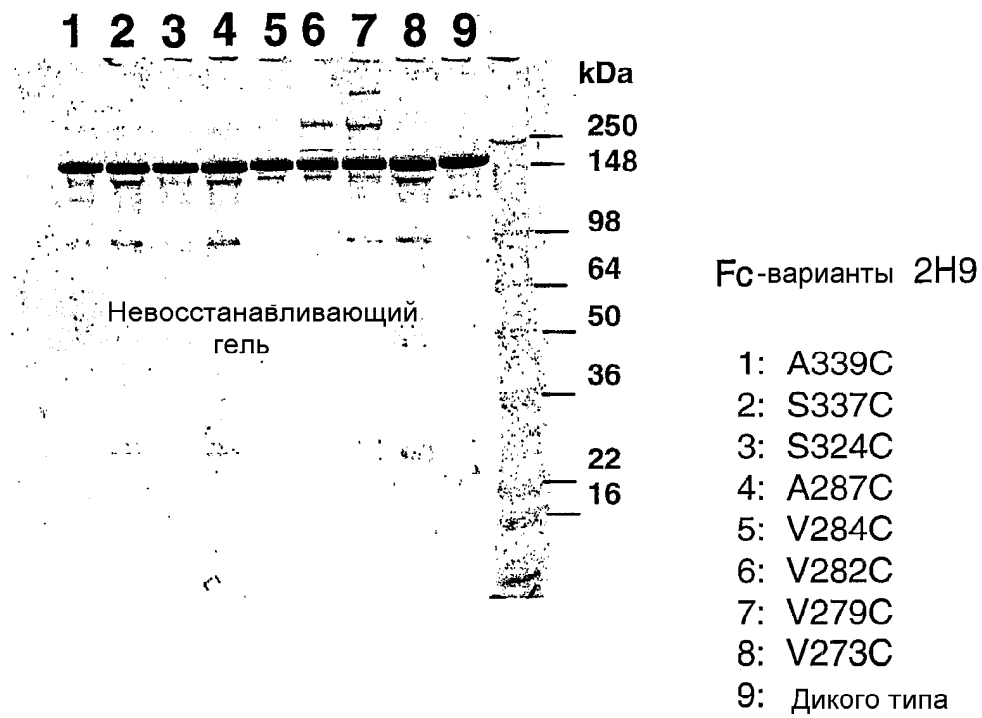


ФИГ.14В



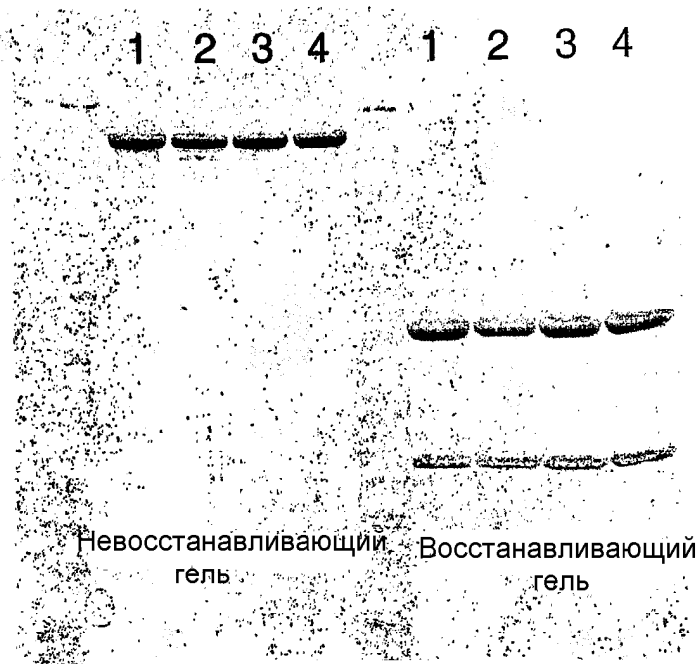
**Cys**-аддукт

ФИГ.15

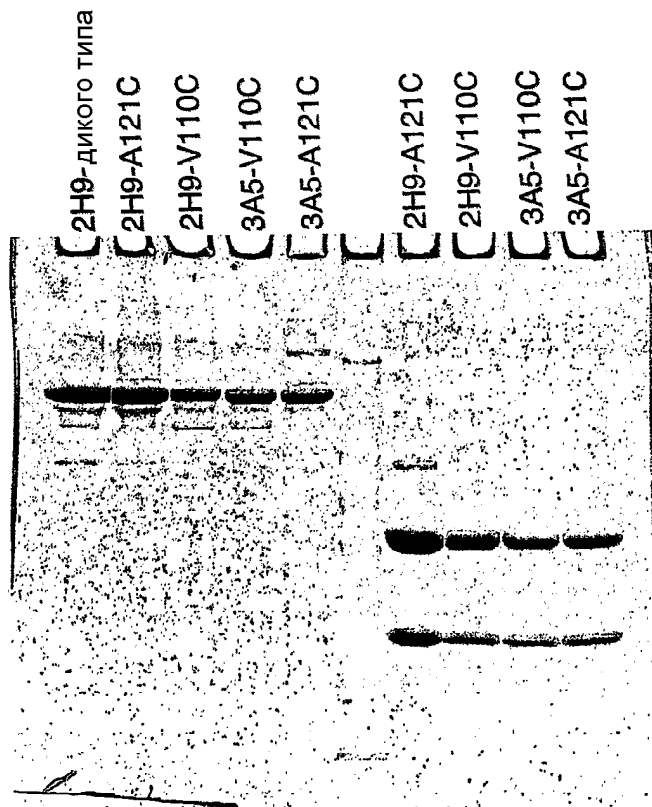


ФИГ.16

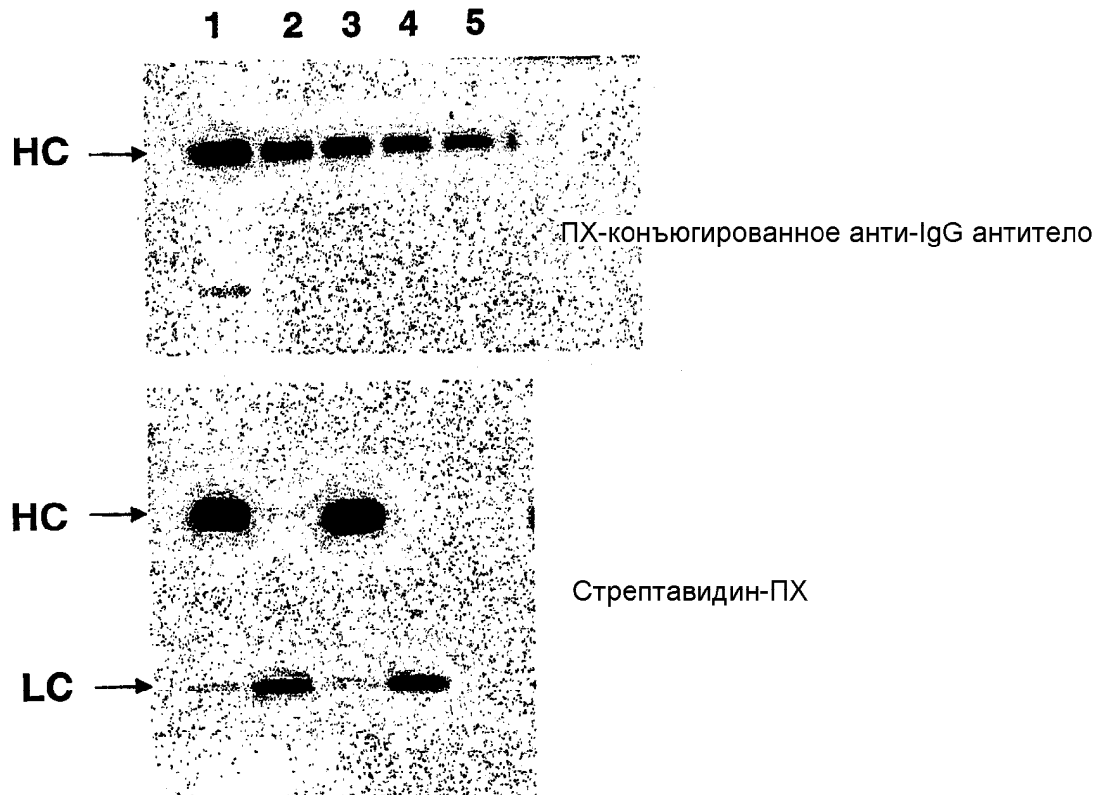




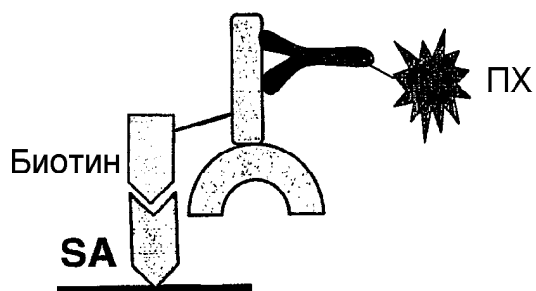
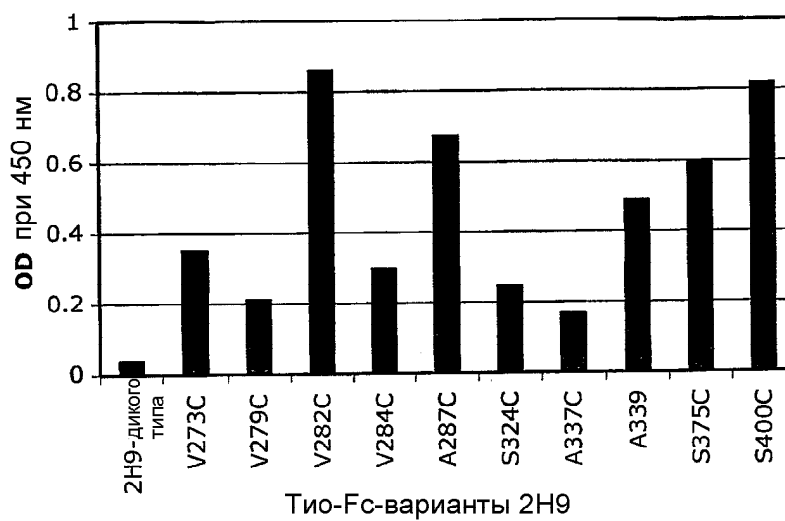
ФИГ.17А



ФИГ.17В

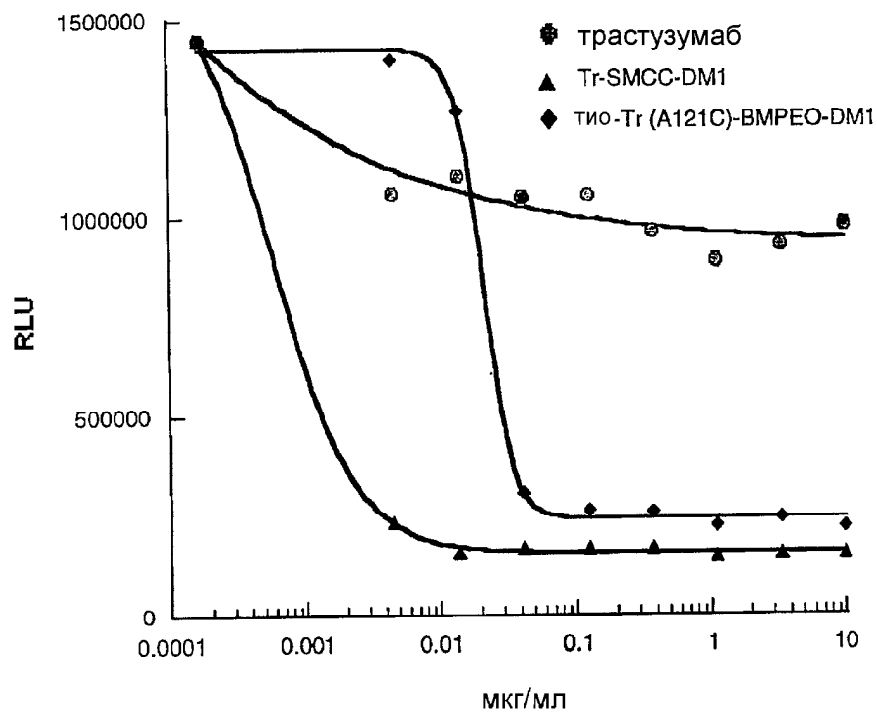


ФИГ.18  
Биотинилирование тио-Fc-вариантов 2H9

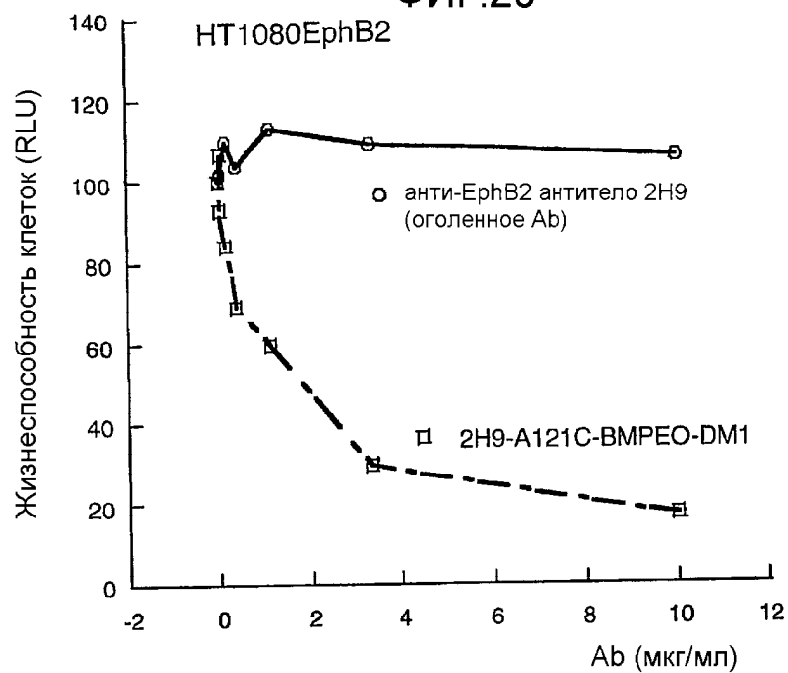


ФИГ.19

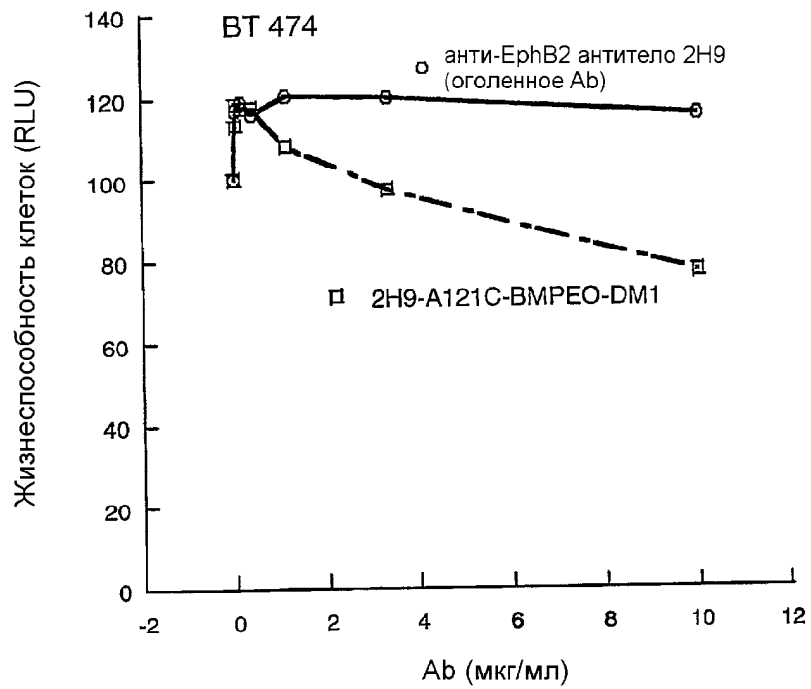
SK-BR-3



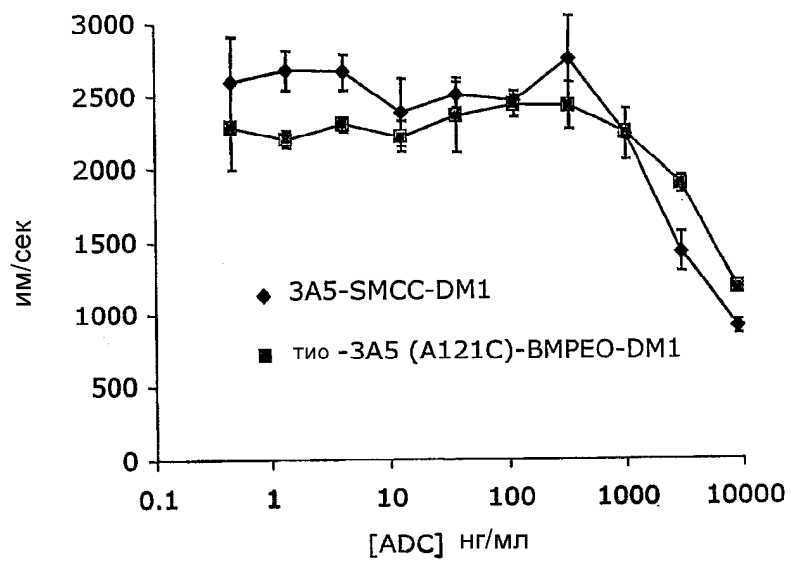
ФИГ.20



ФИГ.21А

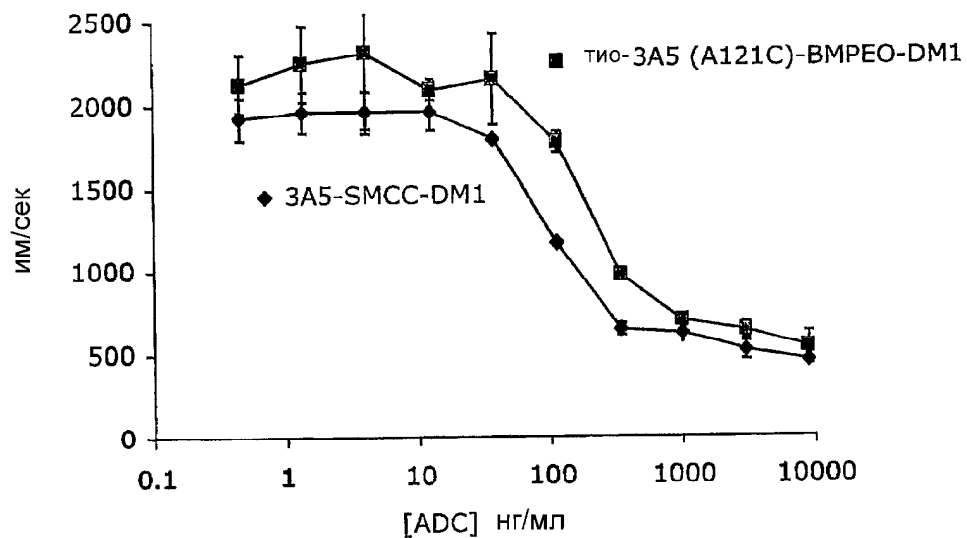


ФИГ.21В  
In vitro анализ на пролиферацию клеток PC3/neo



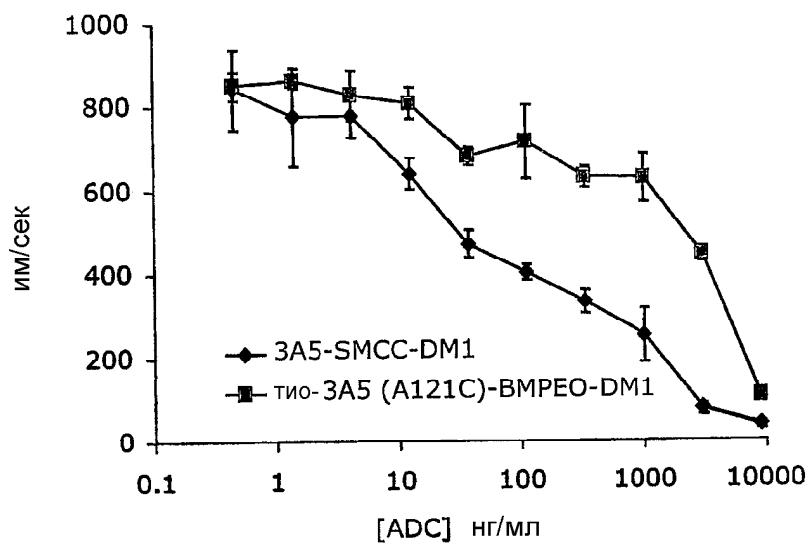
ФИГ.22

In vitro анализ на пролиферацию клеток  
PC3/MUC16

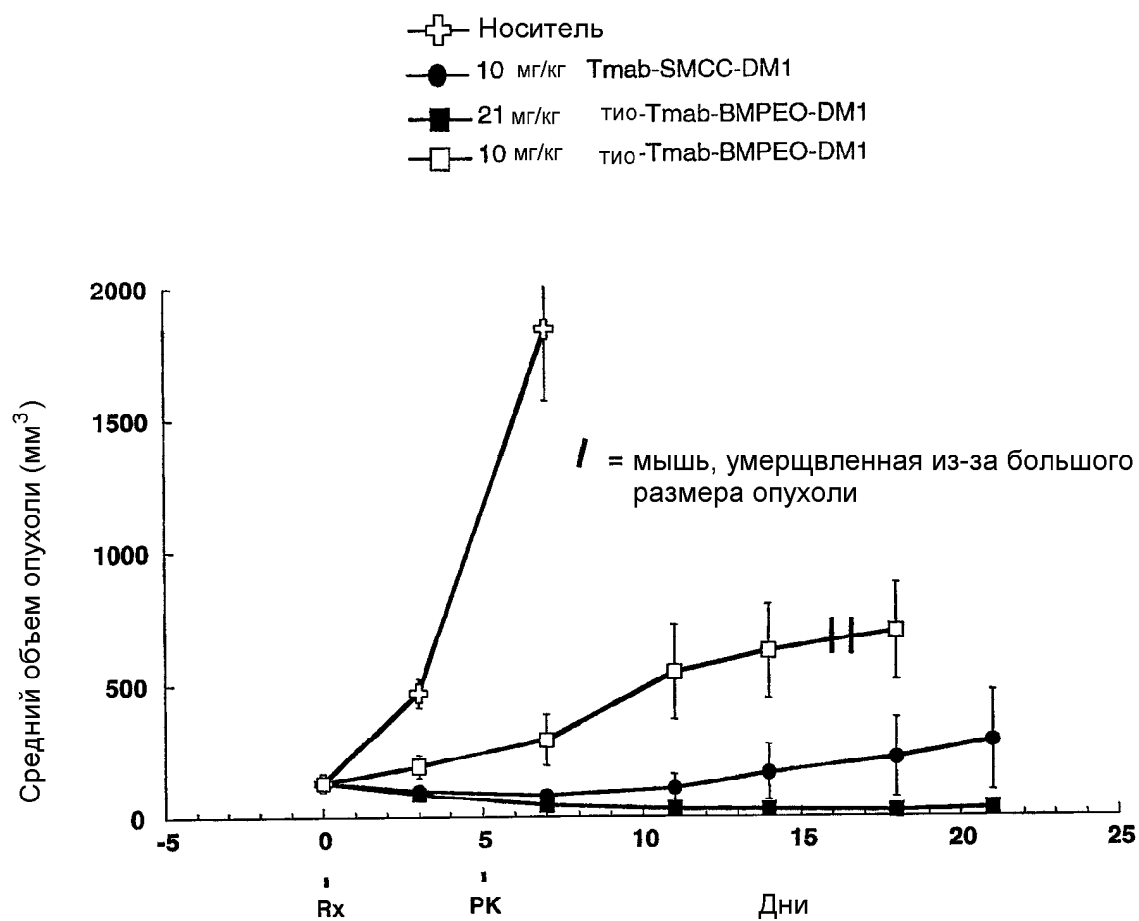


ФИГ.23

In vitro анализ на пролиферацию клеток  
OVCAR-3



ФИГ.24



ФИГ.25