

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **028744**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2017.12.29**

(21) Номер заявки  
**201390933**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.12.19**

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

### (54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ МЕЗОТЕЛИНА И ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

(31) **61/459,962**

(32) **2010.12.20**

(33) **US**

(43) **2013.12.30**

(86) **PCT/US2011/065895**

(87) **WO 2012/087962 2012.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Деннис Марк, Скейлс Сюзанна Дж.,  
Спенсер Сьюзан Д., Чжан Инь (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) FENG YANG ET AL.: "A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US, vol. 8, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1113-1118, XP009136266, ISSN: 1535-7163, page 114, right-hand column, paragraph 2 - page 115, left-hand column, paragraph 1; figure 4, page 116, right-hand column

ONDA MASANORI ET AL.: "New monoclonal antibodies to mesothelin useful for

immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 16, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 5840-5846, XP002408962, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0578, page 5844, right-hand column; tables 1,2 page 5845, left-hand column

HASSAN RAFFIT ET AL.: "Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin", CANCER IMMUNITY, ACADEMY OF CANCER IMMUNOLOGY, CH, vol. 7, 16 December 2007 (2007-12-16), page 20, XP009136272, ISSN: 1424-9634 page 2, left-hand column, page 3, right-hand column; figures 3a, 4, 5, page 5 - page 6

WO-A1-2009045957

WO-A2-2006099141

WO-A1-2010111282

ONDA M. ET AL.: "Megakaryocyte Potentiation Factor Cleaved from Mesothelin Precursor Is a Useful Tumor Marker in the Serum of Patients with Mesothelioma", CLIN. CANCER RES, vol. 12, no. 14, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 4225-4231, XP008109241, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0472, paragraph [results]; table 1

WO-A1-2009068204

WO-A1-2009120769

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с мезотелином, к иммуноконъюгатам, содержащим антитело и лекарственное средство, и к фармацевтическим композициям, содержащим иммуноконъюгат. Настоящее изобретение расширяет арсенал средств, действие которых нацелено на мезотелин для диагностики и лечения связанных с мезотелином патологических состояний.

**B1****028744****028744****B1**

### Родственные заявки

По данной заявке в соответствии с 35 USC 119(e) испрашивается приоритет предварительной заявки № 61/459962, поданной 20 декабря 2010 г., полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки.

### Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен на рассмотрение в формате ASCII посредством EFS-Web и включен в полном объеме в качестве ссылки в настоящий документ. Указанная копия ASCII, созданная 29 ноября 2011 г., названа P4532R1-WO.txt и имеет размер, равный 53169 байт.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с мезотелином, к иммуноконъюгатам, содержащим антитело и лекарственное средство, и к фармацевтическим композициям, содержащим иммуноконъюгат.

### Предпосылки создания изобретения

Мезотелин является гликопротеином клеточной поверхности, экспрессирующимся в норме в мезотелии (брюшине, перикарде и плевре). Однако экспрессия мезотелина значительно повышается в различных типах опухолей. Мезотелин взаимодействует с MUC16 (также именуемый CA125), муциноподобным гликопротеином, ранее идентифицированным как антиген опухоли яичника. MUC16 имеет внеклеточный домен, содержащий по крайней мере 14000 остатков и характеризующийся tandemными повторами, размером 156 аминокислот каждый, называемыми муциновыми повторами (см., например, O'Brien et al., Tumour Biol. 22:348-366 (2001); Yin et al., J. Biol. Chem. 276:27371-27375 (2001).) Предполагают, что взаимодействие между мезотелином и MUC16 играет роль в адгезии и метастазировании гетеротипических клеток. (см., например, Rump et al., J. Biol. Chem. 279:9190-9198 (2004)).

Мезотелин синтезируется в виде белкового предшественника размером 71 кДа, зрелая часть которого экспрессируется на клеточной поверхности. Этот белковый предшественник протеолитически расщепляется фурином на отсоединяемый компонент размером 31 кДа (именуемый мегакариоцитарным потенцирующим фактором, или MPF) и компонент мезотелина размером 40 кДа. Последний компонент может оставаться связанным с клеточной поверхностью через GPI-связь, но также может быть отщеплен протеолитическим способом.

В данной области существует острая необходимость в веществах, действие которых нацелено на мезотелин для диагностики и лечения связанных с мезотелином патологических состояний, таких как рак. Настоящее изобретение восполняет этот пробел и имеет другие преимущества.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с мезотелином, к иммуноконъюгатам, содержащим антитело и лекарственное средство, и к фармацевтическим композициям, содержащим иммуноконъюгат.

В одном из аспектов представлено выделенное антитело, которое связывается с мезотелином, где антитело выбрано из: (i) антитела, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E153 и D174, и которое в некоторых случаях имеет одну или несколько следующих характеристик: (a) не проявляет сниженного связывания с гликозилированными формами мезотелина; (b) не блокирует связывание мезотелина с MUC16; и (c) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ; (ii) антитела, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E211, и которое в некоторых случаях имеет одну или несколько следующих характеристик: (a) не блокирует связывание мезотелина с MUC19; и (b) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ; и (iii) антитела, которое связывает эпитоп в пределах аминокислот 1-131 SEQ ID NO:43 и связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело является моноклональным антителом. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело является антителом человека, гуманизированным или химерным антителом. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело является фрагментом антитела, которое связывает мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения мезотелин является мезотелином человека с последовательностью SEQ ID NO:43.

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит: (a) (i) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, (ii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и (iii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; (b) (i) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, (ii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35 и (iii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; или (c) HVR-H3, HVR-L3 и HVR-H2 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит (a) (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22; (b) (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38.

кислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39; или (c) HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело содержит (a) (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; (b) (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; или (c) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и дополнительно содержащий переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность FR2 каркасного участка SEQ ID NO:25 и FR3 последовательность SEQ ID NO:27.

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит (a) (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; (b) (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35; или (c) HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело содержит HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и дополнительно содержит переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность FR2 каркасного участка SEQ ID NO:25 и FR3 последовательность SEQ ID NO:27.

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит (a) последовательность VH, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8; (b) последовательность VL, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4; (c) последовательность VH как в (a) и последовательность VL как в (b); последовательность VH, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16; (e) последовательность VL, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12; (f) последовательность VH как в (d) и последовательность VL как в (e); последовательность VH, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности VH антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464; (h) последовательность VL, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464; или (i) последовательность VH как в (d) и последовательность VL как в (h). В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело содержит последовательность VH SEQ ID NO:8, последовательность VH SEQ ID NO:16 или последовательность VH антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В другом таком варианте осуществления изобретения антитело содержит последовательность VL SEQ ID NO:4, последовательность VL SEQ ID NO:12, или последовательность VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему (a) последовательность VH SEQ ID NO:8 и последовательность VL SEQ ID NO:4; (b) последовательность VH SEQ ID NO:16 и последовательность VL SEQ ID NO:12; (c) последовательность VH и последовательность VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464; или (d) антитело, продуцируемое гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

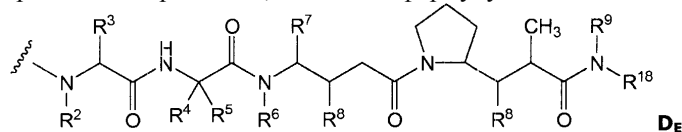
В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по любому из вышеперечисленных вариантов осуществления представляет собой антитело IgG1, IgG2a или IgG2b.

В другом аспекте изобретение относится к иммуноконъюгату формулы Ab-(L-D)<sub>n</sub>, где:

(a) Ab является антителом, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления изобретения;

(b) L представляет собой линкер;

(c) D является лекарственным средством, имеющим формулу D<sub>E</sub>

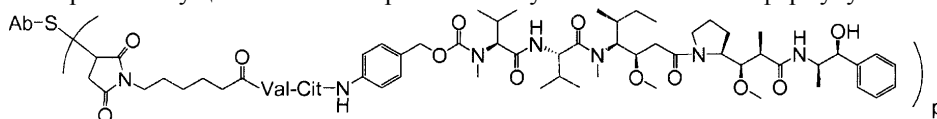


и где R<sup>2</sup> и R<sup>6</sup> каждая является метилом, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> каждая является изопропилом, R<sup>5</sup> является H, R<sup>7</sup> является втор-бутилом, каждая R<sup>8</sup> независимо выбирается из CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OH и H; R<sup>9</sup> является H; и R<sup>18</sup> является -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-арил; и

(d) p принимает значения от 1 до 8.

В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственным средством является ауристатин. В одном из таких вариантов осуществления изобретения лекарственным средством является MMAE. В другом варианте осуществления изобретения линкер имеет сайт расщепления протеазой. В одном из таких вариантов осуществления изобретения линкер содержит дипептид val-cit.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат имеет формулу



где S является атомом серы. В одном из таких вариантов осуществления изобретения p принимает значения от 2 до 5. В другом таком варианте осуществления изобретения антитело содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В другом таком варианте осуществления изобретения антитело содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35. В другом таком варианте осуществления изобретения антитело содержит (a) последовательность VH SEQ ID NO:8 и последовательность VL SEQ ID NO:4. В другом таком варианте осуществления изобретения антитело содержит (b) последовательность VH SEQ ID NO:16 и последовательность VL SEQ ID NO:12.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей иммуноконъюгат, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое вещество. В одном из таких вариантов осуществления изобретения терапевтическим средством является гемцитабин. В другом таком варианте осуществления изобретения дополнительным терапевтическим средством являются антитела против MUC16, конъюгированные с цитотоксическим агентом.

В дополнительном аспекте изобретение относится к иммуноконъюгату, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления изобретения для применения в качестве лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к иммуноконъюгату, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления изобретения для применения в лечении положительных по мезотелину раковых опухолей. В одном из таких вариантов осуществления изобретения положительное по мезотелину злокачественное новообразование выбрано из рака поджелудочной железы, рака яичников, рака легкого, рака эндометрия и мезотелиомы. В другом таком варианте осуществления изобретения положительный по мезотелину рак является раком, положительным по двум антигенам.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления, где антитело конъюгировано с меткой. В одном из вариантов осуществления изобретения меткой является излучатель позитронов. В одном из таких вариантов осуществления изобретения излучателем позитронов является <sup>89</sup>Zr.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано, что мезотелин образуется путем протеолитического расщепления белкового предшественника с отделением 31 кДа компонента (называемого мегакариоцитарным потенцирующим фактором, или MPF) и 40 кДа компонента мезотелина. Последний компонент может оставаться связанным с клеточной поверхностью, но может также быть отделен. "CHO" обозначает четыре сайта гликозирования, один - в MPF и три - в мезотелине.

На фиг. 2 показано графическое представление уровней экспрессии гена мезотелина человека в различных тканях, как описано в примере А.

На фиг. 3 показаны свойства моноклональных антител против мезотелина, выделенных, как описано в примере В.

На фиг. 4 показано совмещение мышинных последовательностей варибельной области легкой цепи антитела 7D9 (mu7D9) и их гуманизированных вариантов (7D9.v1 и 7D9.v3).

На фиг. 5 показано совмещение мышинных последовательностей варибельной области тяжелой цепи антитела 7D9 (mu7D9) и их гуманизированных вариантов (7D9.v1 и 7D9.v3).

На фиг. 6 показаны свойства химерных и гуманизированных вариантов 7D9, как описано в примере С.

На фиг. 7 показано совмещение мышинных последовательностей варибельной области легкой цепи антитела 22A10 (22A10) и их гуманизированных вариантов (hu22A10graft и 22A10.v83).

На фиг. 8 показано совмещение мышинных последовательностей варибельной области тяжелой цепи антитела 22A10 (22A10) и их гуманизированных вариантов (hu22A10graft и 22A10.v83).

На фиг. 9А показан анализ Скэтчарда гуманизированных вариантов 22A10 на стабильно трансфицированных мезотелином клетках ВJAB, как описано в примере С.

На фиг. 9В показана иммунопреципитация мезотелина под действием гуманизированных вариантов 22A10 из тех же самых стабильно трансфицированных клеток ВJAB, как описано в примере С.

На фиг. 10А показаны последовательности гиперварибельных и каркасных областей гуманизированных вариантов 7D9.

На фиг. 10В показаны последовательности гиперварибельных и каркасных областей гуманизированных вариантов 22A10.

На фиг. 1L показана гомология последовательностей мезотелина из разных видов, как описано в примере D. На фиг. 11 представлены SEQ ID NO:43 и 46-48 соответственно в порядке встречаемости.

На фиг. 12 показана перекрестная реактивность h7D9.v3 и h22A10.v83 с мезотелином из разных видов, как описано в примере D.

На фиг. 13 показана аффинность связывания гуманизированных антител против мезотелина, как определено анализом Скэтчарда трансфицированных клеточных линий, стабильно экспрессирующих мезотелин, и клеточных линий, экспрессирующих эндогенных мезотелин, как описано в примере E.

На фиг. 14 показаны результаты конкурентного анализа антитела 7D9 или 22A10 и других моноклональных антител, перечисленных на фиг. 3, как описано в примере F.

На фиг. 15 показаны конструкторы химерного мезотелина, используемые для картирования эпитопа (начерчены в масштабе), как описано в примере G. На фиг. 15 показаны "EVEK", "DAEQ" и "DVER" в виде SEQ ID NO:51-53 соответственно.

На фиг. 16 показаны результаты FACS по оценке связывания 7D9 и 22A10 с клетками, экспрессирующими химерный мезотелин, как описано в примере G.

На фиг. 17 показана мутационная стратегия для идентификации аминокислот, с которыми связываются h7D9.v3 и h22A10.v83, как описано в примере G. На фиг. 17 представлена "EVEK" в виде SEQ ID NO:51; "Human132-212", "Cyno132-212", "Rat132-212" и "Mouse132-212" в виде SEQ ID NO:54-57 соответственно; человеческие и мышинные "MUT1", "MUT3", "MUT6", "MUT7", "MUT9", "MUT10", "MUT13" и "MUT15" в виде SEQ ID NO:58-73 соответственно и "STKD" и "SVKD" в виде SEQ ID NO:73 и 74 соответственно.

На фиг. 18А показаны результаты FACS по оценке связывания h7D9.v3 и h22A10.v83 с клетками, экспрессирующими мутантные белки мезотелина человека, как описано в примере G.

На фиг. 18В показаны результаты FACS по оценке связывания h7D9.v3 с клетками, экспрессирующими мутантные белки мезотелина яванского макака, как описано в примере G.

На фиг. 19 показаны ключевые аминокислотные остатки в пределах эпитопов, с которыми связываются 7D9/h7D9.v3 и 22A10/h22A10.v83, как описано в примере G. На фиг. 19 представлены SEQ ID NO:54-57 соответственно в порядке встречаемости.

На фиг. 20 показано связывание h7D9.v3 с гликозилированным мезотелином, как описано в примере H.

На фиг. 21 показаны результаты двух анализов по выявлению наличия или отсутствия блокирования связывания мезотелина с MUC19 под действием антител 19C3, 7D9 и 22A10 и наоборот, как описано в примере I.

На фиг. 22 показана экспрессия мезотелина в протоковой аденокарциноме поджелудочной железы способом иммуногистохимии (ИHC), как описано в примере J.

На фиг. 23 показана экспрессия мезотелина в серозной аденокарциноме яичников способом иммуногистохимии (ИHC), как описано в примере J.

На фиг. 24 показана экспрессия мезотелина в аденокарциноме немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) способом иммуногистохимии (ИHC), как описано в примере J.

На фиг. 25 показана экспрессия мезотелина в тканях яванского макака (панели справа) способом иммуногистохимии (ИHC), как описано в примере J.

На фиг. 26 показано, что иммуноконъюгат h7D9.v3-vcMMAE демонстрирует эффективность действия в ксенотрансплантате поджелудочной железы HPAC, как описано в примере L.

На фиг. 27 показано, что иммуноконъюгат h7D9.v3-vcMMAE демонстрирует эффективность действия в исходном ксенотрансплантате поджелудочной железы, как описано в примере М.

На фиг. 28 показано, что иммуноконъюгат h7D9.v3-vcMMAE демонстрирует эффективность действия в модели ксенотрансплантата опухоли яичника, как описано в примере N.

На фиг. 29 показано, что иммуноконъюгат h7D9.v3-vcMMAE демонстрирует эффективность действия в модели ксенотрансплантата плоскоклеточной карциномы легкого, как описано в примере О.

На фиг. 30 показано, что эффективность действия иммуноконъюгата h7D9.v3-vcMMAE в отношении мезотелина человека подобна таковой иммуноконъюгата h22A10.v83-vcMMAE в отношении мезотелина яванского макака в опухолевых моделях ксенотрансплантата трансфицированных клеток VJAB, как описано в примере Р.

На фиг. 31 показано, что эффективность действия иммуноконъюгата h7D9.v3-vcMMAE подобна таковой иммуноконъюгата h22A10.v83-vcMMAE в мезотелиоме и моделях опухоли яичника, как описано в примере Р.

На фиг. 32 показано, что MUC16 образует комплекс с мезотелином, и два белка совместно отделяются от клеточных линий, положительных по двум антигенам, как описано в примере Q.

На фиг. 33 показано, что 19C3, но не 7D9, вытесняет предварительно связанный MUC16 от мезотелина.

### Подробное описание вариантов осуществления изобретения

#### I. Определения

"Акцепторный каркасный участок человека" в рамках настоящего документа является каркасным участком, содержащим аминокислотную последовательность каркасного участка варибельного домена легкой цепи (VL) или каркасного участка варибельного домена тяжелой цепи (VH) из каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусного каркасного участка человека, как указано ниже. Акцепторный каркасный участок человека, "полученный из" каркасного участка иммуноглобулина человека или консенсусного каркасного участка человека, может содержать ту же самую аминокислотную последовательность вышеуказанного, или он может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения число аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения акцепторный каркасный участок человека VL идентичен последовательности каркасного участка VL иммуноглобулина человека или последовательности консенсусного каркасного участка человека.

"Аффинность" относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, "аффинность связывания" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X для ее партнера Y может в целом быть охарактеризована константой диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность может быть измерена общепринятыми способами, известными в данной области техники, включая таковые, описанные в настоящем документе. Конкретные иллюстративные и типичные варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны ниже.

Антитело с "созревшей аффинностью" относится к антителу с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гиперварибельных участках (HVR) в сравнении с исходным антителом, которому не свойственны такие изменения, приводящие к улучшению аффинности связывания антитела с антигеном.

Термины "антитело против мезотелина" и "антитело, которое связывается с мезотелином" относятся к антителу, которое способно связывать мезотелин с достаточной аффинностью, благодаря чему антитело может быть эффективным в качестве диагностического и/или терапевтического средства при направленном воздействии на мезотелин. В одном из вариантов осуществления изобретения степень связывания антитела против мезотелина с белком, отличным от мезотелина, составляет приблизительно менее 10% связывания данного антитела с мезотелином согласно измерениям, например, радиоиммуноанализа (RIA). В определенных вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывается с мезотелином, имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М). В определенных вариантах осуществления изобретения антитело против мезотелина связывается с эпителиом мезотелина, который консервативен у мезотелинов из разных биологических видов.

Термин "антитело" используется в настоящем документе в самом широком смысле слова и охватывает различные структуры антитела, включая, помимо прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антитела при условии, что они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность.

"Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела и связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры

фрагментов антитела включают, помимо прочего, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антитела (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела.

"Антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом", что и контрольное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание контрольного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, контрольное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Типичный конкурентный анализ представлен в настоящем документе.

Термины "злокачественное новообразование" или "рак" относятся к физиологическому состоянию или его описывают у млекопитающих, что обычно характеризуется нерегулируемым клеточным ростом/пролиферацией. Примеры рака включают, помимо прочего, карциному, лимфому (например, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), бластому, саркому и лейкемию. Более частные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак простаты, рак вульвы, рак щитовидной железы, печеночную карциному, лейкемию и другие лимфопролиферативные нарушения, и различные типы рака головы и шеи.

Термин "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, в то время как оставшаяся часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

"Класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, имевшихся у тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно.

Термин "цитотоксический агент" в том смысле, в котором он здесь используется, относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клетки. Цитотоксические агенты включают, помимо прочего, радиоактивные изотопы (например, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические средства или лекарственные препараты (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубин или другие интеркалирующие агенты); ингибиторы роста; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая фрагменты и/или варианты вышеупомянутого; и различные противоопухолевые или противораковые средства, рассмотренные ниже.

Термин "положительное по двум антигенам злокачественное новообразование" относится к злокачественной опухоли, содержащей клетки, которые положительны как по мезотелину, так и по MUC16.

Термин "положительная по двум антигенам клетка" относится к клетке, которая экспрессирует как мезотелин, так и MUC16 на своей поверхности.

"Эффекторные функции" относятся к тем биологическим активностям, свойственным области Fc антитела, которые варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; снижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и B-клеточная активация.

"Эффективное количество" вещества, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение необходимых периодов времени для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Термин "эпитоп" относится к определенному участку на молекуле антигена, с которым связывается антитело.

Термин "Fc область" в настоящем документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по крайней мере часть константной области. Термин содержит нативную последовательность Fc областей и отличные от нее Fc области. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226, или от Pro230, до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc области может присутствовать или отсутствовать. Если иное не указано в настоящем документе, нумерацию аминокислотных остатков в Fc области или константной области осуществляют в соответствии с нумерационной системой EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Каркасный участок" или "FR" относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков гиперварибельной области (HVR). FR варибельного домена, в основном, состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно последовательности HVR и FR, как правило, появляются в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении антитела, имеющего структуру, в значительной степени сходную со структурой нативного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc область, как указано в настоящем документе.

Термин "гликозилированные формы мезотелина" относится к природным формам мезотелина, которые модифицируются на посттрансляционном уровне путем добавления углеводных остатков.

Термины "клетка-хозяин", "клеточная линия-хозяин" и "клеточная культура-хозяин" используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают исходную трансформированную клетку и потомство, полученное из нее без учета числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновой кислоты, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое имеет те же самые функции или биологическую активность, классифицированную или отобранную в первоначально трансформированной клетке, включено в настоящий документ.

"Антитело человека" представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует антителу, продуцируемому человеком или клеткой человека или получено из отличного от человека источника, который использует репертуар антител человека или другие кодирующие антитело последовательности человека. Это определение антитела человека исключает гуманизированное антитело, содержащее антиген-связывающие остатки, отличные от таковых человека.

"Консенсусная каркасная область человека" является каркасной областью, которая представляет наиболее часто встречаемые аминокислотные остатки при отборе последовательностей каркасной области VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, отбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей варибельного домена. Как правило, подгруппа последовательностей является подгруппой, как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одном из вариантов осуществления изобретения для VL, подгруппа является подгруппой каппа I, как в Kabat et al., см. выше. В одном из вариантов осуществления изобретения для VH, подгруппа является подгруппой III, как в Kabat et al., см. выше.

"Гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из HVR, отличных от человеческих, и аминокислотные остатки из FR человека. В определенных вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело содержит практически весь по крайней мере один, и обычно два, варибельных домена, где все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым антитела, отличного от человеческого, и все или практически все FR соответствуют таковым антитела человека. Гуманизированное антитело в некоторых случаях может включать по крайней мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. "Гуманизированная форма" антитела, например, отличное от человека антитело, относится к антителу, которое претерпело гуманизацию.

Термин "гиперварибельный участок" или "HVR" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к каждому из участков варибельного домена антитела, которые являются гиперварибельными по последовательности и/или образуют заданные структурой петли ("гиперварибельные петли").

Как правило, нативные четырехцепочечные антитела включают шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, включают аминокислотные остатки из гиперварибельных петель и/или из "определяющих комплементарность областей" (CDR), при этом последние из упомянутых обладают наибольшей варибельностью последовательности и/или вовлечены в распознавание антигена. Типичные гиперварибельные петли образованы аминокислотными остатками 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Типичные CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) образованы аминокислотными остатками 24-34 области L1, 50-56 области L2, 89-97 области L3, 31-35B области H1, 50-65 области H2 и 95-102 области H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). За исключением CDR1 в VH, CDR, как правило, включают аминокислотные остатки, образующие гиперварибельные петли. CDR также включают "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые являются остатками, взаимодействующими с антигеном. SDR находятся внутри областей CDR, условно названными-CDR, или a-CDR. Типичные a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 и a-CDR-H3) образованы аминокислотными остатками 31-34 области L1, 50-55 области L2, 89-96 области L3, 31-35B области H1, 50-58 области H2 и 95-102 области H3 (см. Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в варибельном домене (например, остатки FR) пронумеро-



ваны в настоящем документе в соответствии с Kabat et al., см. выше.

"Иммуноконъюгат" является антителом, конъюгированным с одной или несколькими гетерологическими молекулами, включая, помимо прочего, цитотоксический агент.

"Индивидуум" или "индивид" является млекопитающим. Млекопитающие включают, помимо прочего, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, как, например, обезьян), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В определенных вариантах осуществления, индивидуумом или индивидом является человек.

"Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое было отделено от примеси его природного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело очищают до более, чем 95% или 99% степени чистоты, что определяется, например, электрофоретическими (например, SDS-PAGE, изоэлектрическое фокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографическими (например, ионно-обменная или обращено-фазовая HPLC) способами. Для детального рассмотрения способов оценки чистоты антител см., например, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Выделенная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от примеси ее природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые, как правило, содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты находится вне хромосомы или имеет хромосомную локализацию, отличную от ее природной хромосомной локализации.

"Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против мезотелина", относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая такую(ие) молекулу(ы) нуклеиновой кислоты в составе единичного вектора или отдельных векторов, и такую(ие) молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, имеющую(ие) одну или несколько локализаций в клетке-хозяине.

Термин "мезотелин" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к любому природному, зрелому мезотелину, образованному в результате процессинга белкового предшественника мезотелина в клетке. Термин содержит мезотелин из любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди и яванские макаки) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Термин также содержит природные варианты мезотелина, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типичного белкового предшественника мезотелина человека приведена в SEQ ID NO:42, и типичный мезотелин человека приведена в SEQ ID NO:43. Дополнительные типичные последовательности мезотелина описаны в настоящем документе.

Термин "положительное по мезотелину злокачественное новообразование" относится к злокачественной опухоли, содержащей клетки, которые экспрессируют мезотелин на своей поверхности.

Термин "положительная по мезотелину клетка" относится к клетке, которая экспрессирует мезотелин на своей поверхности.

Термин "моноклональное антитело" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в состав популяции, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающих во время производства препаратов моноклонального антитела, при этом такие варианты антител в основном присутствуют в следовых количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на свойство антитела, полученного из практически гомогенной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее производства антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие использованию в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены разными методиками, включая, помимо прочего, гибридную технологию, биотехнологию на основе рекомбинантной ДНК, способы фагового дисплея и способы применения трансгенных животных, содержащих все или часть локусов иммуноглобулина человека, при этом такие способы или другие типовые способы создания моноклональных антител описаны в настоящем документе.

Термин "положительное по MUC16 злокачественное новообразование" относится к злокачественной опухоли, содержащей клетки, которые экспрессируют MUC16 на своей поверхности.

Термин "положительная по MUC16 клетка" относится к клетке, которая экспрессирует MUC16 на своей поверхности.

"Незащищенное антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологической молекулой (например, цитотоксическим агентом) или радиоактивной меткой. Незащищенное антитело может входить в состав фармацевтической композиции.

"Нативные антитела" относятся к молекулам природных иммуноглобулинов с различной структурой. Например, нативные антитела IgG являются гетеротетрамерными гликопротеинами массой приблизительно 150000 дальтон, состоящими из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых

цепей, которые связаны между собой дисульфидными мостиками. От N- к С-концу каждая тяжелая цепь имеет переменный участок (VH), также называемый переменным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Подобным образом, от N- к С-концу каждая легкая цепь имеет переменный участок (VL), также называемый переменным доменом легкой цепи, за которым следует константный легкий (CL) домен. Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности их константного домена.

Термин "вкладыш" используется в отношении инструкций, обычно вложенных в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях к применению, использовании, дозировке, способах применения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по сравнению с контрольной последовательностью полипептида определяют как процент аминокислотных остатков в представляющей интерес последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в контрольной последовательности полипептида, после совмещения последовательностей и внесения брешей, в случае необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не рассматривая любые консервативные замены как часть идентичности последовательности. Совмещение с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто разными путями, которые находятся в рамках знаний в данной области техники, например, используя общедоступные компьютерные программы, такие как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR) программы. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для совмещения последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального совмещения по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. В рамках настоящего документа, однако, значения % идентичности аминокислотной последовательности получают, используя компьютерную программу сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторские права на компьютерную программу сравнения последовательностей ALIGN-2 имеет Genentech, Inc., и текст программы был подан вместе с документацией по использованию в ведомство по охране авторского права США, Washington D.C., 20559, где он был зарегистрирован под регистрационным номером регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN-2 общедоступна в Genentech, Inc., South San Francisco, California или может быть скомпилирована из текста программы. Программа ALIGN-2 может быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей заданы в программе ALIGN-2 и не изменяются. В случаях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности последовательности аминокислот данной аминокислотной последовательности А по отношению, с или в зависимости от данной аминокислотной последовательности В (что альтернативно может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности последовательности аминокислот по отношению, с или в зависимости от данной аминокислотной последовательности В) вычисляют следующим образом:

$$100 \text{ умножить на } \frac{X}{Y},$$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, рассчитанное как идентичные пары программой совмещения последовательностей ALIGN-2 при совмещении А и В в данной программе, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что в случае, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности последовательности аминокислот А по отношению к В не будет равен % идентичности последовательности аминокислот В по отношению к А. Если специально не указано иное, все значения % идентичности последовательности аминокислот, используемые в настоящем документе, получают, как описано в предыдущем абзаце, используя компьютерную программу ALIGN-2.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой лекарственной форме, чтобы биологическая активность активного ингредиента, содержащегося в ней, была эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются недопустимо токсичными для индивида, которому назначают данную композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для индивида. Фармацевтически приемлемый носитель содержит, помимо прочего, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

"Лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "лечащий") в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественный ход болезни индивидуума, подлежащего лечению, и может быть выполнено либо в профилактических целях, либо во время течения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, помимо прочего, предотвращение проявления или повторного проявления заболевания, частичное снятие симптомов, уменьшение каких-либо прямых или не прямых патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания,

улучшение или временное облегчение состояния заболевания, и ремиссия или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению используются для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Термин "вариабельный участок" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) природного антитела, в основном, имеют схожие структуры, где каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельных участка (HVR). (см., например, Kindt et al. *Kubi Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Единичный домен VH или VL может оказаться достаточным для придания антиген-связывающей специфичности. Более того, антитела, которые связывают определенный антиген, могут быть выделены, используя домен VH или VL из антитела, который связывает антиген для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термин "вектор" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, к которой она присоединена. Термин содержит вектор в качестве самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Определенные вектора способны управлять экспрессией нуклеиновой кислоты, с которой они функционально связаны. Такие векторы именуются в настоящем документе "экспрессионными векторами".

## II. Композиции и способы

В одном из аспектов изобретение основано частично на антителах, которые связываются с мезотелином, и иммуноконъюгатах, содержащих такие антитела. Антитела и иммуноконъюгаты по изобретению пригодны, например, для диагностики или лечения положительных по мезотелину злокачественных опухолей.

### A. Типичные антитела против мезотелина

В одном из аспектов, изобретение представляет выделенные антитела, которые связывают мезотелин. Природный мезотелин появляется в результате расщепления белкового предшественника мезотелина в клетке, образуя мезотелин и мегакариоцитарный потенцирующий фактор (MPF), как показано на фиг. 1. Мезотелин содержит укорочение С-конца относительно белка-предшественника. Такое укорочение может обуславливать связывание якоря GPI. Мезотелин может оставаться связанным с клеточной поверхностью, например, через якорь GPI, или мезотелин может отсоединяться от клетки (например, якорь GPI может расщепляться до сих пор не идентифицированным ферментом) с образованием отщепившегося мезотелина в клеточной культуре или сыворотке крови животных.

Типичная последовательность белкового предшественника природного мезотелина человека представлена как SEQ ID NO:42, и соответствующая последовательность мезотелина представлена как SEQ ID NO:43 (соответствуя аминокислотам 296-580 SEQ ID NO:42). Альтернативная последовательность мезотелина соответствует аминокислотам 296-598 SEQ ID NO:42. SEQ ID NO:44 представляет собой природный вариант SEQ ID NO:42, результатом процессинга которого является мезотелин, имеющий последовательность SEQ ID NO:45. SEQ ID NO:45 содержит вставку из восьми аминокислотных остатков в позиции 116 аминокислоты относительно SEQ ID NO:43. Альтернативная форма мезотелина, представленная в SEQ ID NO:45, по-видимому, составляет ~5% транскриптов мезотелина в опухолевых клеточных линиях.

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело против мезотелина обладает по меньшей мере одним или несколькими приведенными ниже свойствами в любом сочетании:

- (a) связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий (i) E153 и D174 или (ii) E211;
- (b) проявляет или не проявляет измененное или уменьшенное связывание с различными гликозилированными формами мезотелина;
- (c) блокирует или не блокирует связывание мезотелина с MUC16;
- (d) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ, или альтернативно  $\leq 1$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,5$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,1$  нМ, и в некоторых случаях  $\geq 0,0001$  нМ. В любом из вышеприведенных вариантов осуществления изобретения антитело, которое не блокирует связывание мезотелина с MUC16, представляет собой антитело, которое усиливает связывание мезотелина с MUC16.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против мезотелина связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E153 и D174. В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело против мезотелина дополнительно обладает одним или несколькими нижеприведенными свойствами в любом сочетании:

- (a) не проявляет уменьшенное связывание с гликозилированными формами мезотелина;
- (b) не блокирует связывание мезотелина с MUC16;
- (c) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ, или альтернативно  $\leq 1$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,5$  нМ, и в некоторых случаях  $\geq 0,0001$  нМ.

В таких вариантах осуществления изобретения антитело, которое не блокирует связывание мезоте-

лина с MUC16, усиливает связывание мезотелина с MUC16 и/или антитело связывается с аффинностью  $\leq 1$  нМ. Характерное антитело, обладающее приведенными выше свойствами, является 7D9, и его гуманизированные варианты, такие как h7D9.v3, рассмотрены в настоящем документе. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения мезотелин, с которым связывается антитело против мезотелина, является мезотелином человека.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против мезотелина связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E211. В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело против мезотелина дополнительно обладает одним или несколькими приведенными ниже свойствами:

- (a) не блокирует связывание мезотелина с MUC16;
- (b) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ, или альтернативно  $\leq 1$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,5$  нМ, и в некоторых случаях  $\geq 0,0001$  нМ.

В таких вариантах осуществления изобретения антитело, которое не блокирует связывание мезотелина с MUC16, усиливает связывание мезотелина с MUC16, и/или антитело связывается с аффинностью  $\leq 1$  нМ. Характерным антителом, обладающим вышеуказанными свойствами, является 22A10, и его гуманизированные варианты, такие как 22A10.V8 3, рассмотрены в настоящем документе. В любом из вышеприведенных вариантов осуществления изобретения мезотелин, с которым связывается антитело против мезотелина, является мезотелином человека, мезотелином яванского макака и/или мезотелином крысы.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против мезотелина:

- (a) связывается с эпитопом в пределах аминокислот 1-131 SEQ ID NO:43; и
- (b) связывает мезотелин с аффинностью  $\leq 5$  нМ, или альтернативно  $\leq 1$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,5$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,1$  нМ, и в некоторых случаях  $\geq 0,0001$  нМ.

В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело блокирует связывание мезотелина с MUC16 и/или связывается с эпитопом в пределах аминокислот 1-64 или 1-70 SEQ ID NO:43. В одном из таких вариантов осуществления изобретения антитело вытесняет MUC16 из связи с мезотелином. Характерным антителом, обладающим вышеупомянутыми свойствами, является 19C3, рассмотренное в настоящем документе. В любом из вышеприведенных вариантов осуществления изобретения мезотелин, с которым связывается антитело против мезотелина, является мезотелином человека.

#### Способы

Чтобы определить, "связывается ли с эпитопом SEQ ID NO:43, содержащим E153 и D174" или "связывается ли с эпитопом SEQ ID NO:43, содержащим E211" антитело против мезотелина, эти остатки подвергаются мутированию в полипептиде, содержащем SEQ ID NO:43, и анализируют связывание антитела с мутированным полипептидом, экспрессирующимся в клетках 293, способом FACS, как описано в примере G, где значительное снижение ( $\geq 70\%$  снижение) или устранение связывания антитела с мутантным полипептидом указывает на то, что антитело связывается с эпитопом SEQ ID NO:43, содержащим E153 и D174, или содержащим E211.

Чтобы определить, действительно ли антитело против мезотелина "не проявляет ослабленного взаимодействия с гликозилированными формами мезотелина", меченый мезотелин человека экспрессируется в клетках CHO, его очищают (посредством метки) и дополнительно разделяют в соответствии с зарядом на колонке Mono S на фракции с высокой (фракция A11), средней (A12), низкой (B1) и практически отсутствующей (B5) степенью гликозилирования мезотелина, как описано в примере H. Каждую фракцию наносят на чип с предварительно связанным антителом против мезотелина и измеряют скорость ассоциации и скорость диссоциации для каждой фракции. Если значение аффинности для каждой фракции находится в пределах 25% друг от друга, это указывает на то, что антитело не проявляет ослабленного взаимодействия с гликозилированными формами мезотелина.

Чтобы определить, действительно ли антитело против мезотелина "блокирует связывание мезотелина с MUC16", "не блокирует связывание мезотелина с MUC16" или "усиливает связывание мезотелина с MUC16", выполняют анализ связывания MUC16 следующим образом. В частности, биотинилированный фрагмент MUC16 (содержащий три муциновых повтора) инкубируют с клетками A431, стабильно экспрессирующими мезотелин в присутствии или отсутствии антитела против мезотелина, и уровень связывания биотинилированного MUC16 с клетками определяют FACS с помощью стрептавидина-PE. Сайт связывания MUC16 в молекуле мезотелина был экспериментальным образом локализован в первых 64 аминокислотных остатках мезотелина (Kaneko et al., J. Biol Chem. 248:3739-49 (2009)). С другой стороны, клетки PC3, стабильно экспрессирующие MUC16, инкубируют в присутствии очищенного мезотелина-his8 ("his8" представлен в виде SEQ ID NO:49), предварительно инкубированного с антителами против мезотелина, и связывание очищенных комплексов мезотелин-his8:антитело с MUC16-экспрессирующими клетками определяют способом FACS, используя анти-His6 антитело, конъюгированное с Alexa-647 ("His6" представлен в виде SEQ ID NO:50). Если в любом из вышеуказанных способов, сигнал FACS на  $\geq 50\%$  ниже в присутствии антитела против мезотелина, нежели в его отсутствие, тогда считают, что антитело блокирует связывание мезотелина с MUC16. Если в любом из вышеуказанных способов, сигнал FACS не снижается  $\geq 50\%$  в присутствии антитела против мезотелина, тогда считают, что антитело не

блокирует связывание мезотелина с MUC16. Если в последнем из упомянутых выше способов анализа сигнал FACS увеличивается в присутствии антитела против мезотелина, нежели в его отсутствие, тогда считают, что антитело увеличивает связывание мезотелина с MUC16.

"Связывается ли антитело против мезотелина с аффинностью  $\leq 5$  нМ, или альтернативно  $\leq 1$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,5$  нМ, или альтернативно  $\leq 0,1$  нМ" определяют согласно анализу BIAcore, как описано в настоящем документе в разделе II.A.1. В частности, Kd измеряют, используя поверхностный плазмонный резонансный анализ, используя BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C применяя чипы с иммобилизованным антигеном CM5 при  $\sim 10$  единицах ответа (RU). Вкратце, карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (CM5, BIACORE, Inc.) активируются N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Антигеном, подлежащим исследованию, является мезотелин, синтезированный и выделенный из E.coli, как описано в примере В. Антиген разводят 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8 до концентрации 5 мкг/мл ( $\sim 0,2$  мкМ) до введения при скорости потока 5 мкл/мин для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена вводят 1М этаноламин для блокирования не участвующих в реакции групп. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) вводят в PBS с 0,05% полисорбат 20 (TWEEN-20™) сурфактантом (PBST) при 25°C при скорости потока, равном приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) вычисляют, используя простую взаимно-однозначную модель связывания Ленгмюра (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) путем одновременного выравнивания сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) вычисляют по отношению  $k_{off}/k_{on}$ . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации превышает  $10^6$  M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>, используя вышеуказанный способ поверхностного плазмонного резонансного анализа, тогда скорость ассоциации может быть определена путем использования методики гашения флуоресценции, которая измеряет увеличение или уменьшение интенсивности эмиссии флуоресценции (возбуждение = 295 нм; эмиссия = 340 нм, 16 нм полоса пропускания) при 25°C 20 нМ антитела (Fab форма) против антигена в PBS, pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена согласно измерениям спектрофотометра, такого как оборудованный остановкой потока спектрофотометр (Aviv Instruments) или рассчитанный на 8000 образцов SLM-AMINCO™ спектрофотометр (ThermoSpectronic) с вращающейся кюветой.

Антитело 7D9 и другие варианты осуществления изобретения

В одном из аспектов изобретение относится к антителу против мезотелина, содержащему по крайней мере один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранные из (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; (e) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и (f) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; и (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22. В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, и HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит (a) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; и (c) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две, или все три VL HVR последовательности, выбранные из (a) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; (b) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и (c) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит (a) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; (b) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и (c) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В другом аспекте антитело по изобретению содержит (a) VH домен, содержащий по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содер-

жащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и (iii) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:22; и (b) VL домен, содержащий по крайней мере одну, по крайней мере две, или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (ii) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (c) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему (a) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; (e) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и (f) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения антитело против мезотелина является гуманизированным. В одном из вариантов осуществления, антитело против мезотелина содержит HVR, как в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления, и дополнительно содержит акцепторный каркасный участок человека, например, каркасный участок иммуноглобулина человека или консенсусный каркасный участок человека. В определенных вариантах осуществления акцепторным каркасным участком человека является консенсусный каркасный участок VL каппа I человека ( $VL_{KI}$ ) и/или каркасный участок VH ( $VH_{ATA}$ ), который отличается от консенсусной последовательности подгруппы III VH человека ( $VH_{III}$ ) по 3 положениям: R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). В другом варианте осуществления изобретения антитело против мезотелина содержит HVR, как в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления и дополнительно содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность каркасного участка FR2 SEQ ID NO:25, и последовательность FR3 SEQ ID NO:27. В одном из таких вариантов осуществления изобретения каркасным участком вариабельного домена легкой цепи является модифицированный консенсусный каркасный участок ( $VL_{KI}$ ) VL каппа I, имеющий FR2 последовательность SEQ ID NO:25 и FR3 последовательность SEQ ID NO:27.

В другом аспекте антитело против мезотелина содержит последовательность вариабельного домена (VH) тяжелой цепи, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VH, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в SEQ ID NO:8. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е. в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VH последовательности SEQ ID NO:8, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранные из: (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), который по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VL, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е., в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VL последовательности SEQ ID NO:4, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобретения VL содержит один, два или три HVR, выбранные из: (a) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, (b) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и (c) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит VH, как в любом из вышеописанных вариантов осуществления изобретения и VL, как в любом из вышеописанных вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:4 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, что и антитело против мезотелина по настоящему изобретению. Например, в определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, что и антитело против мезотелина, содержащее последовательность VH SEQ ID NO:8 и последовательность VL SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43 из участка аминокислот 152-175, внутри него или его охватывая. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E153 и D174. В определенных таких вариантах осуществления изобретения антитело связывает аминокислотные остатки E153 и D174.

В дополнительном аспекте изобретения антитело против мезотелина по любому из вышеописанных вариантов осуществления изобретения является моноклональным антителом, включая химерное, гуманизированное антитело или антитело человека. В одном из вариантов осуществления изобретения антителом против мезотелина является фрагмент антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения антитело является практически полноразмерным антителом, например, антителом IgG1 или другим классом или изотипом антител, как определено в настоящем документе.

В дополнительном аспекте антитело против мезотелина по любому из вышеописанных вариантов осуществления изобретения может обладать любым характерным свойством, в отдельности или в сочетании, как описано в разделах 1-7 ниже.

Антитело 22A10 и другие варианты осуществления изобретения

В одном из аспектов изобретение относится к антителу против мезотелина, содержащему по крайней мере один, два, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39; (d) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (e) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (f) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39. В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39, и HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39, HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, и HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит (a) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и (c) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (a) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (b) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (c) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит (a) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (b) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (c) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

В другом аспекте антитело по изобретению содержит (a) домен VH, содержащий по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VH HVR, выбранные из (i) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (iii) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39; и (b) домен VL, содержащий по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VL HVR, выбранные из (i) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, (ii) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (c) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему (a) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; (c) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39; (d) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (e) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (f) HVR-L3, содержащий аминокис-

лотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:35.

В любом из вышеописанных вариантов осуществления изобретения антитело против мезотелина является гуманизированным. В одном из вариантов осуществления, антитело против мезотелина содержит HVR, как в любом из вышеописанных вариантов осуществления, и дополнительно содержит акцепторный каркасный участок человека, например, каркасный участок иммуноглобулина человека или консенсусный каркасный участок человека. В определенных вариантах осуществления изобретения акцепторным каркасным участком человека является акцепторный каркасный участок VL<sub>K1</sub> и/или VH<sub>III</sub>.

В другом аспекте, антитело против мезотелина содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VH, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в SEQ ID NO:16. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е. в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VH последовательность SEQ ID NO:16, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранные из: (a) HVR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и (c) HVR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 или 39.

В другом аспекте относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит варибельный домен легкой цепи (VL), который по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VL, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в SEQ ID NO:12. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е. в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VL последовательность SEQ ID NO:12, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобретения VL содержит один, два или три HVR, выбранные из: (a) HVR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; (b) HVR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и (c) HVR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит VH, как в любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения и VL, как в любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит VH и VL последовательности в SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:12 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, как антитело против мезотелина по настоящему изобретению. Например, в определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, как антитело против мезотелина, содержащее VH последовательность SEQ ID NO:16 и VL последовательность SEQ ID NO:12. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43 из участка аминокислот 211-327, внутри него или его охватывая. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E211. В определенных таких вариантах осуществления изобретения антитело связывает аминокислотный остаток E211.

В дополнительном аспекте изобретения антитело против мезотелина по любому из вышеописанных вариантов осуществления изобретения является моноклональным антителом, включая химерное, гуманизированное антитело или антитело человека. В одном из вариантов осуществления изобретения антителом против мезотелина является фрагмент антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения антитело является практически полноразмерным антителом, например, антителом IgG2a или другим классом или изотипом антител, как определено в настоящем документе.

В дополнительном аспекте антитело против мезотелина по любому из вышеописанных вариантов осуществления изобретения может обладать любым характерным свойством, в отдельности или в сочетании, как описано в разделах 1-7 ниже.

Антитело 19C3 и другие варианты осуществления изобретения



В одном из аспектов изобретение относится к антителу против мезотелина, содержащее по крайней мере один, два, три, четыре, пять или шесть HVR антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В контексте данного раздела HVR обведены контуром в виде набора аминокислот, соответствующих CDR, как определено в настоящем документе.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VH HVR антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H3, HVR-L3 и HVR-H2 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности VL HVR антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В другом аспекте антитело по изобретению содержит (a) VH домен, содержащий по крайней мере одну, по крайней мере две или все три VH HVR последовательности антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464; и (b) VL домен, содержащий по крайней мере одну, как минимум две или все три VL HVR последовательности антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, содержащему HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения антитела против мезотелина являются гуманизированными. В одном из таких вариантов осуществления, антитело является гуманизированной формой антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело против мезотелина содержит HVR, как в любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения и дополнительно содержит акцепторный каркасный участок человека, например, каркасный участок иммуноглобулина человека или консенсусный каркасный участок человека.

В другом аспекте антитело против мезотелина содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющей по крайней мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность VH антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VH содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в VH антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е., в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VH последовательность антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранные из HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), который по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность VL, которая по крайней мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно контрольной последовательности, но антитело против мезотелина, содержащее такую последовательность, сохраняет способность связывать мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения всего от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или делетированы в VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464. В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции осуществляют в участках вне HVR (т.е., в FR). В некоторых случаях, антитело против мезотелина содержит VL последовательность антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В частном варианте осуществления изобре-

тения VL содержит один, два или три HVR, выбранные из HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина, где антитело содержит VH, как в любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения и VL, как в любом из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит последовательности VH и VL антитела, продуцируемого гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464 соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, как антитело против мезотелина по настоящему изобретению. Например, в определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу, которое связывает тот же самый эпитоп, как антитело, продуцируемое гибридомой 19C3 с идентификационным номером ATCC PTA-11464.

В дополнительном аспекте изобретения антитело против мезотелина по любому из рассмотренных выше вариантов осуществления изобретения является моноклональным антителом, включая химерное, гуманизированное антитело или антитело человека. В одном из вариантов осуществления изобретения антителом против мезотелина является фрагмент антитела, например, Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения антитело является практически полно-размерным антителом, например, антителом IgG2b или другим классом или изотипом антител, как определено в настоящем документе.

В дополнительном аспекте, антитело против мезотелина по любому из вышеописанных вариантов осуществления изобретения может обладать любым характерным свойством, в отдельности или в сочетании, как описано в разделах 1-7 ниже:

#### 1. Аффинность антитела

В определенных вариантах осуществления изобретения константа диссоциации (Kd) антитела по настоящему изобретению равна (Kd)  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  или  $\leq 0,001 \text{ nM}$ , и в некоторых случаях  $\geq 10^{-13} \text{ M}$  (например,  $10^{-8} \text{ M}$  или менее, например, от  $10^{-8} \text{ M}$  до  $10^{-13} \text{ M}$ , например, от  $10^{-9} \text{ M}$  до  $10^{-13} \text{ M}$ ).

В одном из вариантов осуществления изобретения Kd измеряют способом анализа связывания радиоактивно меченого антигена (RIA), выполняемым с использованием Fab фрагмента представляющего интерес антитела и его антигена, как описано представленным ниже способом. Аффинность связывания Fabs для антигена в растворе измеряют уравниванием Fab минимальной концентрацией (<sup>125</sup>I)-меченого антигена в присутствии серий разведений немеченого антигена, затем выявляя связанный антиген с помощью покрытой антителами к Fab плашки (см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)). Для определения условий проведения анализа, многоруночные плашки MICROTITER® (Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл антителами к Fab (Cappel Labs) по выявлению связанного антигена в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют 2% (вес/объем) бычьим сывороточным альбумином в PBS в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В плашках без адсорбента (Nunc #269620) 100 или 26 пкМ [<sup>125</sup>I]-антиген смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в случае оценки антител к VEGF, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Представляющий интерес Fab затем инкубируют в течение ночи; однако, инкубация может продолжаться более длительный период (например, приблизительно 65 ч) для обеспечения достижения равновесного состояния. Затем смеси переносят в фиксирующую плашку для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Раствор затем удаляют и плашку промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20®) в PBS. Как только плашки высыхают, добавляют 150 мкл/лунка сцинтиллятора (MICROSCINT-20™; Packard), и плашки обсчитывают в счетчике гамма-излучения TOPCOUNT™ (Packard) в течение 10 мин. Концентрации каждого Fab, которые демонстрируют 20% или меньшую величину от максимального связывания, выбирают для использования в конкурентном анализе связывания.

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения Kd измеряют путем использования поверхностного плазмонного резонансного анализа, используя BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, применяя чипы с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единицах ответа (RU). Вкратце, карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (CM5, BIAcore, Inc.) активируются N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Антиген разводят 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до концентрации 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) до введения при скорости потока 5 мкл/мин для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена вводят 1М этаноламин для блокирования не участвующих в реакции групп. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) вводят в PBS с 0,05% полисорбат 20 (TWEEN-20™) сурфактантом (PBST) при 25°C при скорости потока, равном приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k<sub>on</sub>) и скорости диссоциации (k<sub>off</sub>) вычисляют, используя простую взаимно-однозначную модель связывания Ленгмюра (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) путем

одновременного выравнивания сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации ( $K_d$ ) вычисляют по отношению  $k_{off}/k_{on}$ . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации превышает  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , используя вышеуказанный способ поверхностного плазмонного резонансного анализа, тогда скорость ассоциации может быть определена путем использования методики гашения флуоресценции, которая измеряет увеличение или уменьшение интенсивности эмиссии флуоресценции (возбуждение = 295 нм; эмиссия = 340 нм, 16 нм полоса пропускания) при 25°C 20 нМ антитела (Fab форма) против антигена в PBS, pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена согласно измерениям спектрофотометра, такого как оборудованный остановкой потока спектрофотометр (Aviv Instruments) или рассчитанный на 8000 образцов SLM-AMINCO™ спектрофотометр (ThermoSpectronic) с вращающейся кюветой.

## 2. Фрагменты антитела

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению является фрагментом антитела. Фрагменты антитела включают, помимо прочего, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и scFv фрагменты, и другие фрагменты, рассмотренные ниже. Для обзора определенных фрагментов антитела см. Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для обзора фрагментов scFv см., например, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO 93/16185; и патенты США № 5571894 и 5587458. Для обсуждения фрагментов Fab и F(ab')<sub>2</sub>, содержащих остатки связывания эпитопа рецептора реутилизации и имеющих повышенное время жизни in vivo, см. патент США № 5869046.

Диатела являются фрагментами антитела с двумя антиген-связывающими сайтами, которые могут быть бивалентными или биспецифическими. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменные антитела являются фрагментами антитела, содержащими весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В определенных вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело является однодоменным антителом человека (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антитела могут быть получены различными способами, включая, помимо прочего, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами (например, E. coli или фагами), как описано в настоящем документе.

## 3. Химерные и гуманизированные антитела

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению является химерным антителом. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США 4816567 и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В одном примере, химерное антитело содержит отличный от переменного участка человека (например, переменный участок, полученный из мыши, крысы, хомяка, кролика или отличного от человека примата, такого как обезьяна) и константный участок человека. В дополнительном примере, химерное антитело является антителом с "переключенным синтезом класса", в котором класс или подкласс был изменен при сравнении с исходным антителом. Химерные антитела включают их антиген-связывающие фрагменты.

В определенных вариантах осуществления изобретения химерное антитело является гуманизированным антителом. Как правило, отличное от человека антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для человека, при этом сохраняя специфичность и аффинность исходного отличного от антитела человека. В основном, гуманизированное антитело содержит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) получены из отличного от антитела человека, и FR (или их части) получены из последовательностей антитела человека. Гуманизированное антитело, в некоторых случаях, также содержит по крайней мере часть константного участка человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками из отличного от антитела человека (например, антитело, из которого получены остатки HVR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); патенте США № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (описывающий пересадку SDR (aCDR); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (описывающий "восстановление поверхности"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (описывающий "перестановку FR"); и Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) и Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (описывающий способ "направленной селекции" в отношении перестановки FR).

Каркасные области человека, которые могут быть использованы для гуманизации, включают, помимо прочего: каркасные области, выбранные, используя способ "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности антител человека определенной подгруппы переменных участков легкой или тяжелой

цепи (см., например, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); и Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); зрелые (соматически мутированные) каркасные участки человека или каркасные участки зародышевой линии человека (см., например, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); и каркасные участки, полученные из библиотек скрининга FR (см., например, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

#### 4. Антитела человека

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению является антителом человека. Антитела человека могут быть получены, используя различные методики, известные в данной области техники. Антитела человека описаны в общих чертах в статьях van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) и Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Антитела человека могут быть получены введением иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано с целью продуцирования интактных антител человека или интактных антител с переменными участками человека в ответ на антигенный стимул. Такие животные обычно содержат все иммуноглобулиновые локусы человека или их часть, которые замещают эндогенные иммуноглобулиновые локусы, или которые находятся вне хромосомы или случайным образом интегрированы в хромосомы животных. В таких трансгенных мышах эндогенные иммуноглобулиновые локусы, в основном, инактивированы. Для обзора способов получения антител человека из трансгенных животных см. Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). См. также, например, патенты США № 6075181 и 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент США № 5770429, описывающий технологию HuMab®; патент США № 7041870, описывающий технологию K-M MOUSE®, и публикацию патентной заявки США № US 2007/0061900, описывающую технологию VelociMouse®). Переменные участки человека из интактных антител, продуцируемые такими животными, могут быть дополнительно модифицированы, например, путем сочетания с другим константным участком человека.

Антитела человека могут быть также получены основанными на гибридной технологии способами. Были описаны миеломные и мышино-человеческие гетеромиеломные клеточные линии человека для продуцирования моноклональных антител человека. (см., например, Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991).) Человеческие антитела, полученные с помощью технологии использования В-клеточной гибридомы человека, также описаны в Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают таковые, описанные, например, в патенте США № 7189826 (описывающем продуцирование моноклональных антител IgM человека гибридными клеточными линиями) и в статье Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (описывающей гибридомы человек-человек). Технология применения гибридомы человека (технология Trioma) также описана в статье Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Антитела человека могут быть также получены путем выделения последовательностей переменного домена клона Fc, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности переменного домена могут затем быть комбинированы с требуемым константным доменом человека. Технологии отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

#### 5. Антитела, полученные из библиотек

Антитела по изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек для антител с требуемой активностью или активностями. Например, целый ряд способов известны в данной области техники для получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек по выявлению антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в Hoogenboom et al. Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно конкретизированы, например, в McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004).

В определенных способах фагового дисплея, репертуары генов VH и VL по отдельности клонируют способом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках с последующим их скринингом по выявлению антиген-связывающего фага, как описано в статье Winter et., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994). В фаге, как правило, представлены фрагменты антитела либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), либо в виде фрагментов Fab. Библиотеки из иммунизированных источников представляют высокоаффинные антитела в отношении иммуногена без необходимости создания гибридом. Альтернативно, может быть клонирован интактный репертуар (например, из человека) для обеспечения единым источником антител к широкому набору отличных от собственных и также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths et al., EMBO J., 12:725-734 (1993). И наконец, интактные библиотеки могут быть также получены искусственно

путем клонирования не перегруппированных V-генных сегментов из стволовых клеток и использования ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоко вариабельных участков CDR3 и выполнения перегруппировок *in vitro*, как описано в статье Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Патентные публикации, рассматривающие фаговые библиотеки антител человека, включают, например: патент США № 5750373 и патентные публикации США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, считаются в настоящем документе антителами человека или фрагментами антител человека.

#### 6. Мультиспецифические антитела

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению является мультиспецифическим антителом, например, биспецифическим антителом.

Мультиспецифические антитела являются моноклональными антителами, которые имеют специфичности связывания по крайней мере для двух различных сайтов. В определенных вариантах осуществления изобретения одна из специфичностей связывания предназначена для мезотелина и другая - для любого другого антигена. В определенных вариантах осуществления изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами мезотелина. Биспецифические антитела могут также быть использованы для локализации цитотоксических агентов на клетках, которые экспрессируют мезотелин. Биспецифические антитела могут быть приготовлены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики создания мультиспецифических антител включают, помимо прочего, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см. Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829 и Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991) и технику "выступ-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифические антитела могут быть также получены путем создания электростатических эффектов регулирования для получения Fc-гетеродимерных молекул антитела (WO 2009/089004A1); перекрестного связывания двух или более антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); использования лейциновых молний для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)); использования технологии "диатела" для создания фрагментов биспецифического антитела (см., например, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); и использования димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см., например, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); и приготовления триспецифических антител, как описано, например, в Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными сайтами связывания антигена, включая "антитела, напоминающие осьминога", также включены в настоящий документ (см., например, US 2006/0025576A1).

Антитело или фрагмент в настоящем документе также содержит "FAB двойного действия" или "DAF", содержащий сайт связывания антигена, который связывается с мезотелином, а также с другим, отличным от него антигеном (см., US 2008/0069820, например).

#### 7. Варианты антител

В определенных вариантах осуществления изобретения рассматриваются варианты аминокислотной последовательности антител, представленных в настоящем документе. Например, желателен улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков внутри аминокислотных последовательностей антитела. Любая комбинация делеции, вставки или замены может быть осуществлена для получения окончательного конструкта при условии, что окончательный конструкт обладает требуемыми характеристиками, например, антиген-связывающими.

##### а) Варианты замены, вставки и делеции

В определенных вариантах осуществления изобретения представлены варианты антител, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Представляющие интерес сайты для замещающего мутагеза включают HVR и FR. Консервативные замены представлены в таблице под заголовком "предпочтительные замены". Более существенные изменения представлены в таблице под заголовком "типичные замены" и, как дополнительно описано ниже, по отношению к классам боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть внесены в антитело, представляющее интерес, и продукты подвергают скринингу на предмет требуемой активности, например, сохраненного/улучшенного связывания антигена, сниженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

Исходный остаток	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Аминокислоты могут быть объединены в группы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены могут повлечь за собой смену членства в одном классе на таковое в другом классе.

Один тип заместительного варианта содержит замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или антитела человека). Как правило, получаемый(ые) в итоге вариант(ы), выбранный(ые) для дальнейшего исследования, имеют модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, сниженную иммуногенность) относительно исходного антитела и/или практически сохраняют определенные биологические свойства исходного антитела. Типичным заместительным вариантом является антитело с созревшей аффинностью, которое может быть успешно получено, например, используя основанный на фаговом дисплее способ созревания аффинности, как таковой, описанный в настоящем документе. Вкратце, вносят мутации в один или несколько остатков HVR и варианты антитела клонируют в фаговом векторе и отбирают по определенной биологической активности (например, аффинности связывания).

Изменения (например, замены) могут быть внесены в HVR, например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения могут быть внесены в "горячие точки" HVR, т.е. остатки, кодируемые кодонами, которые подвергаются мутированию с высокой частотой во время соматического процесса созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или SDR (a-CDR), в результате чего получают вариантную VH или VL, подвергаемую тестированию на предмет аффинности связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек уже было описано, например, в Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности привносят разнообразие в вариабельные гены, выбранные для созревания, любыми различными способами (например, ПЦР с внесением ошибок, перестановка цепей или олигонуклеотид-направленный мутагенез). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации

какого-либо варианта антитела с требуемой аффинностью. Другой способ внесения вариативности содержит HVR-направленные подходы, в которых несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за один раз) располагают в случайном порядке. Остатки HVR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. В частности, обычно мишенями являются CDR-H3 и CDR-L3.

В определенных вариантах осуществления изобретения замены, вставки или делеции могут иметь место в одном или нескольких HVR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (например, консервативные замены, предусмотренные в настоящем документе), которые существенно не снижают аффинность связывания, могут быть сделаны в HVR. Такие изменения могут быть вне "горячих точек" HVR или SDR. В определенных вариантах осуществления вариантных последовательностей VH и VL, рассмотренных выше, каждый HVR либо неизменен, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Пригодным способом идентификации остатков или участков антитела, являющиеся мишенью мутагенеза, является "аланин-сканирующий мутагенез", как описано Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группа целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), чтобы определить изменилось ли взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть внесены в местах расположения аминокислот, демонстрируя функциональную чувствительность к первоначальным заменам. Альтернативно, или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело используется для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактирующие остатки и близлежащие остатки могут выступать в качестве мишени или быть удалены как кандидаты для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу с целью определения возможного наличия у них требуемых свойств.

Вставки аминокислотной последовательности включают amino- и/или карбоксиконцевые сцепления, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также вставки внутри последовательности, состоящие из одного или множественных аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метиониловым остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают сцепление N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время жизни антитела в сыровотке.

#### б) Гликозилированные варианты

В определенных вариантах осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению, изменено для увеличения или уменьшения степени гликозилирования данного антитела. Внесение или делеция сайтов гликозилирования в рамках антитела могут быть успешно выполнены путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что один или более сайтов гликозилирования создается или удаляется.

В случае, когда антитело содержит участок Fc, углевод, к нему присоединенный, может быть изменен. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно включают разветвленный, 2-антенарный олигосахарид, который, как правило, присоединен посредством N-связи с Asn297 домена CH2 участка Fc. См., например, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" 2-антенарной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида антитела по изобретению могут быть созданы с целью создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

В одном из вариантов осуществления изобретения представлены варианты антитела, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (напрямую или опосредованно) к участку Fc. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют вычислением среднего количества фукозы в сахаридной цепи в положении Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, прикрепленных к Asn297 (например, комплексных, гибридных и высокоманнозных структур) согласно измерениям способом масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано в WO 2008/077546, например, Asn297 относится к аспарагиновому остатку, расположенному приблизительно в позиции 297 участка Fc (нумерация EU остатков участка Fc); однако Asn297 может быть также расположен приблизительно  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже позиции 297, т.е. между позициями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательности антитела. Такие фукозилированные варианты могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикацию патента США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, имеющих отношение к "дефукозилированным" или "лишенных фукозы" вариантам антитела, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/01098 65; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586;

WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают Lec13 CHO клетки, лишенные фукозилирования белков (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L., и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в частности в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO 2003/085107).

Дополнительно представлены варианты антител с разрезанными пополам олигосахаридами, например, в которых 2-антенарный олигосахарид, присоединенный к участку Fc антитела, разрезан пополам на GlcNAc. Такие варианты антитела могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Варианты антител по крайней мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к участку Fc, также рассмотрены. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### с) Варианты участка Fc

В определенных вариантах осуществления изобретения одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть внесены в участок Fc антитела, рассмотренного в настоящем документе, тем самым образуя вариант участка Fc. Вариант участка Fc может включать последовательность участка Fc человека (например, участок Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одной или нескольких аминокислотных позициях.

В определенных вариантах осуществления изобретения рассматривает вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его целевым кандидатом для применения, где время жизни антитела *in vivo* важно, несмотря на то, что определенные эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не являются необходимыми или оказывают вредное воздействие. Анализы цитотоксичности *in vitro* и *in vivo* могут быть выполнены для подтверждения уменьшения/падения активностей CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания Fc рецептора (FcR) могут быть выполнены, чтобы убедиться в том, что у антитела отсутствует связывающая FcγR активность (тем самым, по-видимому, отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность связывания FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, клетки NK, экспрессируют только FcRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcRI, FcRII и FcRIII. Данные по экспрессии FcR в гематопоетических клетках сведены в табл. 3 на странице 464 статьи Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограниченные примеры анализов *in vitro* по оценке активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно могут быть применены нерадиоактивные способы анализа (см., например, ACTI™ нерадиоактивный анализ цитотоксичности для проточной цитометрии (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; и CytoTox 96® нерадиоактивный анализ цитотоксичности (Promega, Madison, WI). Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки натуральных киллеров (NK). Альтернативно, или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, такой как описано в Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Анализы связывания C1q могут быть также выполнены для подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно, у него отсутствует активность CDC. См., например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. и M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение клиренса/времени жизни *in vivo* могут быть также выполнены, используя способы, известные в данной области техники (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают таковые с заменой одного или нескольких остатков участка Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутантов Fc с заменами в двух или более аминокислотных позициях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны определенные варианты антитела с улучшенной или пониженной активностью связывания Fc (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312, и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)).

В определенных вариантах осуществления изобретения вариант антитела содержит участок Fc с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, замены в



позициях 298, 333 и/или 334 участка Fc (нумерация EU остатков).

В некоторых вариантах осуществления изобретения изменения внесены в участок Fc, что приводит к измененному (т.е. либо улучшенному, либо пониженному) связыванию C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитела с повышенными временами жизни и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела включают участок Fc с одной или несколькими заменами в нем, что улучшает связывание участка Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают таковые с заменами в одном или нескольких остатках участка Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена остатка 434 участка Fc (патент США № 7371826).

См. также Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов участка Fc.

#### d) Цистеиновые сконструированные варианты антитела

В определенных вариантах осуществления требуется создать цистеиновые сконструированные антитела, например, "thioMAbs", в которых один или несколько остатков антитела заменены остатками цистеина. В частных вариантах осуществления изобретения замещенные остатки находятся в доступных участках антитела. Путем замены этих остатков цистеином реактивные тиоловые группы, тем самым, расположены в доступных участках антитела и могут быть использованы для конъюгирования антитела с другими молекулами, такими как молекулы лекарственных препаратов или связанными с линкером молекулами лекарственных препаратов, для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления изобретения любой или несколько из нижеприведенных остатков могут быть заменены на цистеин: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) участка Fc тяжелой цепи. Цистеиновые сконструированные антитела могут быть созданы, как описано, например, в патенте США № 7521541.

#### e) Производные антител

В определенных вариантах осуществления изобретения представленное в настоящем документе антитело может быть дополнительно модифицировано с целью содержания небелковоподобных молекул, известных в данной области техники и общедоступных. Молекулы, пригодные для получения производных антитела, включают, помимо прочего, водорастворимые полимеры. Неограниченные примеры водорастворимых полимеров включают, помимо прочего, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры), и декстран или поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксипропилированные полиолы (например, глицерол), поливиниловый спирт и смеси вышеперечисленного. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества в производстве вследствие его стабильности в воде. Полимер может быть любого молекулярного веса и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, прикрепленных к антителу, может варьировать, и если более одного полимера присоединено, они могут быть одинаковыми или различными молекулами. В основном, число и/или тип полимеров, используемых для получения производных, могут быть определены, руководствуясь факторами, включая, помимо прочего, определенные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т.п.

В другом варианте осуществления изобретения рассмотрены конъюгаты антитела и небелковоподобные молекулы, которые могут быть селективно нагреты под действием радиационного облучения. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковоподобной молекулой является углеродная нанотрубка (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)).

Радиоактивное излучение может быть любой длины волны и содержит, помимо прочего, длины волн, которые не повреждают нормальные клетки, но которые нагревают небелковоподобные молекулы до температуры, при которой погибают клетки, близкорасположенные к комплексу антитело-небелковоподобная молекула.

#### В. Рекомбинантные способы и композиции

Антитела могут быть продуцированы, используя рекомбинантные способы и композиции, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном из вариантов осуществления изобретения представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против мезотелина, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепь антитела). В дополнительном варианте осуществления изобретения представлена одна или несколько векторов (например, экспрессионные векторы), содержащие такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления изобретения представлена клетка-хозяин, содержа-

щая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, Sp20 клеткой). В одном из вариантов осуществления изобретения представлен способ создания антитела против мезотелина, где способ содержит культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как рассмотрено выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и в некоторых случаях выделение антитела из клетки-хозяина (или из среды культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного продуцирования антитела против мезотелина нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть без особого труда выделены и секвенированы, используя общепринятые методики (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепь антитела).

Пригодные клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные выше. Например, антитела могут быть продуцированы в бактериях, в частности, когда нет необходимости в гликозилировании и эффекторных функциях Fc. Для экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описывающие экспрессию фрагментов антитела в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из бактериальной клеточной суспензии в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Помимо прокариот эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются пригодными хозяевами с точки зрения клонирования или экспрессии для кодирующих антитело векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, у которых пути гликозилирования были "гуманизированы", обуславливая продуцирование антитела с частично или полностью паттерном гликозилирования человека. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Пригодные клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут быть использованы совместно с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток растений могут также быть использованы в качестве хозяев. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для продуцирования антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных могут быть также использованы в качестве хозяев. Например, клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии, могут быть пригодными. Другими примерами пригодных клеточных линий-хозяев млекопитающих являются трансформированная SV40 линия CV1 почек обезьяны (COS-7); линия эмбриональных почек человека (293 или 293 клетки, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек хомячков (BHK); мышинные клетки Сертоли (TM4 клетки, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой марышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собаки (MDCK); клетки печени серой крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (HepG2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие пригодные клеточные линии-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR<sup>-</sup> CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и клеточная линия шелкомоты, такая как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзорного рассмотрения определенных клеточных линий-хозяев млекопитающих, пригодных для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

#### С. Способы

Антитела против мезотелина, представленные в настоящем документе, могут быть идентифицированы, отобраны или охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или биологическим активностям с помощью различных способов, известных в данной области техники.

В одном из аспектов антитело по изобретению тестируют на предмет его активности связывания антигена, например, известными способами, такими как ELISA, FACS или Вестерн-блот.

В другом аспекте конкурентный анализ может быть использован для идентификации антитела, которое конкурирует с любым из антител, описанным в настоящем документе, за связывание с мезотелином. В определенных вариантах осуществления изобретения такое конкурирующее антитело связывается с тем же самым эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается антитело, описанное в настоящем документе. Подробные иллюстративные способы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в статье Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols" *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В типичном конкурентном анализе иммобилизованный мезотелин инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с мезотелином (например, любое из антител, описанных в настоящем документе), и второе немеченое антитело, которое подлежит тестированию на предмет его способности конкурировать с первым антителом за связывание с мезотелином. Второе антитело может находиться в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный мезотелин инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с мезотелином, избыток несвязанного антитела удаляют, и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным мезотелином. Если количество метки, связанной с иммобилизованным мезотелином, существенно снижено в тестируемом образце относительно контрольного образца, тогда это означает, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с мезотелином. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

#### D. Иммуноконъюгаты

Изобретение также представляет иммуноконъюгаты, содержащие антитело против мезотелина конъюгированное в соответствии с настоящим документом с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические средства или лекарственные препараты, ингибиторы роста, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитела-лекарственного препарата (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными препаратами, включая, помимо прочего, майтанзиноид (см. патенты США № 5208020, 5416064 и Европейский патент EP 0425235 B1); ауристин, такой как DE и DF группы лекарственного препарата монотилауристатина (MMAE и MMAF) (см. патенты США № 5635483 и 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производное (см. патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); и патент U.S. № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен; и CC1065.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат включал антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, помимо прочего, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки лаконоса американского (РАРI, РАРII и РАР-S), ингибитор момордики харантской, курцин, кротин, ингибитор Мыльнянки лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоактивного конъюгата. Целый ряд радиоактивных изотопов общедоступен для синтеза радиоактивных конъюгатов. Примеры включают  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоактивный конъюгат используется для детекции, он может включать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например,  $^{99m}Tc$  или  $^{112}In$ , или спиновую метку для ядерной магнитно-резонансной томографии (NMR) (также известной как магнитно-резонансная томография,  $^{1}H$ ), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть созданы, используя бифункциональные белок-сшивающие агенты, такие как N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидозфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-соединения активного фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получать, как описано в

Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом является меченая по углероду-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA). См. WO 94/11026. Линкером может быть "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного препарата в клетку. Например, кислотный лабильный линкер, пептидаза-чувствительный линкер, фотолабильный линкер, диметильный линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020) могут быть использованы.

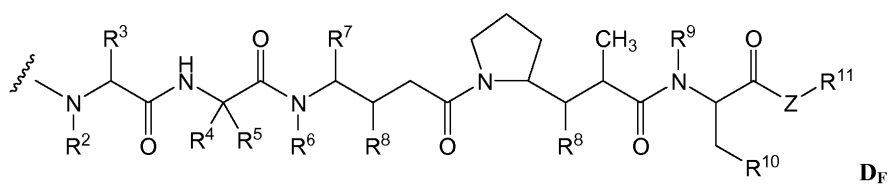
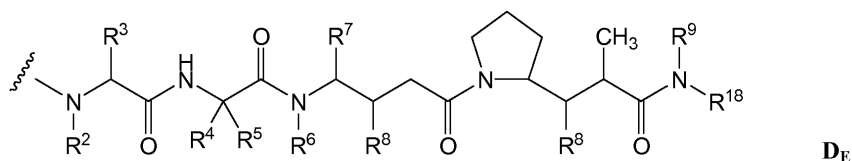
Иммуноконъюгаты или ADC в настоящем документе специально рассмотрены, не ограничиваясь такими конъюгатами, приготовленными с помощью перекрестно-сшивающих реагентов, включая, помимо прочего, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, в Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Иммуноконъюгаты, содержащие ауристатин и доластатин

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело по изобретению, конъюгированное с доластатином или пептидным аналогом или производным доластатина, например, ауристатином (патенты США № 5635483; 5780588). Показано, что доластатин и ауристатин препятствуют динамической активности микротрубочек, гидролизу ГТФ и делению ядра и клетки (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противоопухолевой (патент США № 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекула лекарственного средства доластатина или ауристатина может быть присоединена к антителу через N(амино)конец или C(карбоксильный)конец пептидной группы лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают присоединенные по N-концу группы DE и DF лекарственного препарата монометилауристатина (см. патенты США № 7659241, 7498298 и 7745394).

Пептидная группа лекарственного препарата может быть выбрана из нижеприведенных формул D<sub>E</sub> и D<sub>F</sub>



где волнистая линия D<sub>E</sub> и D<sub>F</sub> указывает на участок ковалентного присоединения к антителу или антителу-линкерному компоненту, и независимо, в каждом положении

R<sup>2</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила;

R<sup>3</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкиларила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла);

R<sup>4</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкиларила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла);

R<sup>5</sup> выбран из H и метила;

или R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> совместно образуют карбоциклическую кольцевую систему и имеют формулу -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила и C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла, и n выбран из 2, 3, 4, 5 и 6;

R<sup>6</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила;

R<sup>7</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла, арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкиларила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла);

каждый R<sup>8</sup> независимо выбран из H, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-карбоцикла и O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила);

R<sup>9</sup> выбран из H и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила;

R<sup>10</sup> выбран из арила или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла;

Z представляет собой O, S, NH, или NR<sup>12</sup>, где R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил;

R<sup>11</sup> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкила, арила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-гетероцикла, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> или -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;

m представляет собой целое число в диапазоне 1-1000;

$R^{13}$  представляет собой  $C_2$ - $C_8$ -алкил;

$R^{14}$  представляет собой H или  $C_1$ - $C_8$ -алкил;

каждое появление  $R^{15}$  независимо представляет собой H,  $COOH$ ,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$  или  $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ -алкил;

каждое появление  $R^{16}$  независимо представляет собой H,  $C_1$ - $C_8$ -алкил или  $-(CH_2)_n-COOH$ ;

$R^{18}$  выбран из  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арила,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -гетероцикла) и  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -карбоцикла); и

$n$  представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 6.

В одном из вариантов осуществления изобретения  $R^3$ ,  $R^4$  и  $R^7$  независимо представляют собой изопропил или втор-бутил, и  $R^5$  представляет собой H или метил. В иллюстративном варианте осуществления изобретения каждый из  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой изопропил,  $R^5$  представляет собой -H, и  $R^7$  представляет собой втор-бутил.

В еще другом варианте осуществления изобретения каждый из  $R^2$  и  $R^6$  представляет собой метил, и  $R^9$  представляет собой -H.

В другом варианте осуществления изобретения каждое появление  $R^8$  представляет собой  $-OCH_3$ .

В иллюстративном варианте осуществления изобретения каждый из  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой изопропил, каждый из  $R^2$  и  $R^6$  представляет собой метил,  $R^5$  представляет собой -H,  $R^7$  представляет собой втор-бутил, каждое появление  $R^8$  представляет собой  $-OCH_3$ , и  $R^9$  представляет собой -H.

В одном из вариантов осуществления изобретения  $Z$  представляет собой -O- или -NH-.

В одном из вариантов осуществления изобретения  $R^{10}$  представляет собой арил.

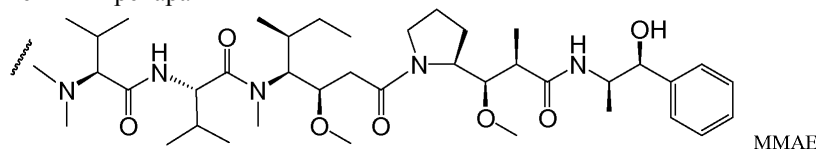
В иллюстративном варианте осуществления  $R^{10}$  представляет собой фенил.

В иллюстративном варианте осуществления, когда  $Z$  представляет собой -O-,  $R^{11}$  представляет собой -H, метил или трет-бутил.

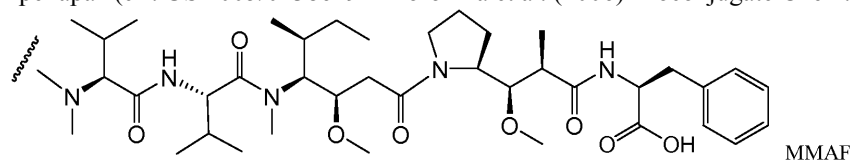
В одном из вариантов осуществления изобретения, когда  $Z$  представляет собой -NH,  $R^{11}$  представляет собой  $-CH(R^{15})_2$ , где  $R^{15}$  представляет собой  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$  и  $R^{16}$  представляет собой  $-C_1-C_8$ -алкил или  $-(CH_2)_n-COOH$ .

В другом варианте осуществления, когда  $Z$  представляет собой -NH,  $R^{11}$  представляет собой  $-CH(R^{15})_2$ , где  $R^{15}$  представляет собой  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .

Иллюстративный вариант осуществления ауристатина формулы  $D_E$  представляет собой MMAE (монометилауристатин E), где волнистая линия указывает на ковалентную связь с линкером конъюгата антитело-лекарственный препарат

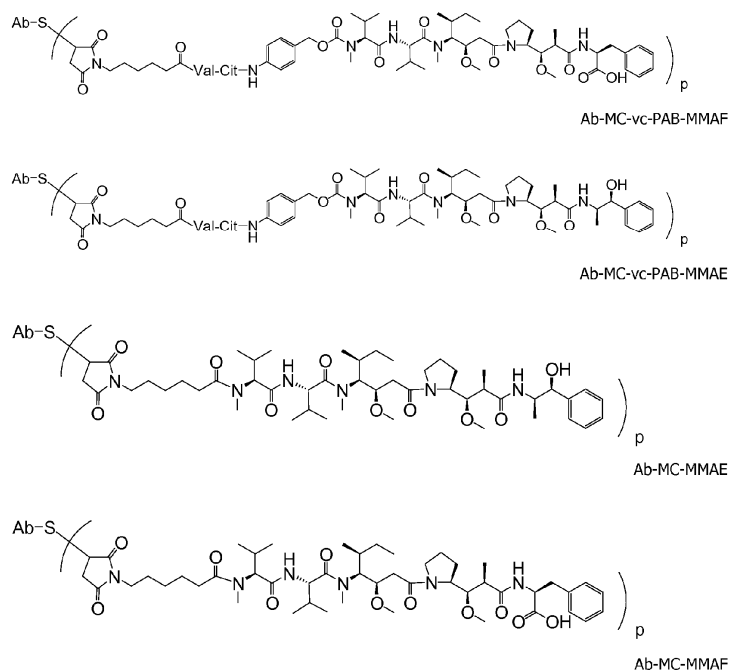


Иллюстративный вариант осуществления ауристатина формулы  $DF$  представляет собой MMAF (монометилауристатин F, вариант ауристатина E (MMAE) с фенилаланином на C-конце лекарственного препарата), где волнистая линия указывает на ковалентную связь с линкером конъюгата антитело-лекарственный препарат (см. US 2005/0238649 и Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)



В одном из аспектов к молекуле лекарственного препарата по  $R^{11}$  можно присоединить гидрофильные группы, включая, помимо прочего, сложные эфиры триэтиленгликоля (TEG), как показано выше. Без связи с какой-либо конкретной теорией гидрофильные группы помогают в интернализации и препятствуют агрегации молекулы лекарственного препарата.

Иллюстративные варианты осуществления ADC, содержащих ауристатин/доластатин или их производные, описаны в US 2005/0238649 A1 и Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124, которые специально включены в настоящий документ в качестве ссылки. Иллюстративные варианты осуществления ADC, содержащие MMAE или MMAF и различные линкерные компоненты, имеют следующие структуры и аббревиатуры (где "Ab" представляет собой антитело;  $p$  представляет собой нагрузку лекарственным препаратом (среднее число молекул лекарственного препарата на одно антитело) и варьирует приблизительно от 1 до приблизительно 8; "vc" представляет собой "val-cit", т.е. дипептид валин-цитруллин; и "S" представляет собой атом серы



Иллюстративные варианты осуществления ADC, содержащих MMAF и различные линкерные компоненты, дополнительно включают Ab-MC-PAB-MMAF и Ab-PAB-MMAF. Интересно, что иммуноконъюгаты, содержащие MMAF, присоединенный к антителу посредством линкера, который протеолитически не расщепляется, обладают активностью, сравнимой с иммуноконъюгатами, содержащими MMAF, присоединенный к антителу посредством протеолитически расщепляемого линкера. См., Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. В таких случаях полагают, что высвобождение лекарственного препарата действует посредством разрушения антитела в клетке. Id.

Как правило, основанные на пептидах молекулы лекарственных препаратов могут быть приготовлены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, руководствуясь способом жидкофазного синтеза (см. E. Schroder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp.76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Молекулы лекарственного препарата ауристина/доластатина могут быть получены в соответствии с способами: US 2005/0238649 A1; патент US № 5635483; патент US № 5780588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863; и Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

В частности, молекулы лекарственного препарата ауристина/доластатина формулы DF, такие как MMAF и его производные, могут быть получены, используя способы, описанные в US 2005/0238649 A1 и Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Молекулы лекарственного препарата ауристина/доластатина формулы DE, такие как MMAE и его производные, могут быть получены, используя способы, описанные в статье Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. Молекулы связанного с линкером лекарственного препарата MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF и MC-vc-PAB-MMAE могут быть успешно синтезированы общепринятыми способами, например, как описано в статье Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784 и в публикации патентной заявки № US 2005/0238649 A1, и затем конъюгированы с представляющим интерес антителом.

#### Е. Способы и композиции для диагностики и детекции

В определенных вариантах осуществления изобретения любое из антител против мезотелина, представленных в настоящем документе, пригодно для детекции наличия мезотелина в биологическом образце. Термин "детекция" в том смысле, в котором используется в настоящем документе, охватывает понятие количественной или качественной детекции. "Биологический образец" содержит в себя, например, клетку или ткань (например, материал биопсии, включая злокачественную или потенциально злокачественную ткань поджелудочной железы, яичника, легкого или эндометрия, или мезотелиому) или сыворотку.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителу против мезотелина для использования в способе диагностики или детекции. В дополнительном аспекте представлен способ детекции наличия мезотелина в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления изобретения способ содержит взаимодействие биологического образца с антителом против мезотелина, как описано в настоящем документе, в условиях, допускающих связывание антитела против мезотелина с мезотелином, и детекцию наличия или отсутствия образования комплекса между антителом против мезотелина и мезотелином в биологическом образце. Такой способ может быть способом *in vitro* или *in vivo*. В

одном из вариантов осуществления изобретения антитело против мезотелина используется для отбора индивидов, подходящих для терапевтического лечения с использованием антитела против мезотелина, например, где мезотелин является биомаркером для отбора пациентов. В дополнительном варианте осуществления изобретения биологическим образцом является сыворотка, например, где детектируют мезотелин, который был выделен раковыми клетками в сыворотку.

В дополнительном варианте осуществления изобретения *in vivo* используется антитело против мезотелина для детекции, например, путем визуализации *in vivo*, положительной по мезотелину злокачественной опухоли у индивида, например, в целях диагностики, прогнозирования или определения стадии злокачественного новообразования, определения подходящего курса терапии или мониторинга ответа злокачественной опухоли на терапию. Одним из способов, известных в данной области техники, для детекции *in vivo* является иммуно-позитронная эмиссионная томография (иммуно-PET), как описано, например, в статье van Dongen et al., *The Oncologist* 12:1379-1389 (2007) и Verel et al., *J. Nucl. Med.* 44:1271-1281 (2003). В таких вариантах осуществления изобретения представлен способ для детекции положительной по мезотелину злокачественной опухоли у индивида, способ, содержащий введение меченого антитела против мезотелина индивиду, имеющему или потенциально имеющему положительную по мезотелину злокачественную опухоль, и детекцию меченого антитела против мезотелина у индивида, где детекция меченого антитела против мезотелина указывает на положительную по мезотелину злокачественную опухоль у индивида. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения меченое антитело против мезотелина содержит антитело против мезотелина, конъюгированное с излучателем позитронов, таких как  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  и  $^{124}\text{I}$ . В частном варианте осуществления изобретения излучателем позитронов является  $^{89}\text{Zr}$ .

В дополнительном варианте осуществления изобретения способ диагностики или детекции содержит взаимодействие первого антитела против мезотелина, иммобилизованного на субстрате, с биологическим образцом, подлежащим тестированию на предмет наличия мезотелина, воздействие на субстрат второго антитела против мезотелина и детекцию наличия или отсутствия связи второго антитела против мезотелина с комплексом между первым антителом против мезотелина и мезотелином в биологическом образце. В качестве субстрата может выступать любая поддерживающая среда, например, стекло, металл, керамика, полимерные шарики, предметные стекла, чипы и другие субстраты. В определенных вариантах осуществления изобретения биологический образец содержит клетку или ткань (например, материал биопсии, включая злокачественную или потенциально злокачественную ткань поджелудочной железы, яичника, легкого или эндометрия, или мезотелиому) или сыворотку, т.е. сыворотку, в которую был выделен мезотелин. В определенных вариантах осуществления изобретения первое или второе антитело против мезотелина является любым антителом, рассмотренным в настоящем документе. В таких вариантах осуществления изобретения вторым антителом против мезотелина может быть 19C3 или могут быть антитела, полученные из 19C3, как описано в настоящем документе.

Иллюстративные нарушения, которые могут быть диагностированы или детектированы по любому из вышеперечисленных вариантов осуществления изобретения включают положительные по мезотелину злокачественные опухоли, такие как положительное по мезотелину злокачественное новообразование поджелудочной железы (включая протоковую аденокарциному поджелудочной железы), положительный по мезотелину рак легкого (включая немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC)), мезотелиому и положительное по мезотелину злокачественное новообразование эндометрия. В одном из вариантов осуществления изобретения положительное по мезотелину злокачественное новообразование является злокачественной опухолью, которой присваивают антимезотелиновый иммуногистохимический (ИНС) балл больше "0", который соответствует очень слабому окрашиванию или его отсутствию у >90% опухолевых клеток, в условиях, описанных в настоящем документе в примере J. В другом варианте осуществления изобретения в положительной по мезотелину злокачественной опухоли экспрессируется мезотелин на уровне 1+, 2+ или 3+, как определено в условиях, описанных в настоящем документе в примере J. Положительная по мезотелину злокачественная опухоль по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения может быть положительной по двум антигенам злокачественной опухоли.

В определенных вариантах осуществления изобретения представлены меченые антитела против мезотелина. Метки включают, помимо прочего, метки или молекулы, детекция которых происходит напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также молекулы, такие как ферменты или лиганды, детекция которых происходит опосредованно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Типичные метки включают, помимо прочего, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных элементов или флуоресцеин и их производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазу сахаридов, например, оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, в сочетании с ферментами, которые используют перекись водорода для окисления исходного красителя, такими как HRP, лактопероксидазу, или микропероксидазу, биотин/авидин, спиновые

метки, стабильные свободные радикалы и т.п. В другом варианте осуществления изобретения меткой является излучатель позитронов. Излучатели позитронов включают, помимо прочего,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  и  $^{124}\text{I}$ . В частном варианте осуществления изобретения излучателем позитронов является  $^{89}\text{Zr}$ .

#### Ф. Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции антитела против мезотелина или иммуноконъюгата, как описано в настоящем документе, готовят смешиванием такого антитела или иммуноконъюгата, имеющих требуемую степень чистоты с одним или несколькими дополнительными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, в основном, нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, и включают, помимо прочего: буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил хлорид аммония; хлорид гексаметония, хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкил-парабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и m-крезол); низкомолекулярные полипептиды (приблизительно менее 10 аминокислотных остатков); белки, такие как сыrovороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; образующие соли противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные сурфактанты, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в настоящем документе дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы человека PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.).

Определенные иллюстративные sHASEGP и способы применения, включая gHuPH20, описаны в публикациях патентов США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов, sHASEGP комбинируют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназами.

Иллюстративные композиции лиофилизированного антитела или иммуноконъюгата описаны в патенте США № 6267958. Водные композиции антитела или иммуноконъюгата включают таковые, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, где последние из упомянутых композиций включают гистидин-ацетатный буфер.

Композиция в настоящем документе может также содержать более одного активного ингредиента по мере необходимости лечения определенного симптома заболевания, предпочтительно таковые с взаимодополняющими активностями, которые не влияют отрицательным образом друг на друга. Например, может дополнительно потребоваться обеспечение гемцитабином, например, для лечения положительной по мезотелину злокачественной опухоли, такой как положительное по мезотелину злокачественное новообразование поджелудочной железы (аденокарцинома поджелудочной железы). В другом примере, может дополнительно потребоваться антитело против MUC16, конъюгированное с цитотоксическим агентом, например, для лечения положительного по мезотелину злокачественного новообразования или положительного по двум антигенам злокачественного новообразования, такого как положительный по мезотелину рак яичника (серозная аденокарцинома яичника) или положительный по двум антигенам рак яичника. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для целевого использования.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способом коацервации или полимеризацией на границе раздела фаз, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметацрилат)а соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственного препарата (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие способы рассмотрены в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело или иммуноконъюгат, матрицы которых представлены в виде профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул.

Композиции, подлежащие использованию для введения *in vivo*, как правило, стерильны. Стерильность может быть успешно достигнута, например, путем фильтрации через стерильные мембраны для фильтрации.

#### Г. Терапевтические способы и композиции

Любое из антител против мезотелина или иммуноконъюгатов, представленных в настоящем документе, могут быть использованы в способах, например, терапевтических способах.

В одном из аспектов антитело против мезотелина или иммуноконъюгат, представленные в настоя-



щем документе, используются в способе ингибирования пролиферации положительных по мезотелину клеток, способе, содержащем воздействие на клетку антителом против мезотелина или иммуноконъюгатом в условиях, допускающих связывание антитела против мезотелина или иммуноконъюгата с мезотелином на поверхности клетки, тем самым ингибируя пролиферацию клетки. В определенных вариантах осуществления изобретения способ является способом *in vitro* или *in vivo*. В дополнительных вариантах осуществления изобретения клетка является клеткой поджелудочной железы, яичника, легкого, мезотелиомы или эндометрия. В дополнительных вариантах осуществления изобретения клетка является положительной по двум антигенам клеткой.

Ингибирование клеточной пролиферации *in vitro* может быть проанализировано, используя набор реактивов для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, коммерчески доступного на фирме Promega (Madison, WI). Этот анализ определяет число живых клеток в культуре на базе оценки количества присутствующего АТФ, который является признаком метаболически активных клеток. См. Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США № 6602677. Анализ может быть выполнен в 96- или 384-луночном формате, обеспечивая возможность автоматизированного скрининга высокой производительности (HTS). См. Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. Процедура анализа содержит добавление единственного реагента (CellTiter-Glo® Reagent) непосредственно в культивируемые клетки. Это приводит к лизису клеток и генерированию люминесцентного сигнала, порождаемого люциферазной реакцией. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующего АТФ, который напрямую пропорционален числу живых клеток, присутствующих в культуре. Данные могут быть зарегистрированы люминометром или формирующим изображение устройством, оснащенным камерой с зарядовой связью CCD. Люминесценция на выходе выражается в относительных световых единицах (RLU).

В другом аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина или иммуноконъюгату для использования в качестве лекарственного средства. В дополнительных аспектах изобретение относится к антителу против мезотелина или иммуноконъюгату для использования в способе лечения. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу против мезотелина или иммуноконъюгату для использования в лечении положительного по мезотелину злокачественного новообразования. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу против мезотелина или иммуноконъюгату для использования в способе лечения индивидуума, имеющего положительное по мезотелину злокачественное новообразование, способе, содержащем назначение индивидууму эффективного количества антитела против мезотелина или иммуноконъюгата. В одном из таких вариантов осуществления изобретения способ дополнительно содержит назначение индивидууму эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства, например, как описано ниже.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителу против мезотелина или иммуноконъюгату для использования в производстве или приготовлении лекарственного препарата. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственный препарат предназначен для лечения положительного по мезотелину злокачественного новообразования. В дополнительном варианте осуществления изобретения лекарственный препарат предназначен для использования в способе лечения положительного по мезотелину злокачественного новообразования, способе, содержащем назначение индивидууму, имеющему положительное по мезотелину злокачественное новообразование, эффективного количества лекарственного препарата. В одном из таких вариантов осуществления изобретения способ дополнительно содержит назначение индивидууму эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства, например, как описано ниже.

В дополнительном аспекте изобретение представляет способ лечения положительного по мезотелину злокачественного новообразования. В одном из вариантов осуществления изобретения способ содержит назначение индивидууму, имеющему такое положительное по мезотелину злокачественное новообразование, эффективного количества антитела против мезотелина или иммуноконъюгата. В одном из таких вариантов осуществления изобретения способ дополнительно содержит назначение индивидууму эффективного количества по крайней мере одного дополнительного терапевтического средства, как описано ниже.

Положительное по мезотелину злокачественное новообразование по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения может быть, например, положительным по мезотелину раком поджелудочной железы (включая протоковую аденокарциному поджелудочной железы), положительным по мезотелину раком яичника (включая серозную аденокарциному яичника), положительным по мезотелину раком легкого (включая немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC)), мезотелиомой и положительным по мезотелину раком эндометрия. В одном из вариантов осуществления изобретения положительное по мезотелину злокачественное новообразование является злокачественной опухолью, которой присваивают антимезотелиновый иммуногистохимический (ИНС) балл больше "0", который соответствует очень слабому окрашиванию или его отсутствию у >90% опухолевых клеток, в условиях, описанных в настоящем документе в примере J. В другом варианте осуществления изобретения в положительной по мезотелину злокачественной опухоли экспрессируется мезотелин на уровне 1+, 2+ или 3+, как определено в

условиях, описанных в настоящем документе в примере J. Положительная по мезотелину злокачественная опухоль по любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения может быть положительной по двум антигенам злокачественной опухоли.

"Индивидуумом" в соответствии с любым вышеуказанным вариантом осуществления изобретения может быть человек.

В дополнительном аспекте изобретение представляет фармацевтические композиции, содержащие любые антитела против мезотелина и иммуноконъюгаты, представленные в настоящем документе, например, для использования в любом из вышеуказанных терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из представленных в настоящем документе антител против мезотелина или иммуноконъюгатов и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любое из представленных в настоящем документе антител против мезотелина или иммуноконъюгатов и по крайней мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, как описано ниже.

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению могут быть использованы либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами, применяемыми в терапии. Например, антитело или иммуноконъюгат по изобретению могут быть совместно назначены по крайней мере с одним дополнительным терапевтическим средством. В определенных вариантах осуществления изобретения дополнительным терапевтическим средством является гемцитабин. В определенных вариантах осуществления изобретения дополнительным терапевтическим средством является анти-MUC16 антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом.

Такая комбинированная терапия, указанная выше, заключается в комбинированном применении (где два или более терапевтических средств включены в одну и ту же или отдельные композиции) и раздельном применении, при этом применение антитела или иммуноконъюгата по изобретению может иметь место до, одновременно с и/или после применения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению могут также быть использованы в комбинации с лучевой терапией.

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) могут быть применены любым пригодным способом, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный, и, по мере необходимости в случае локального лечения - вводимый внутрь пораженных тканей способ применения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым пригодным способом, например, посредством инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, отчасти в зависимости от того, является ли применение постоянным или кратковременным. Различные схемы дозирования, включая, помимо прочего, однократные или многократные применения в течение различных временных периодов, болюсное введение и импульсная инфузия рассмотрены в настоящем документе.

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению образуют лекарственную смесь, дозируют и назначают способом в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторами для рассмотрения в данном контексте включают определенное нарушение, подлежащее лечению, определенное молокопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причина нарушения, место доставки средства, способ назначения, схема назначения и другие факторы, известные медицинским работникам. Антитело или иммуноконъюгат не обязательно должен быть, но в некоторых случаях образует смесь с одним или несколькими средствами, в настоящее время используемыми для предотвращения или лечения исследуемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антитела или иммуноконъюгата, присутствующих в композиции, типа нарушения или лечения и других факторов, обсужденных выше. Они обычно используются в одних и тех же дозах и с применением способов введения, как описано в настоящем документе, или в количестве приблизительно от 1 до 99% доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и любым способом, которые эмпирически/клинически определяют для целевого использования.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела или иммуноконъюгата по изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами) зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела или иммуноконъюгата, тяжести и течения заболевания, назначают ли антитело или иммуноконъюгат для профилактических или терапевтических целей, предыдущей терапии, анамнеза пациента и ответа на антитело или иммуноконъюгат, и усмотрения лечащего врача. Антитело или иммуноконъюгат надлежащим образом назначают пациенту в одно время или в течение курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания приблизительно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) антитела или иммуноконъюгата может быть начальной подходящей дозой для назначения пациенту, либо, например, в виде одного или нескольких отдельных применений, либо в виде непрерывной инфузии. Одна стандартная ежедневная доза может находиться в диапазоне приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных применений в течение нескольких дней или более длительно в зависимости от состояния пациента, лечение как правило поддерживают до

наступления требуемого подавления симптомов заболевания. Одна иллюстративная доза антитела или иммуноконъюгата находится в диапазоне приблизительно от 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, одна или несколько доз величиной приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любая их комбинация) могут быть назначены пациенту. Такие дозы могут быть назначены периодически, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает приблизительно от двух до приблизительно двадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела). Может быть назначена начальная более высокая нагрузочная доза с последующим назначением одной или нескольких более низких доз. Однако могут быть пригодны другие схемы дозирования. Можно без труда осуществлять мониторинг эффективности этой терапии стандартными методиками и способами анализа.

Понятно, что любая из вышеуказанных композиций или любой из терапевтических способов могут быть осуществлены, используя как иммуноконъюгат по изобретению, так и антитело против мезотелина.

#### Н. Изделия промышленного производства

В другом аспекте изобретения представлено изделие промышленного производства, содержащее материалы, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики нарушений, описанных выше. Изделие промышленного производства содержит контейнер и этикетку или вкладыш на контейнере или в одной упаковке с ним. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, ампулы, шприцы, мешки для инфузионных растворов. Контейнеры могут быть сделаны из различного материала, такого как стекло или пластик. Контейнер вмещает композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики нарушения и может иметь стерильный доступ через порт (например, контейнером может быть мешок для внутривенного раствора или ампула, имеющие пробку, поддающуюся прокалыванию иглой для подкожных инъекций). По крайней мере одним активным веществом в композиции является антитело или иммуноконъюгат по изобретению. Этикетка или вкладыш указывают на то, что композиция используется для лечения выбранного патологического состояния. Более того, изделие промышленного производства может включать (а) первый контейнер с содержащейся внутри композицией, где композиция содержит антитело или иммуноконъюгат по изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся внутри композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или наоборот терапевтическое средство. Изделие промышленного производства в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно включать вкладыш, указывающий на то, что композиции могут быть использованы для лечения определенного патологического состояния. Альтернативно, или дополнительно, изделие промышленного производства может дополнительно включать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

I. Депонирование биологического материала Приведенный ниже биологический материал был отдан на хранение в Американскую коллекцию типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC): Обозначение гибридомы № ATCC Дата регистрации MPF:3542 (19C3.1.2) РТА-11464 9 ноября 2010 г.

Отданная на хранение гибридома, упомянутая выше, продуцирует антитело 19C3, на которую ссылаются в настоящем документе.

Это депонирование было сделано в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и его нормативным документам (Будапештского договора). Это гарантирует поддержание жизнеспособной культуры депонированного образца в течение 30 лет с момента даты депонирования и по крайней мере пяти (5) лет после самого последнего обращения за предоставлением депонированного образца. Этот депонированный образец станет доступным в ATCC согласно условиям Будапештского договора и предметом соглашения между Genentech, Inc. и ATCC, которое гарантирует, что все ограничения, наложенные депозитом, на доступность депонированного материала неограниченному кругу лиц будут окончательно сняты после выдачи соответствующего патента США, гарантирует постоянную и неограниченную доступность потомства клеточной культуры неограниченному кругу лиц после выдачи соответствующего патента США или после публикации любой патентной заявки США или другой страны, в зависимости от того, что произойдет ранее, и гарантирует доступность потомства клеточной культуры лицу, определенному комиссаром США по патентам и торговым знакам, для получения прав на него в соответствии с 35 U.S.C § 122 и правилами для комиссаров согласно ему (включая 37 CFR §1.14 с конкретной ссылкой на 886 OG 638).

#### III. Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций по изобретению. Известно, что различные другие варианты осуществления изобретения могут быть использованы на практике, принимая во внимание общее описание, приведенное выше.

#### A. Экспрессия гена мезотелина человека

Экспрессия гена мезотелина человека была проанализирована, используя соответствующую базу данных, содержащую информацию о экспрессии генов (GeneExpress®, Gene Logic inc., Gaithersburg, MD). Графический анализ базы данных GeneExpress® был выполнен, используя устройство визуализации профиля микроматрицы. Фиг. 2 является графическим представлением данных по экспрессии гена мезотелина человека в различных тканях, которые перечислены слева. Шкала в верхней части графика означает уровни экспрессии гена на основании интенсивности сигнала гибридизации. Точки появляются как выше, так и ниже линии, прилегающей к каждой перечисленной ткани. Точки, появляющиеся выше линии, представляют экспрессию гена в нормальной ткани, и точки, появляющиеся ниже линии, представляют экспрессию гена в опухоли и пораженной ткани. Фиг. 2 демонстрирует повышенную экспрессию гена мезотелина в определенной опухоли или пораженных тканях относительно соответствующих для них норм. В частности, мезотелин демонстрирует значительную повышенную экспрессию в опухолях яичника, поджелудочной железы, эндометрия и легкого, включая аденокарциному и мезотелиому. Экспрессия мезотелина человека практически отсутствует в нормальных тканях, за исключением нормального мезотелия (брюшины, перикарда и плевры).

#### В. Синтез антитела

Моноклональные антитела против мезотелина человека были получены, используя следующие методики. Либо MPF:мезотелин человека (аминокислоты 34-580 SEQ ID NO:42), либо мезотелин человека (SEQ ID NO:43, соответствующая аминокислотам 296-580 SEQ ID NO:42), каждый присоединенный к N-концевому unitу His (HQ)-tag, был экспрессирован в *E. coli* 58F3 и очищен на колонке Ni-NTA (Qiagen) с последующей гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 в 20 mM MES pH 6,0, 6M GdnHCl, как описано ранее (Kirchhofer et al., 2003) и последующим диализом в 1 mM HCl для хранения при -80°C.

Пять мышей Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) были гипериммунизированы шесть раз 2 мкг смеси двух антигенов в адъюванте Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Две самые лучшие мыши были отобраны на основании высоких титров антител с помощью прямого ELISA, и их В-клетки были пулированы и слиты с мышиными миеломными клетками. (X63.Ag8.653; Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA), используя модифицированный протокол, аналогичный ранее описанному (Koehler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995). Через 10-12 дней были собраны супернатанты от гибридом и проведен скрининг на предмет связывания с обоими антигенами (отдельно), используя прямой ELISA. Для проверки узнавания правильно уложенного, гликозилированного, экспрессирующегося на клеточной поверхности мезотелина, положительные в ELISA супернатанты были дополнительно подвергнуты скринингу способом FACS на трансфицированных gD-мезотелином клетках SVT2 (gD представляет собой N-концевую эпитопную метку, используемую в качестве положительного контроля с анти-gD антителами). Положительные гибридомы были субклонированы дважды способом предельного разведения, и одиннадцать были размножены, и антитела были очищены способом хроматографии с протеином А.

На фиг. 3 представлены выделенные моноклональные антитела наряду с определенными свойствами, описанными более подробно ниже.

#### С. Гуманизация 7D9 и 22A10

Моноклональные антитела 7D9 и 22A10 были гуманизированы, как описано ниже. Нумерация аминокислотных остатков соответствовала Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

##### 1. Гуманизация 7D9

###### а) Клонирование переменных доменов мышиного 7D9

Суммарная РНК была выделена из клеток гибридомы, продуцирующей мышиное 7D9, используя стандартные способы. Переменные легкие (VL) и переменные тяжелые (VH) домены были амплифицированы, используя ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к тяжелой и легкой цепям. Прямые праймеры были специфичны для N-концевой аминокислотной последовательности участков VL и VH. Соответственно обратные праймеры LC и HC были сконструированы для отжига с участком в константном легком (CL) и константном тяжелом домене 1 (CH1), которые высоко консервативны среди видов. Полинуклеотидная последовательность вставок была определена, используя обычные способы секвенирования. Аминокислотные последовательности 7D9 VL и VH показаны на фиг. 4 и 5 соответственно.

б) Прямые пересадки гипервариабельного участка в акцепторный, консенсусный каркасный участок человека

Варианты, сконструированные при гуманизации 7D9, были проанализированы в виде IgG. Домены VL и VH из мышиного 7D9 были совмещены с консенсусными последовательностями VL каппа I человека (VL<sub>К1</sub>) человека и подгруппы III VH (VH<sub>III</sub>) человека. Гипервариабельные участки из мышиного 7D9 (mu7D9) антитела были вставлены в акцепторные каркасные участки VL<sub>К1</sub> и VH<sub>АТА</sub> с образованием 7D9.v1. Акцепторный VH каркасный участок VH<sub>АТА</sub> отличается от VH<sub>III</sub> по 3 позициям: R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Из домена mu7D9 VL в VL<sub>К1</sub> были пересажены позиции 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3). Из домена mu7D9 VH были пересажены в VH<sub>АТА</sub> позиции 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 95-102 (H3) (фиг. 1 и 2). Эти определения CDR включали позиции, опреде-

ляемые гипервариабельностью их последовательности (Wu, T.T. & Kabat E.A. (1970), их структурным расположением (Clothia, C. & Lesk, A. M. (1987)) и их вовлечением во взаимодействие антигена-антитела (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)).

7D9.v1 прямого пересаживания был получен путем мутагенеза по Кункелю, используя отдельный олигонуклеотид для каждой гипервариабельной области. Три фосфорилированных олигонуклеотида либо для тяжелой цепи, либо для легкой цепи были добавлены к 571 нг матрицы Kunkel в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> в конечном объеме 40 мкл. Смесь отжигали при 90°C в течение 2 мин, 50°C в течение 5 мин и затем охлаждали на льду. К 10 мкл отожженной матрицы были добавлены 0,5 мкл 100 mM АТФ, 0,5 мкл 25 mM дНТФ (25 mM каждый из дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10X ТМ буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>), 80 Ед. лигазы T4 и 4 Ед. T7-полимеразы с образованием конечного объема, равного 13,6 мкл, с инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре. 10 мкл лигированного продукта было затем трансформировано в XL1-синие клетки (Stratagene). Подходящие клоны были идентифицированы секвенированием ДНК и экспрессированы в виде IgG.

#### с) Оценка вариантов

Варианты 7D9 были экспрессированы в виде IgG путем временной трансфекции СНО. IgG был очищен путем аффинной хроматографии с протеином G. Аффинность каждого варианта 7D9 IgG для мезотелина человека была определена способом поверхностного плазмонного резонанса, используя BIAcore™-2000. На чипах BIAcore исследовательского класса CM5 были иммобилизованы приблизительно 110 RU рекомбинантного мезотелина человека, полученного из E. coli, используя набор реактивов BIAcore для соединения аминов. Серийные 2-кратные разведения каждого варианта 7D9 (от 0,488 до 1000 нМ в PBS, содержащем 0,05% Tween 20) были инъецированы со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец был проанализирован с 5-минутной ассоциацией и 3,5-минутной диссоциацией. После каждой инъекции чип был восстановлен, используя 10 mM глицин pH 1,7. Ответ связывания был откорректирован путем вычитания RU из проточной кюветы с использованием не относящегося к данному специфическому связыванию IgG, иммобилизованного с аналогичной плотностью. Модель Ленгмюра 1:1 одно-временной обработки  $k_{on}$  и  $k_{off}$  была использована для кинетического анализа.

#### д) Результаты

Человеческий акцепторный каркасный участок, используемый для гуманизации 7D9, основан на VL каппа человека I консенсусном (VL<sub>К1</sub>) и акцепторном VH каркасном участке VH<sub>АТА</sub>, который отличается от консенсусного VH человека подгруппы III (VH<sub>III</sub>) по 3 позициям: R71A, N73T и L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Домены VL и VH мышинового 7D9 были совмещены с доменами VL<sub>К1</sub> и VH<sub>III</sub> человека; гипервариабельные участки были идентифицированы и пересажены в акцепторный каркасный участок человека с образованием 7D9.v1 (фиг. 4 и 5). Как IgG, аффинность 7D9.v1 падала в ~2 раза относительно mu7D9 (отформатированного как химерное 7D9), что было определено способом BIAcore (фиг. 6).

Для улучшения аффинности связывания 7D9.v1 позиции 36 и 87 в легкой цепи и позиции 48, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78 и 80 в тяжелой цепи были заменены остатками, обнаруженными в этих позициях в mu7D9. Комбинации этих измененных легких и тяжелых цепей с цепями из 7D9.v1 были трансфицированы в СНО, экспрессированы в виде IgG и очищены, и оценены на предмет связывания с мезотелином человека способом BIAcore (фиг. 6).

Варианты 7D9.v2 и 7D9.v3, каждый из которых содержит измененную легкую цепь, имеют аффинность, сопоставимую с химерным 7D9. Вариант 7D9.v3 отличается от 7D9.v1 по 2 позициям в легкой цепи. Никакое изменение в отдельности не было достаточным для улучшения связывания, сопоставимого с таковым mu7D9 (фиг. 6).

Выводы по изменениям для гуманизированного 7D9.v3: 6 мышинных 7D9 CDR (определенные как позиции 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 93-102 (H3)) были пересажены в консенсусные акцепторные домены VL<sub>К1</sub> и VH<sub>АТА</sub> человека. Два дополнительных аминокислотных остатка каркасного участка, 36 и 87 легкой цепи, были заменены обратно на мышинные аминокислотные остатки, приводя к образованию 7D9.v3 с сопоставимой аффинностью mu7D9.

### 2. Гуманизация 22A10

#### а) Клонирование вариабельных доменов мышинового 22A10

Суммарная РНК была выделена из клеток гибридомы, продуцирующих мышинное 22A10, используя стандартные способы. Вариабельные легкие (VL) и вариабельные тяжелые (VH) домены были амплифицированы, используя ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC). Прямые праймеры были специфичны для N-концевой аминокислотной последовательности участков VL и VH. Соответственно обратные праймеры LC и HC были сконструированы для отжига с участком в константном легком (CL) и константном тяжелом домене 1 (CH1), которые высоко консервативны среди видов. Полинуклеотидная последовательность вставок была определена, используя обычные способы секвенирования. Аминокислотные последовательности 22A10 VL и VH показаны на фиг. 7 и 8 соответственно.

б) Прямые пересадки гипервариабельного участка в акцепторный, консенсусный каркасный участок человека

Варианты, сконструированные при гуманизации 22A10, были проанализированы в виде IgG и отображены моновалентно в виде Fab на фаге. Фагмида, используемая для данной работы, была моновалентным дисплейным вектором Fab-g3, который состоит из двух открытых рамок считывания под контролем одного промотора rhoA. Первая открытая рамка считывания состоит из сигнальной последовательности stII, соединенной с доменами VL и CH1 акцепторной легкой цепи, и вторая состоит из сигнальной последовательности stII, соединенной с доменами VL и CH1 акцепторной тяжелой цепи, за которыми следует минорный фаговый белок оболочки P3.

Домены VL и VH из мышинового 22A10 были совмещены с консенсусными последовательностями VL каппа I человека (VL<sub>KI</sub>) человека и подгруппы III VH (VH<sub>III</sub>) человека. Гипервариабельные участки из мышинового 22A10 (mu22A10) антитела были вставлены в акцепторные каркасные участки VL<sub>KI</sub> и VH<sub>III</sub> с образованием 22A10 трансплантата. Из домена VL mu22A10 в VL<sub>KI</sub> были пересажены позиции 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3). Из домена VH mu22A10 были пересажены в VH<sub>III</sub> позиции 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 95-102 (H3) (фиг. 7 и 8). Эти определения CDR включали позиции, определяемые гипервариабельностью их последовательности (Wu, T.T. & Kabat E.A. (1970), их структурным расположением (Clothia, C. & Lesk, A. M. (1987)) и их вовлечением во взаимодействие антигена-антитела (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)).

22A10 трансплантат был получен путем мутагенеза по Кункелю, используя отдельный олигонуклеотид для каждой гипервариабельной области. Три фосфорилированных олигонуклеотида либо для тяжелой цепи, либо для легкой цепи были добавлены к 571 нг матрицы Kunkel в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> в конечном объеме 40 мкл. Смесь отжигали при 90°C в течение 2 мин, 50°C в течение 5 мин и затем охлаждали на льду. К 10 мкл отожженной матрицы были добавлены 0,5 мкл 100 mM АТФ, 0,5 мкл 25 mM дНТФ (25 mM каждый из дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10X ТМ буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>), 80 Ед. лигазы T4 и 4 Ед. T7-полимеразы с образованием конечного объема, равного 13,6 мкл, с инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре. 10 мкл лигированного продукта было затем трансформировано в XL1-синие клетки (Stratagene). Подходящие клоны были идентифицированы секвенированием ДНК и экспрессированы в виде IgG.

#### с) Умеренная рандомизация гипервариабельных участков

Созревание аффинности трансплантата 22A10 осуществляли, используя стратегию умеренной рандомизации. Вариабельность последовательности была внесена отдельно в каждый гипервариабельный участок таким образом, что предпочтение в пользу мышинной последовательности гипервариабельного участка поддерживали, используя стратегию олигонуклеотидного синтеза с повреждениями (Gallor et al., J Med Chem 37:1233-51 (1994)). Для каждой диверсифицированной позиции кодон, кодирующий аминокислоту дикого типа, повреждается смесью 70-10-10-10 нуклеотидов, приводя в среднем к 50 процентам мутаций в каждой позиции. Вариабельность последовательности была внесена в гипервариабельные участки 22A10-трансплантат, используя мутагенез Кункеля с образованием шести в легкой степени рандомизированных фаговых библиотек, которые были отсортированы отдельно. Было сделано шесть библиотек, каждая из которых содержала один рандомизированный в легкой степени гипервариабельный участок.

#### д) Получение фаговых библиотек

Олигонуклеотиды, сконструированные для обеспечения разнообразия каждому гипервариабельному участку, были фосфорилированы по отдельности в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 660 нг олигонуклеотида, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM АТФ, 20 mM ДТТ и 5 Ед полинуклеотидкиназы, в течение 1 ч при 37°C.

Для каждой библиотеки, 2 мкл фосфорилированного олигонуклеотида было добавлено к 300 нг матрицы Кункеля в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> в конечном объеме 10 мкл. Отжиг смеси проводили при 90°C в течение 2 мин, 50°C в течение 5 мин с последующим охлаждением на льду. К матрице после отжига добавляли 0,5 мкл 10 mM АТФ, 0,5 мкл 10 mM дНТФ (10 mM дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ каждый), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10x ТМ-буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>), 80 Ед T4-лигазы и 4 Ед T7-полимеразы в конечном объеме 20 мкл в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем каждым лигированным продуктом были трансформированы XL1-голубые клетки, культивируемые в 0,5 мл 2YT, содержащей 5 мкг/мл тетрациклина и M13/K07 хелперный фаг (MOI 10), в течение 2 ч при 37°C и затем пулированы и перенесены в 500 мл 2YT, содержащей 50 мкг/мл карбенацилина и культивированы 16 ч при 37°C.

#### е) Селекция фагов

Для твердофазной селекции фагов 293 мезотелина человеческого происхождения или из яванского макака было иммобилизовано в 50 mM бикарбоната натрия pH 9,6 на плашках для микротитрования MaxiSorp (Nunc, Rochester, NY) за ночь при 4°C. Плашки были блокированы по крайней мере 1 час, используя казеиновый ингибитор Casein Blocker (Pierce, Rockford, IL).

Фаги были собраны из клеточного супернатанта и суспендированы в PBS, содержащем 5% порошковое молоко и 0,05% Tween 20 (PBSBT). После добавления фаговой библиотеки и 1-часовой инкубации лунки плашки для микротитрования были тщательно промыты PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (PBST) и связанные фаги были элюированы путем инкубации лунок в 20 mM HCl, 500 mM KCl в течение 30 мин.

Элюированные фаги были нейтрализованы 1M Tris, pH 8 и размножены, используя XL1-голубые клетки и M13/KO7 хелперные фаги, и культивированы в течение ночи при 37°C в 2YT, 50 мкг/мл карбенциллина. Титры фага, элюированного из мишень-содержащей лунки, были сравнены с титрами фага, извлеченного из не содержащей мишень лунки для оценки обогащения.

Для селекции фагов 293 в жидкой фазе биотинилированный мезотелин человеческого происхождения или из яванского макака был добавлен к фагам, суспендированным в PBS, содержащем 5% порошковое молоко и 0,05% Tween 20 (PBSBT). После инкубации фаг, связанный с биотинилированным мезотелином, фиксировался на плашке для микротитрования, покрытой стрептавидином, в течение 5 мин. Лунки плашки для микротитрования были тщательно промыты PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBSBT), и связавшиеся фаги были элюированы путем инкубации лунок в 20 mM HCl, 500 mM KCl в течение 30 мин. Элюированные фаги были нейтрализованы 1M Tris, pH 8, и размножены, используя XL1-голубые клетки и M13/KO7 хелперные фаги, и культивированы в течение ночи при 37°C в 2YT, 50 мкг/мл карбенциллина. Титры фага, элюированного из мишень-содержащей лунки, были сравнены с титрами фага, извлеченного из не содержащей мишень лунки для оценки обогащения.

Для селекции фагов в жидкой фазе точность селекции была поэтапно повышена как путем захвата фага, который связывался со снижающимися концентрациями биотинилированного мезотелина в растворе с последующим захватом нейтралитином в течение 10 мин (селекция по скорости ассоциации), так и путем увеличения времени промывки и температуры, обуславливая диссоциацию слабо связавшегося фага (селекция по скорости диссоциации) (Fuh et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)).

#### ф) Производство IgG

С целью скрининга варианты IgG вначале были продуцированы в клетках 293. Векторами, кодирующими VL и VH (25 мкг), были трансфицированы клетки 293, используя систему FUGENE (Roche, Basel, Switzerland). 500 мкл FuGene смешивали с 4,5 мл среды DMEM, не содержащей FBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Каждую цепь (25 мкг) добавляли к этой смеси и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин и затем переносили в пять флаконов T-150 для трансфекции в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день, среды, содержащие смесь для трансфекции, удаляли и заменяли на 23 мл среды PS04, содержащей 0,1 мл/л микроэлементов (A0934) и 10 мг/л инсулина (A0940). Клетки инкубировали в течение дополнительных 5 дней, после чего среду отбирали при 1000 об/мин в течение 5 мин и фильтровали в стерильных условиях, используя 0,22 мкм фильтр с низким связыванием белка. Образцы могли храниться при 4°C после добавления 2,5 мл 0,1% PMSF на каждые 125 мл среды. IgG очищали аффинной хроматографией с протеином G.

#### г) Определение аффинности

Аффинность вариантов 22A10 IgG для мезотелина человека или яванского макака была определена способом поверхностного плазмонного резонанса, используя BIAcore™-2000. На чипах BIAcore исследовательского класса CM5 были иммобилизованы приблизительно 110 RU полученного из E. coli рекомбинантного мезотелина человека или яванского макака, используя набор реактивов BIAcore для соединения аминов. Серийные 2-кратные разведения каждого варианта 22A10 (от 0,488 до 1000 nM в PBS, содержащем 0,05% Tween 20) были инъецированы со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец был проанализирован с 5-минутной ассоциацией и 3,5-минутной диссоциацией. После каждой инъекции чип был восстановлен, используя 10 mM глицин pH 1,7. Ответ связывания был откорректирован путем вычитания RU из проточной кюветы с использованием не относящегося к данному специфическому связыванию IgG, иммобилизованного с аналогичной плотностью. Модель Ленгмюра 1:1 одновременной обработки  $k_{on}$  и  $k_{off}$  была использована для кинетического анализа.

#### h) Результаты

В основе акцепторного каркасного участка человека, используемого для гуманизации 22A10, лежал консенсусный домен VL каппа I человека и консенсусный домен VH подгруппы III человека. Домены VL и VH  $\mu$ 22A10 были совмещены с доменами каппа I человека и подгруппы III; каждая определяющая комплементарность область (CDR) была идентифицирована и пересажена в акцепторный каркасный участок человека с образованием CDR-трансплантата, который мог быть экспрессирован в виде IgG или представлен как Fab на фаге (фиг. 7 и 8).

Были получены шесть библиотек с рандомизацией в незначительной степени, в которых вариативность была внесена по отдельности в каждую CDR трансплантата 22A10 CDR. Библиотеки были отсортированы по взаимодействию с мезотелином человека и яванского макака (получены из клеток 293, с целью улучшения связывания с гликозилированными формами мезотелина яванского макака или человека), используя методические подходы сортировки в твердой фазе и в растворе. Способ сортировки в растворе позволяет отобрать высоко аффинные клоны посредством манипуляции концентрацией биотинилированной мишени и временем захвата фага, в то время как добавление немеченой мишени может быть использовано для элиминации клонов с более быстрыми скоростями диссоциации (Fun et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)). Клоны из последнего раунда для каждой библиотеки были отобраны для анализа последовательности ДНК, и были выявлены изменения последовательности, запланированные для каждой CDR, за исключением CDR-L2 и CDR-H2, предполагая много возможных вариаций для улучшения связывания антигена. Несколько клонов, выбранных либо по мезотелину человека, либо мезотелину

яванского макака, имели изменения в CDR-H3, при этом наиболее высоко представленные имели замену тирозина на изолейцин в позиции 99. Этот вариант, наряду с некоторыми другими, экспрессировался в виде IgG и был охарактеризован на предмет связывания с мезотелином способом *Biacore* и анализом Скэтчарда (фиг. 9А). У нескольких клонов аффинность превышала таковую трансплантата 22А10.

Гуманизированные варианты 22А10 были использованы для иммунопреципитации мезотелина из клеточной линии, стабильно экспрессирующей мезотелин. Клетки ВЈАВ, стабильно экспрессирующие gD-меченый мезотелин разных видов, были иммунопреципитированы гуманизированными вариантами 22А10, как показано на фиг. 9В (Gr, трансплантат; v1 (1), v17 (17) и v83 (83)) или h7D9.v3, h5B6 анти-gD или отрицательный контроль hIgG для сравнения. Иммунопреципитаты были промыты и проанализированы Вестерн-блоттингом с использованием мышинных анти-gD антител для определения gD-мезотелина. h2210.v83 было наилучшим из вариантов h22А10 по его способности вызывать иммунопреципитацию всех трех видов мезотелина (яванского макака, верхний блот; человека, средний блот; и крысиного, нижний блот). В самой правой лунке показано 20% нанесенного лизата (без иммунопреципитации) для сравнения уровней общей экспрессии. Маркеры молекулярного веса (кДа) указаны слева.

Выводы по изменениям для гуманизированного 22А10.V83

Начиная с пересадки шести мышинных 22А10 CDR (определено как позиции 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) и 95-102 (H3)) в консенсусную VL человека каппа I и VH подгруппы III, была использована рандомизация CDR легкой степени для идентификации изменения в CDR H3 (Y99I), что улучшало связывание с мезотелином человека и яванского макака. У 22А10.v83 обнаружена высокая аффинность связывания и также способность узнавать больше сайтов связывания относительно других гуманизированных вариантов.

В данной заявке мышинные моноклональные антитела 7D9 и 22А10 альтернативно называют 7D9, m7D9 или mu7D9; и 22А10, m22А10 или mu22А10 соответственно. Гуманизированные моноклональные антитела 7D9.v3 и 22А10.v83 альтернативно называют 7D9.v3, h7D9.v3 или hu7D9.v3; и 22А10.v83, h22А10.v83 или hu22А10.v83 соответственно, если не указано иное.

#### D. Видовая перекрестная реактивность

Моноклональные антитела были протестированы с целью определения возможной перекрестной реактивности с мезотелином из других видов, отличных от человека. На фиг. 11 показаны гомология последовательности между мезотелином человека (SEQ ID NO:43), яванского макака (SEQ ID NO:46), крысы (SEQ ID NO:47) и мыши (SEQ ID NO:48). Затемненные остатки идентичны по крайней мере между двумя видами. Незатемненные остатки отличаются по крайней мере между двумя из четырех видов. На фиг. 12 показаны результаты анализа FACS клеток 293, стабильно трансфицированных меченым по эпитопу gD мезотелином (мезотелином человека, яванского макака, крысы или мыши); окрашенных 10 мкг/мл h7D9.v3, h22А10.v83 или анти-gD h5B6; и выявляемых анти-человеческим антителом Alexa 647.

Нетрансфицированные клетки 293 не экспрессировали нормально мезотелин ("WT"). h7D9.v3 является специфичным для мезотелина человека, в то время как h22А10.v83 связывается с мезотелином человека, яванского макака и крысы, но не с мезотелином мыши. Окрашивание анти-gD подтверждало, что мышинный мезотелин действительно экспрессируется.

#### E. Аффинности антител

Для определения относительных аффинностей связывания h7D9.v3 и h22А10.v83 был выполнен анализ Скэтчарда, следуя стандартной методике (Holmes et al., Science 256:1205-1210 (1992)), вкратце путем инкубации неприкрепленных клеток мечеными [<sup>125</sup>I] антителами h7D9.v3 или h22А10.v83 в течение 2 ч при комнатной температуре в присутствии увеличивающихся концентраций немеченого антитела, промывки и количественного определения связанной с клетками радиоактивностью, измеряя активность сцинтилляционным способом. Данные были проанализированы аппроксимацией нелинейной кривой регрессии в программе New Ligand (Genetech, Inc., South San Francisco, CA) для определения значений Kd (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220-239 (1980)).

Как показано на фиг. 13, h7D9.v3 связывало gD-меченый мезотелин человека, экспрессируемый в стабильно трансфицированных клеточных линиях 293, ВЈАВ и HT1080 (все из которых не экспрессируют эндогенный мезотелин), с аффинностью 0,2, 0,25 и 0,97 нМ соответственно. Эти значения Kd охватывали диапазон, выявленный для эндогенного мезотелина в четырех клеточных линиях поджелудочной железы и двух клеточных линиях яичника (0,41-1 нМ). Значения аффинностей h22А10.v83 для мезотелина человека, экспрессируемого в тех же самых стабильных клеточных линиях, составляли 2,7, 1,8 и 6,2 нМ соответственно, согласно их аффинностям для эндогенного мезотелина человека (~9-10 нМ). h22А10.v83 связывало крысиный мезотелин, экспрессируемый в стабильно трансфицированных клетках 293 и клетках ВЈАВ, с аффинностями 7,3 и 2,7 нМ соответственно, что согласуется с Kd, равной 6,2 нМ, наблюдаемой для эндогенного крысиного мезотелина из нормальной плевральной клеточной линии, 4/4-RM (Aronson et al., InVitro 17:61-70 (1981)).

#### F. Группы эпитопов

Чтобы определить, разделяют ли те же самые эпитопы 7D9 и 22А10, как и другие антитела против мезотелина, перечисленные на фиг. 3, картирование эпитопов моноклональных антитела было выполнено стандартным перекрестным конкурентным ELISA. Девяностошестиуночные плашки Nunc Immu-



nosorp (Nalge Nunc, USA) были покрыты в течение ночи при 4°C 100 мкл 1 мкг/мл внеклеточным домезотелина человека в буфере для иммобилизации (50 mM карбонат натрия, pH 9,5). Все последующие этапы были выполнены при комнатной температуре. После промывки три раза в 200 мкл промывочного буфера (PBS, содержащий 0,05% Tween 20, pH 7,4) плашки были блокированы буфером ELISA (PBS, содержащий 0,5% бычий сывороточный альбумин (BSA) и 0,05% Tween 20, pH 7,4) в течение 60 мин. Мышиные моноклональные антитела 7D9 и 22A10 были затем добавлены в концентрации 20 мкг/мл в буфере ELISA в течение 2 ч (100 мкл на лунку). Без промывки были также добавлены биотинилированные варианты всех тестируемых антител против мезотелина (100 мкл 2 мкг/мкл) до конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 30 мин. После отмывки три раза в 200 мкл промывочного буфера, связывание любого биотинилированного антитела было выявлено путем добавления стрептавидина-пероксидазы хрена (HPR) (Zymed; Carlsbad, CA) в разведении 1:5000 в течение 30 мин. После трех промывок, как указано выше, 100 мкл хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) было добавлено (BioFX Laboratories; Owings Mills, MD) в течение 5 мин. Хромогенная реакция была остановлена путем добавления 100 мкл стоп-реагента (BioFX Laboratories), и показатель поглощения был зарегистрирован при 620 нм на приборе Ultramicroplate Reader (Biotek Instruments; Winooski, VT). Максимальная степень возможного связывания каждого из биотинилированных антител была определена параллельно путем их инкубации с мезотелином в отсутствие небитинилированных антител 7D9 и 22A10.

Результаты представлены на фиг. 14. Сигнал любого из девяти биотинилированных антител против мезотелина (\*) указывает на отсутствие конкуренции за первое антитело (максимальное связывание каждым биотинилированным антителом в отсутствие первого антитела для сравнения также показано в правой группе). 7D9 (называемое 7D9.5.2 на фиг. 14) является единственным антителом, которое не может связаться, когда 7D9 присутствует (т.е., оно конкурирует само с собой, второй столбец слева), в то время как 22A10 (называемое 22A10.1.2 на фиг. 14) связывается стандартно (черный столбец в левой группе). В свою очередь, когда 22A10 предварительно связан, 22A10 не может связаться (последний столбец средней группы), в то время как 7D9 и другие антитела могут. Таким образом, не только 7D9 и 22A10 не конкурируют друг с другом, но также каждый связывает эпитоп, отличный от других семи антител. 7D9 конкурировал сам с собой, но не с любым другим антителом (сравни каждый столбец с максимальным сигналом для каждого антитела, связывающего мезотелин на плашке в отсутствие ELISA покрытого антитела 7D9 или 22A10). Подобным образом, 22A10 только конкурировало само с собой и не с другими антителами, включая 7D9. Таким образом, 7D9 и 22A10 имеют различные эпитопы относительно друг друга и других выделенных моноклональных антител.

G. Картирование эпитопов, используя химеры мезотелина человек:мышь и яванский макак:человек, и мутационный анализ

Были выполнены эксперименты по пептидному картированию трипсином, в которых h7D9.v3 было связано с иммобилизованным мезотелином человека, который затем инкубировали с трипсином, и оставшиеся защищенные антителом пептиды были элюированы и идентифицированы масс-спектрометрией. Эти эксперименты вовлекали аминокислоты 133-183 SEQ ID NO:43 в качестве сайта связывания h7D9.v3. Для подтверждения этого участка, мы воспользовались 7D9, реагирующим с человеческим (конструкт #387, показанный на фиг. 15), но не с мышинным (конструкт #385) или яванского макака (конструкт #383) мезотелином, чтобы получить химеру, которая по нашим предположениям должна укладываться лучше укороченных мутантов. Мы сконструировали химеру мезотелина человек:мышь (#398 и #399), используя молчащий сайт MfeI (кодирующий QL) в позиции аминокислоты 131 и молчащий сайт BglII (кодирующий DL) в позиции аминокислоты 213 для встраивания последовательностей человека в мышинный конструкт. Кроме того, был создан конструкт яванского макака (#400), в котором аминокислоты 131-178 были заменены таковыми мезотелина человека посредством сайтов MfeI. Каждый конструкт имел N-концевую gD-метку (не показано) для проверки экспрессии.

gD-меченые, GPI-заякоренные конструкты мезотелина, показанные на фиг. 15, были временно экспрессированы в клетках 293 и окрашены 0,02 мкг/мл мышинным 7D9, 1 мкг/мл мышинным 22A10 или 1 мкг/мл антителом против gD-метки (для нормировки дифференциальных уровней экспрессии). После детекции антимышиным антителом Alexa 488, образцы были промыты и проанализированы FACS, и данные интенсивности флуоресценции были нормированы на сигнал анти-gD после вычитания любого фонового окрашивания на клетках 293 дикого типа, служащих в качестве отрицательного контроля. Как показано на фиг. 16, 7D9 связывается с химерой #399 человек:мышь (имеющая аминокислоты человека 1-213), но ни с полноразмерным мышинным мезотелином #385, ни с #398 (имеющим аминокислоты человека только с 1 по 131), указывая на то, что 7D9 связывает эпитоп между 131 и 213. Его способность связывать химеру 400 яванский макак:человек (имеющую аминокислоты человека 131-178), но не полноразмерную яванского макака (#383), сузила границы эпитопа между аминокислотами 131 и 178. (Заметьте, что относительно более низкий % связывания виден с участием 7D9, чем 22A10, вследствие использования в 50 раз более низкой концентрации антитела для 7D9).

Та же самая химера была использована для картирования крысиного, яванского макака и человеческого (но не мышинного) реактивного эпитопа 22A10. Связывание наблюдали на клетках, экспрессирующих химеру #399, но не #398. Таким образом, 22A10 связывается с эпитопом с имеющим ключевое зна-

чение аминокислотным остатком между аминокислотами 131-213 (фиг. 16).

Поскольку 7D9 и 22A10 не конкурируют друг с другом (фиг. 13), они вероятно связывают различные эпитопы в пределах аминокислот 131-213. Для идентификации этих различных эпитопов 2-4 аминокислотных участка мезотелина человека были мутированы с образованием соответствующих мышиных аминокислот в фоновой области химеры #399. Совмещение аминокислот 132-212 среди четырех видов показано на фиг. 17 с пронумерованными прямоугольниками, указывающими позицию 15 мутантов. Для каждого из 15 мутантов, перечисленных в табл. внизу фиг. 17, показаны последовательности человека (сверху), которые были мутированы в мышиные последовательности (внизу). (Заметьте: получение мутанта #11 не было успешно выполнено).

Все мутанты, за исключением мутанта #11 из фиг. 17, были экспрессированы в клетках 293 и подвергнуты анализу FACS, как на фиг. 16, за исключением того, что 5 мкг/мл гуманизированных версий каждого антитела (т.е., h7D9.v3, h22A10.v83 и h5B6 антитело против gD-метки (положительный контроль)) были использованы, с использованием антиантител человека Alexa488 для детекции. Результаты показаны на фиг. 18А с данными флуоресценции, представленные как процент сигнала анти-gD для нормировки уровней экспрессии. (Заметьте: мутант #17 не экспрессировался в клетках 293 и таким образом был исключен из набора данных). h7D9.v3 связывалось со всеми мутантами за исключением #6 и #9, в то время как h22A10.v83 связывало все мутанты, за исключением мутанта #15 (стрелки).

Путем совмещения различных видов мезотелина ключевые остатки в эпитопе h7D9.v3 были точно определены в виде двух единичных аминокислотных остатков, которые отличались между последовательностью человека и не являющейся перекрестно-реактивной последовательностью яванского макака: E153 в мутанте #6 и D174 в мутанте #9. Важность этих остатков для связывания антитела была подтверждена посредством мутирования эквивалентных остатков в мезотелине яванского макака на соответствующие аминокислотные остатки человека (например, R153 до E и G174 до D). h7D9.v3, которое в ином случае не связывается с мезотелином яванского макака, было способно связывать мутанты мезотелина яванского макака (фиг. 18В). Дополнительные исследования, в которых остаток E152 последовательно мезотелина человека был мутирован до Q, привели к ингибированию связывания h7D9.v3, предполагая, что остаток E152 также играет роль в связывании антитела.

На основании недавно предположенной армадилло-подобной повторяющейся структуры мезотелина (Sathyanarayana et al., BMC Structural Biology 9:1 (2009)), антитело 7D9, по-видимому, образует мостики между внутренним стеблем 4 и внешним стеблем 5 мезотелина. Аналогично, поскольку h22A10.v83 перекрестно реагирует с крысиной, но не с мышиной последовательностью, остаток E211 в мутанте #15 (во внешнем стебле 6, см. Sathyanarayana et al. выше), по-видимому, является критической детерминантой его эпитопа. Фиг. 19 отображает остатки, связанные h7D9.v3 и h22A10.v83.

Н. Связывание h7D9.v3 не ингибируется гликозилированием

Чтобы определить, связывается ли h7D9.v3 с гликозилированным мезотелином, his-меченый по С-концу мезотелин человека был экспрессирован в клетках CHO, очищен и дополнительно отделен в соответствии с зарядом на колонке Mono S в виде фракций с повышенным (фракция A11), средним (A12), низким (B1) и практически отсутствующим (B5) уровнем гликозилирования мезотелина, как показано окрашиванием кумасси бриллиантовым голубым в SDS-PAGE-геле. (фиг. 20, вверху слева). Каждая фракция была нанесена на чип с предварительно связанным h7D9.v3, и скорости ассоциации и скорости диссоциации были измерены для выявления идентичных аффинностей (1,5 нМ) для каждой фракции (фиг. 20, снизу слева), указывая на то, что связывание h7D9.v3 не ингибируется гликозилированием. Эти данные были подтверждены, демонстрируя, что h7D9.v3 может иммунопреципитировать все те же самые полосы, как гуманизированное анти-gD h5B6 антитело из клеток HT1080, стабильно экспрессирующих gD-мезотелин человека (в эпитопной метке gD которого отсутствуют сайты гликозилирования), указывая на то, что h7D9.v3 может иммунопреципитировать мезотелин человека независимо от состояния гликозилирования. Напротив, гуманизированное 22A10 предпочтительно иммунопреципитирует более низкомолекулярные виды (с ничтожным гликозилированием), указывая на то, что на связывание 22A10 влияет гликозилирование (фиг. 20, справа).

Чтобы оценить способность контрольного антитела связывать гликозилированный мезотелин по сравнению с h7D9.v3, был выполнен анализ FACS, в котором связывание контрольного антитела с клетками OVCAR3 сравнивается со связыванием h7D9.v3 с клетками OVCAR3. Подходящие вторичные антитела используются для определения связывания h7D9.v3 и контрольного антитела с клетками OVCAR3 (например, античеловеческие антитела Alexa 647 используются для определения связывания h7D9.v3).

I. Моноклональное антитело 19C3 блокирует взаимодействие MUC16 с мезотелином

Моноклональные антитела были протестированы с целью определить, способны ли они блокировать связывание MUC16 с мезотелином. Связывание очищенного биотинилированного фрагмента MUC16 (Muc16-Bt, имеющий три муциновых повтора) с мезотелином, стабильно экспрессирующимся в клетках A431 (которые в норме не экспрессируют мезотелин), показано на фиг. 21 ("без Ab"), левая панель. Предварительная инкубация клеток с 5-кратным молярным соотношением 19C3, но не 7D9, ингибировала связывание MUC16-Bt с мезотелином, что было определено FACS со стрептавидином-PE, как показано на фиг. 21, левая панель. Напротив, связывание рекомбинантного his8-меченого по С-концу

мезотелина (очищен из клеток 293) с клетками PC3, стабильно экспрессирующих MUC16 было оценено в отсутствие и в присутствии 5-кратного молярного избытка указанных антител против мезотелина (фиг. 21 правая панель), которые были детектированы способом FACS с антителами Alexa647-анти-his6. Предварительная инкубация мезотелина с 19C3, но не 7D9 или 22A10, ингибировала связывание мезотелина с экспрессирующими MUC16 клетками (фиг. 21, правая панель). Действительно, 7D9 и 22A10, по-видимому, усиливают связывание мезотелина с MUC16 в данном анализе.

#### J. Преобладание мезотелина человека в различных типах злокачественного новообразования

Экспрессия мезотелина человека в различных злокачественных опухолях была проанализирована, используя иммуногистохимию. Фиксированные в формалине, заключенные в парафин (FFPE) опухолевые микроматрицы (с одним 1 мм ядром на опухоль) протоочной аденокарциномы поджелудочной железы (фиг. 22), серозной аденокарциномы яичника (фиг. 23) и аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого (фиг. 24) были нарезаны на предметные стекла микроскопа, депарафинизированы и регидратировали посредством использования серии разведенного спирта. Срезы на предметных стеклах были предварительно обработаны для обнаружения антигена, используя Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark), экранированы, блокированы и окрашены 10 мкг/мл мышинным моноклональным антителом против мезотелина человека 19C3 в течение 60 мин в приборе автоматического окрашивания Dako autostainer. После промывки 19C3 детектировали биотинилированным антимышиным антителом с последующим применением комплекса ABC (VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) и визуализировали, используя DAB (Pierce Laboratories) в качестве хромогена. Затем срезы были докрашены гематоксилином Майера и обезвожены серией спиртов и ксилолов с последующим покрытием покровными стеклами с применением органической заливочной среды (PermaMount, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

Окрашивание мезотелина (коричневое) было выражено в баллах опытным патоморфологом в соответствии с приведенной ниже схемой, учитывая интенсивность (темный оттенок коричневого окрашивания), а также объем окрашивания. Репрезентативный пример каждого балла окрашивания мезотелина показан на фигурах 22-24 для каждого типа опухоли.

- 0 (отрицательный): очень слабое или никакого окрашивания в >90% опухолевых клеток;
- 1+ (слабое): преобладающий паттерн окрашивания является слабо выраженным;
- 2+ (умеренное): преобладающий паттерн окрашивания является умеренно выраженным в большинстве (>50%) неопластических клеток;
- 3+ (сильное): преобладающий паттерн окрашивания является чрезмерно выраженным в большинстве (>50%) неопластических клеток.

Фиг. 22 показывает, что 70% протоочных аденокарцином поджелудочной железы были положительными по мезотелину, демонстрируя окрашивание на уровне 1+ , 2+ или 3+, причем 33% демонстрировали окрашивание 2+ или 3+. На фиг. 23 показано, что 98% серозных аденокарцином яичника были положительными по мезотелину, причем 74% демонстрировали окрашивание на уровне 2+ или 3+. Кроме того, все восемь проанализированных метастазов из серозной аденокарциномы яичника были положительными по мезотелину, предполагая, что первичные опухоли яичника не утрачивают экспрессию мезотелина после метастазирования. На фиг. 24 показано, что 44% немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC, подтип - аденокарцинома) являются положительными по мезотелину, причем 26% демонстрируют окрашивание на уровне 2+ или 3+. Кроме того, три из восьми (38%) проанализированных соответствующих метастазов из положительных по мезотелину первичных опухолей NSCLC у пациента сохраняли положительное по мезотелину окрашивание.

Мезотелин также экспрессируется в мезотелиомах и раке эндометрия, как определено ИНС, используя антитело 19C3.

Экспрессия мезотелина у яванского макака также была изучена. Срезы мезотелия плевры легкого и перикарда сердца из человека (фиксированные в формалине, заключенные в парафин срезы) и из яванского макака (замороженные срезы) были нарезаны и окрашены моноклональным антителом 19C3 или моноклональным антителом 22A10 соответственно. Мезотелий человека специфически окрашивался антителом 19C3 (фиг. 25, слева), и мезотелий яванского макака специфически окрашивался антителом 22A10 (фиг. 25, справа). Эти результаты демонстрируют, что 22A10 может распознавать эндогенный мезотелин яванского макака, который имеет распределение, подобное таковому у человека.

#### K. Производство конъюгатов антитела против мезотелина-лекарственного препарата

Конъюгаты антитела против мезотелина-лекарственный препарат (ADC) были получены путем ковалентного связывания

h7D9.v3 и h22A10.v83 с содержащей линкер молекулой лекарственного препарата MC-vc-PAB-MMAE, которая представлена выше в разделе II.D. Для удобства, содержащую линкер молекулу лекарственного препарата MC-vc-PAB-MMAE по-другому называют в этих примерах и на фигурах "vcMMAE" или "VCE". (Например, h7D9.v3-MC-vc-PAB-MMAE называют в этих примерах и на фигурах как h7D9.v3-vcMMAE или h7D9.v3-VCE). До ковалентного связывания антитела были частично восстановлены с помощью TCEP, используя стандартные способы в соответствии с методологией, описанной в WO 2004/010957 A2. Частично восстановленные антитела образовывали ковалентную связь с линкер-

содержащей молекулой лекарственного препарата, используя стандартные способы в соответствии с методологией, описанной в статье Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 и US 2005/0238649 A1. Вкратце, частично восстановленные антитела были объединены с линкер-содержащей молекулой лекарственного препарата для обеспечения возможности образования ковалентной связи молекулы с цистеиновыми остатками. Реакции образования ковалентной связи были остановлены, и ADC были очищены. Нагрузка лекарственным препаратом (среднее число молекул лекарственного препарата на одно антитело) для каждого ADC была определена и ее значения находились в диапазоне от 3,33 до 4,0 во всех случаях.

#### L. Эффективность h7D9.v3-vcMMAE в in vivo модели HPAC

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE была исследована, используя модель ксенотрансплантата аденокарциномы поджелудочной железы. Пять миллионов клеток HPAC (положительных по мезотелину (2+) согласно ИНС с использованием 19C3) в HBSS были инъецированы подкожно в мышей SCID с врожденным отсутствием клеток-киллеров, и в опухоли были введены дозы h7D9.v3-vcMMAE в концентрации 1,1, 2,7, 5,5, 11 и 16,4 мг/кг (при 3,5 MMAE/антитело) или h5B6 анти-gD-vcMMAE в концентрации 5, 10 и 15 мг/кг (с 3,3 MMAE на антитело) или 15 мг/кг незащищенного h7D9.v3 (без MMAE). Как показано на фиг. 26 значительное ингибирование опухолевого роста было достигнуто при 5,5 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE, и регрессия опухоли была достигнута при 11-16 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE, но никаких значимых эффектов не наблюдали при введении незащищенного антитела или контрольного gD-vcMMAE в дозе 15 мг/кг. Показан смоделированный подбор кривых, основанных на общей скорости роста. На нижней правой панели фиг. 26 представлен анализ FACS и интернализация h7D9.v3 в клетках HPAC и ИНС.

#### M. Эффективность h7D9.v3-vcMMAE в модели первичной аденокарциномы поджелудочной железы

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE была исследована в модели первичной аденокарциномы поджелудочной железы (Oncotest, GMBH, Germany). Куски положительных по мезотелину первичных опухолей поджелудочной железы человека (экспрессирующих мезотелин на уровне 1-2+ согласно ИНС) были имплантированы подкожно в самок бестимусных мышей NMRI, которым вводили дозы h7D9.v3-vcMMAE в концентрации 5, 10 и 20 мг/кг (3,5 MMAE/антитело). На фиг. 27 отложены средние значения объема опухоли  $\pm$  стандартное отклонение. Значительное ингибирование опухолевого роста было обнаружено при всех дозах h7D9.v3-vcMMAE. ИНС первичной опухоли поджелудочной железы показана справа.

#### N. Эффективность h7D9.v3-vcMMAE в модели рака яичника

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE была исследована, используя модель ксенотрансплантата рака яичника. Миллион клеток OvCar3 $\times$ 2.1 (положительных по мезотелину (2-3+) согласно ИНС с использованием 19C3) были инъецированы в скопление жировой ткани молочной железы мышей CB17 SCID с врожденным отсутствием клеток-киллеров, которым последовательно вводили дозы 1, 2,5, 5, 10 и 15 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE (3,5 MMAE/антитело) или h5B6 анти-gD-vcMMAE (3,3 MMAE/антитело). Как показано на фиг. 28, умеренную активность наблюдали при 2,5 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE и регрессию опухоли - при 5 мг/кг и выше, в то время как анти-gD-vcMMAE не проявляло активность в дозе ниже 5 мг/кг (только умеренная активность - при 10 мг/кг и остановка роста опухоли - при 15 мг/кг). Показан смоделированный подбор кривых, основанных на общей скорости роста. На правой панели фиг. 28 представлен анализ FACS и интернализация h7D9.v3 в клетках OvCar3 $\times$ 2.1 и ИНС.

#### O. Эффективность h7D9.v3-vcMMAE в модели рака легкого

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE была исследована, используя модель ксенотрансплантата рака легкого (плоскоклеточной карциномы). Пять миллионов клеток H226 $\times$ 2 (положительных по мезотелину (3+) согласно ИНС) были инъецированы в смеси 50:50 Matrigel:HBSS в подвздошную область мышей CB17 SCID. На фиг. 29 отложены средние значения объема опухоли  $\pm$  стандартное отклонение. Обнаружена умеренная активность h7D9.v3-vcMMAE (3,5 MMAE/антитело) в дозе 5 мг/кг и остановка опухолевого роста при 10 мг/кг, в то время как не было выявлено никакой значимой активности контрольного конъюгата анти-gD-vcMMAE (3,97 MMAE/антитело) в любой дозе. На правой панели фигуры 29 представлен анализ FACS и интернализация h7D9.v3 в клетках H226 $\times$ 2 и ИНС.

#### P. h7D9.v3-vcMMAE и h22A10.v83-vcMMAE обладают сходными эффективностями

Была исследована эффективность h7D9.v3-vcMMAE в сравнении с h22A10.v83-vcMMAE. Двадцать миллионов клеток BJAB, стабильно экспрессирующих либо gD-мезотелин человека (слева) или gD-мезотелин яванского макака (справа), были инокулированы подкожно мышам CB17 SCID в буфере HBSS. Мышам вводили дозы 0,5 или 2 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE (мышам, которым инокулировали BJAB-gD-мезотелин человека) или h22A10.v83-vcMMAE (мышам, которым инокулировали BJAB-gD-мезотелин яванского макака) или 2 мг/кг анти-gD-vcMMAE, используемого в качестве положительного контроля и для нормировки любых различий в экспрессии между двумя видами клеточной линии. На фиг. 30 отложены средние значения объема опухоли  $\pm$  стандартное отклонение. Как h7D9.v3-vcMMAE, так и h22A10.v83-vcMMAE проявляли лучшую активность в дозе 2 мг/кг по сравнению с контролем gD-vcMMAE в отношении действия на BJAB-gD-мезотелиновой опухоли человека и BJAB-gD-мезотелиновой опухоли яванского макака соответственно. Отрицательным контролем в этом эксперименте бы-

ло не имеющее к данному воздействию антитело, конъюгированное с vcMMAE, которое не проявляло никакой значимой активности.

Для дальнейшей оценки активности h22A10.v83-vcMMAE, в опухоли H226×2 фиг. 29 и в опухоли OvCar3×2.1, выращенные как описано на фиг. 28, вводили дозы с указанными концентрациями h7D9.v3-vcMMAE и h22A10.v83-vcMMAE (3,53 MMAE/антитело), или anti-gD-vcMMAE в качестве отрицательного контроля. На фиг. 31 отложены средние значения объема опухоли ± стандартное отклонение. Несмотря на значительно более слабое связывание незащищенного h22A10.v83 по сравнению с h7D9.v3 с обеими этими клеточными линиями согласно FACS анализу, h22A10.v83-vcMMAE обладало схожей с h7D9.v3-vcMMAE эффективностью в модели H226×2 (верхняя левая панель) и лишь немного меньшей активностью в модели OvCar3×2.1 (верхняя правая панель), на что указывает более быстрая регрессия опухолей после введения дозы 6 мг/кг.

Q. MUC16 и мезотелин образуют комплекс на «положительных по двум антигенам» клеточных линиях

Было исследовано взаимодействие MUC16 и мезотелина на клеточных линиях. Клетки OvCar3, которые экспрессируют мезотелин и MUC16, были лизированы в 1% буфере NP40. Как показано на фиг. 32, левой панели, лизаты были иммунопреципитированы под действием m7D9 или изотипным контрольным IgG и проанализированы Вестерн-блоттингом с использованием антител против MUC16 (верхний блот) или h7D9 (нижний блот) для выявления комплексов мезотелин:MUC16 или общего мезотелина соответственно. (20% неиммунопреципитированного нанесенного лизата показано в левой лунке). m7D9 было способно совместно иммунопреципитировать MUC16 с мезотелином из лизатов клеток OvCar3. Эти данные демонстрируют, что MUC16 образует комплекс с мезотелином в клеточных линиях, которые экспрессируют как мезотелин, так и MUC16 (т.е. являются "положительными по двум антигенам" клеточными линиями).

Как показано на фиг. 32, правой панели, антитела либо к мезотелину, либо к MUC16 были использованы для иммунопреципитации (IP) этих белков из кондиционированных сред, в которых культивировали указанные клеточные линии. Клеточные линии экспрессировали только мезотелин (HPAC), только MUC16 (A431), ни один из данных антигенов (H520) или оба данных антигена (OvCar3, CAPAN-2, EKVX и OvCar429 клетки). Либо химерное антитело против мезотелина ch7D9 (верхняя и нижняя панели), либо антитела против MUC16 (средняя панель) были использованы для иммунопреципитации. Промытые иммунопреципитаты были проанализированы способом Вестерн-блоттинга (WB) с использованием мышиного антитела против мезотелина 2E5 (верхняя панель) или мышиным антителом 1.B.823 против B-домена MUC16 (Mil-подобного) (US Biological, Swampscott, MA; средняя и нижняя панели). Соответственно на верхней панели продемонстрирован иммунопреципитированный мезотелин из клеточных линий, которые экспрессируют мезотелин, на средней панели продемонстрирован иммунопреципитированный MUC16 из клеточных линий, которые экспрессируют MUC16, и на нижней панели продемонстрированы совместно иммунопреципитированные комплексы мезотелин:MUC16, которые специфичны для клеточных линий, экспрессирующих оба белка, (положительных по двум антигенам клеточных линий). Эти результаты указывают на то, что мезотелин может выделяться в среду в связанном с MUC16 виде. Соответственно антитела и иммуноконъюгаты по изобретению пригодны для лечения положительного по мезотелину злокачественного новообразования, включая положительные по двум антигенам злокачественные опухоли.

R. 19C3, но не 7D9, вытесняет предварительно связанный с мезотелином MUC16

Было исследовано связывание 19C3 с мезотелином в присутствии MUC16. MUC16-биотин (1 мкг/мл, или 9,2 нМ) был предварительно связан с клетками HT1080, экспрессирующими мезотелин. 19C3 (5 мкг/мл) было добавлено, чтобы определить может ли оно вытеснить предварительно связанный MUC16. MUC16-биотин выявляли с помощью реагента детекции SAPE, и связанное антитело выявляли с помощью антимиошиного антитела Alexa488. На фиг. 33 показано, что 19C3 действительно способно вытеснить MUC16 и связаться с мезотелином. Антитело 7D9 (33 нМ), которое связывается с участком мезотелина вне сайта связывания MUC16, было использовано в качестве отрицательного контроля и, как и ожидалось, не было способно вытеснить предварительно связанный MUC16. Дополнительные эксперименты показали, что 19C3 также вытесняет MUC16 в концентрации 0,1 мкг/мл, в то время как антитело 2E5 может вытеснять MUC16 только при концентрации ≥5 мкг/мл (данные не представлены).

Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров с целью исключения двусмысленного толкования, описания и примеры не следует истолковывать как ограничение объема данного изобретения. Публикуемые сведения обо всех патентах и научной литературе, цитируемых в настоящем документе, намеренно включены в качестве ссылок в полном объеме.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.; F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; Mark DENNIS; Suzanna J. SCALES; Susan D. SPENCER; Yin ZHANG

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ МЕЗОТЕЛИНА И ИММУНОКОНЪЮГАТЫ

<130> P4532R1-WO

<140>

<141>

<150> 61/459,962

<151> 2010-12-20

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105			

<210> 2

<211> 113

<212> Белок

<213> Mus sp.

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln  
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 3

<211> 113

<212> Блок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептид

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln  
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 4

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser
		20						25					30		

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
	35						40					45			

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	His	Gln
			85						90					95	

Tyr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100						105					110		

Arg

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

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

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



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

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

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

<210> 6  
 <211> 115  
 <212> Белок  
 <213> Mus sp.

<400> 6  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser  
 115

<210> 7  
 <211> 115  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 7

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

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

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

Gly	Tyr	Ile	Arg	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

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

Thr	Val	Ser
		115

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 8

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

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

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

Gly	Tyr	Ile	Arg	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

028744

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser  
115

<210> 9

<211> 108

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 10

<211> 97

<212> Бeлoк

<213> Mus sp.

<400> 10

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

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
20 25 30

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
 35 40 45

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
 50 55 60

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 85 90 95

Arg

<210> 11

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 полипептид

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 12

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

&lt;400&gt; 12

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35						40				45			

Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105			

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

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

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

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

Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

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

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

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

Ser

<210> 14

<211> 117

<212> Белок

<213> Mus sp.

<400> 14

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 15

<211> 117

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 полипептид

<400> 15

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 16

<211> 117

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 полипептид

<400> 16

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17  
<211> 17  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 17  
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 18  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 18  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 19  
<211> 8  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 19  
His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 10  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 20  
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His  
1 5 10



<210> 21  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 21  
 Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 1 5 10 15

Lys Asp

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 22  
 Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 23  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 23  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 24  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 24  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 25  
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 26  
 <211> 32  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 26  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 27  
 <211> 32  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 27  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
 20 25 30

<210> 28  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 25  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 29  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20 25

<210> 30  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 30  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 30  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 31  
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

&lt;400&gt; 32

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 пептид

&lt;400&gt; 33

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 пептид

&lt;400&gt; 34

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 пептид

&lt;400&gt; 35

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
 пептид

&lt;400&gt; 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 18

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 37

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 38

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 38

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

<210> 39

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 39

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 40

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 41

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

&lt;400&gt; 41

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 622

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 42

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln  
 20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu  
 35 40 45

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

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu  
 65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu  
 85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro  
 100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro  
 115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile  
 130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln  
 145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu  
 165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu  
 180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu  
 195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg  
 210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp  
 225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly  
 245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg  
 260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile  
 275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser  
 290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys  
 305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met  
 325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu  
 340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val  
 355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile  
 370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu  
 385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp  
 405 410 415

Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr  
 420 425 430

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu  
 435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp  
 450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala  
 465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile  
 485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser  
 500 505 510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr  
 515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly  
 530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg  
 545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu  
 565 570 575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser  
 580 585 590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro  
 595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
 610 615 620

<210> 43

<211> 285

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile  
 1 5 10 15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
 20 25 30



Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro  
 35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
 50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
 85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met  
 100 105 110

Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly  
 115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly  
 130 135 140

Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser  
 145 150 155 160

Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg  
 165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met  
 180 185 190

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala  
 195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp  
 210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr  
 225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys  
 245 250 255

Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg  
 260 265 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
 275 280 285

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 630

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln  
 20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu  
 35 40 45

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

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu  
 65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu  
 85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro  
 100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro  
 115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile  
 130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln  
 145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu  
 165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu  
 180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu  
 195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg  
 210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp  
 225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly  
 245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg  
 260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile  
 275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser  
 290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys  
 305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met  
 325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu  
 340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val  
 355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile  
 370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu  
 385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu  
 405 410 415

Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln  
 420 425 430

Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr  
 435 440 445

Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser  
 450 455 460

Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln  
 465 470 475 480

Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn  
                   485                                  490                                  495

Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro  
                   500                                  505                                  510

Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu  
                   515                                  520                                  525

Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val  
                   530                                  535                                  540

Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala  
 545                                  550                                  555                                  560

Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln  
                                   565                                  570                                  575

Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn  
                   580                                  585                                  590

Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr  
                   595                                  600                                  605

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu  
                   610                                  615                                  620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
 625                                  630

<210> 45

<211> 293

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 45

Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile  
 1                                  5                                  10                                  15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
                   20                                  25                                  30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro  
                   35                                  40                                  45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
                   50                                  55                                  60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met  
100 105 110

Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp  
130 135 140

Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu  
145 150 155 160

Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln  
165 170 175

Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys  
180 185 190

Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys  
195 200 205

Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu  
210 215 220

Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg  
225 230 235 240

Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu  
245 250 255

Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val  
260 265 270

Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly  
275 280 285

Leu Gly Leu Gln Gly  
290

<210> 46

<211> 285

<212> Белок

<213> *Macaca fascicularis*

&lt;400&gt; 46

Asp Val Glu Arg Thr Thr Cys Pro Pro Glu Lys Glu Val His Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Arg Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Gln Met Asp Arg Val Asp Ala Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Arg His Leu Gly His Leu  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly His Glu Met  
100 105 110

Ser Ala Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Val Val Val Gly Arg Gly  
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly  
130 135 140

Cys Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser  
145 150 155 160

Val Ile Gly Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg  
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met  
180 185 190

Ser Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala  
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp  
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Arg Glu Ala Val Leu Pro Leu Thr  
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys  
245 250 255

Val Glu Glu Gln His Ser Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Lys Gln Arg  
260 265 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
275 280 285

<210> 47

<211> 285

<212> Белок

<213> Rattus sp.

<400> 47

Asp Thr Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Asn Val Val  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Gly Thr Leu Leu Ala Gly Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Lys Gln Leu Gly His Phe  
65 70 75 80

Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile Arg Gln Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Pro Asp Thr Val Asn Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met  
100 105 110

Asp Ala Gln Val Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly  
115 120 125

Lys Leu Asp Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser  
130 135 140

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser  
145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg  
165 170 175

His Leu Gly Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val

180	185	190
Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala		
195	200	205
Ser Arg Glu Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp		
210	215	220
Ile Ala Thr Phe Lys Lys Leu Gln Val Asp Ala Leu Val Gly Leu Ser		
225	230	235
Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Ile Gly Asp Leu Lys		
	245	250
Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln Gln		
	260	265
Gln Lys Asp Leu Asp Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly		
	275	280
		285
<210> 48		
<211> 285		
<212> Белок		
<213> Mus sp.		
<400> 48		
Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val		
1	5	10
Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val		
	20	25
		30
Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro		
	35	40
		45
Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr		
	50	55
		60
Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe		
	65	70
		75
Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser		
	85	90
		95
Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met		
	100	105
		110
Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly		
	115	120
		125



Gln Leu Asp Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser  
 130 135 140

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser  
 145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg  
 165 170 175

His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val  
 180 185 190

Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala  
 195 200 205

Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp  
 210 215 220

Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser  
 225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys  
 245 250 255

Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His  
 260 265 270

Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
 275 280 285

<210> 49

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая  
 метка 8xHis

<400> 49

His His His His His His His His

1

5

<210> 50

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая

метка 6xHis

&lt;400&gt; 50

His His His His His His

1 5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 51

Glu Val Glu Lys

1

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 52

Asp Ala Glu Gln

1

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Macaca fascicularis

&lt;400&gt; 53

Asp Val Glu Arg

1

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 54

Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys

1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp

20 25 30

Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp

35 40 45

Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser

50 55 60

Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu

65 70 75 80

Asp

<210> 55  
 <211> 81  
 <212> Белок  
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 55  
 Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly Cys Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Val Ile Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg Gln Leu Asp  
 35 40 45  
 Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu  
 65 70 75 80

Asp

<210> 56  
 <211> 81  
 <212> Белок  
 <213> *Rattus sp.*

<400> 56  
 Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser Val Met Trp  
 20 25 30  
 Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly  
 35 40 45  
 Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Arg Glu  
 65 70 75 80

Asp

<210> 57  
 <211> 81  
 <212> Белок  
 <213> Mus sp.

<400> 57  
 Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys  
 1 5 10 15

Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp  
 20 25 30

Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly  
 35 40 45

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

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

Asp

<210> 58  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 58  
 Lys Asp Thr Leu  
 1

<210> 59  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Mus sp.

<400> 59  
 Glu Asp Met Val  
 1

<210> 60  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 60  
 Thr Ala Phe Tyr  
 1

<210> 61  
 <211> 4

<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 61  
Gly Asp Ile Pro  
1

<210> 62  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 62  
Glu Glu Leu Ser  
1

<210> 63  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 63  
Gln Asp Leu His  
1

<210> 64  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 64  
Pro Ser Ser Ile  
1

<210> 65  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 65  
Ser Ser Val Met  
1

<210> 66  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 66  
Thr Cys Asp Pro  
1

<210> 67  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 67  
Lys Cys Ser Gln  
1

<210> 68  
<211> 5  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 68  
Gln Leu Asp Val Leu  
1 5

<210> 69  
<211> 5  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 69  
His Leu Gly Leu Leu  
1 5

<210> 70  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 70  
Met Asn Gly Ser  
1

<210> 71  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

<400> 71  
Val Ser Gly Leu  
1

<210> 72  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 72  
Pro Thr Glu Asp  
1

<210> 73  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Mus sp.

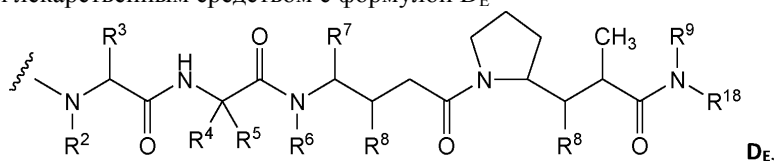
<400> 73  
Ser Thr Lys Asp  
1

<210> 74  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Mus sp.

<400> 74  
 Ser Val Lys Asp  
 1

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с мезотелином, где антитело содержит:
  - (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20,
  - (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21,
  - (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22,
  - (iv) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17,
  - (v) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и
  - (vi) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.
2. Антитело по п.1, которое является моноклональным антителом.
3. Антитело по п.1, которое является антителом человека, гуманизированным или химерным антителом.
4. Антитело по п.1, которое является фрагментом антитела, который связывает мезотелин.
5. Антитело по п.1, где мезотелин является мезотелином человека SEQ ID NO:43.
6. Антитело по п.1, которое связывает эпитоп SEQ ID NO:43, содержащий E153 и D174 в соответствии с нумерацией SEQ ID NO:43, и которое в некоторых случаях обладает одним или несколькими приведенными ниже характерными свойствами:
  - (a) не проявляет сниженного связывания с гликозилированными формами мезотелина по сравнению с негликозилированными формами мезотелина;
  - (b) не блокирует связывание мезотелина с муцином 16 (MUC16) и/или
  - (c) связывает мезотелин с аффинностью, которая меньше и равна 5 nM.
7. Антитело по п.6, где антитело не блокирует связывание мезотелина с MUC16.
8. Антитело по п.7, где антитело не блокирует связывание гликозилированных форм мезотелина с MUC16 по сравнению с негликозилированными формами мезотелина.
9. Антитело по п.6, где антитело не проявляет сниженного связывания с гликозилированными формами мезотелина по сравнению с негликозилированными формами мезотелина.
10. Антитело по п.1, в котором вариативный домен легкой цепи содержит последовательность кармашка участка FR2 SEQ ID NO:25 и последовательность FR3 SEQ ID NO:27.
11. Антитело по п.1, где антитело содержит:
  - (a) последовательность VH, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8;
  - (b) последовательность VL, которая по крайней мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4; или
  - (c) последовательность VH, как в (a), и последовательность VL, как в (b).
12. Антитело по п.1, содержащее последовательность VH SEQ ID NO:8.
13. Антитело по п.1, содержащее последовательность VL SEQ ID NO:4.
14. Антитело, которое связывается с мезотелином, содержащее последовательность VH SEQ ID NO:8 и последовательность VL SEQ ID NO:4.
15. Антитело по п.1, которое является IgG1, IgG2a или IgG2b антителом.
16. Иммуноконъюгат с формулой Ab-(L-D)<sub>p</sub>, где:
  - (a) Ab является антителом по п.1;
  - (b) L является линкером;
  - (c) D является лекарственным средством с формулой D<sub>E</sub>



и где R<sup>2</sup> и R<sup>6</sup>, каждый, являются метилом,  
 R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup>, каждый, являются изопропилом,

$R^5$  является H,

$R^7$  является втор-бутилом,

каждый  $R^8$  независимо выбран из  $CH_3$ ,  $O-CH_3$ ,  $OH$  и  $H$ ;

$R^9$  является H;

$R^{18}$  представляет собой  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арил;

(d) p принимает значения от 1 до 8.

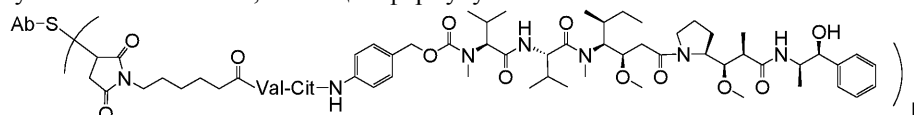
17. Иммуноконъюгат по п.16, где лекарственным средством является ауристатин.

18. Иммуноконъюгат по п.17, где лекарственным средством является монометилауристан Е (ММАЕ).

19. Иммуноконъюгат по п.16, где линкер способен к расщеплению протеазой.

20. Иммуноконъюгат по п.19, где линкер содержит дипептид val-cit.

21. Иммуноконъюгат по п.16, имеющий формулу



где S является атомом серы.

22. Иммуноконъюгат по п.21, где p принимает значения от 2 до 5.

23. Иммуноконъюгат по п.21, содержащий антитело по п.6.

24. Иммуноконъюгат по п.21, содержащий антитело по п.14.

25. Фармацевтическая композиция для диагностики и лечения состояний, связанных с мезотелином, содержащая иммуноконъюгат по п.16 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, дополнительно содержащая терапевтическое средство, используемое для лечения состояний, связанных с мезотелином.

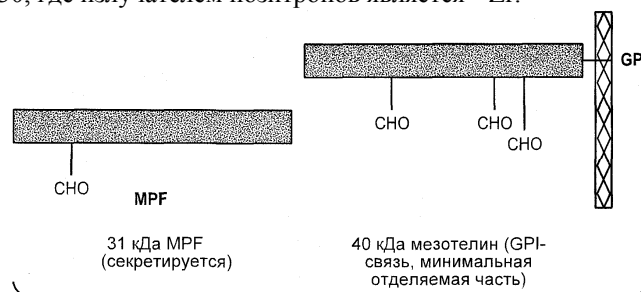
27. Фармацевтическая композиция по п.26, где дополнительным терапевтическим средством является гемцитабин.

28. Фармацевтическая композиция по п.26, где дополнительным терапевтическим средством является анти-MUC16 антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом.

29. Антитело по п.1, дополнительно конъюгированное с меткой.

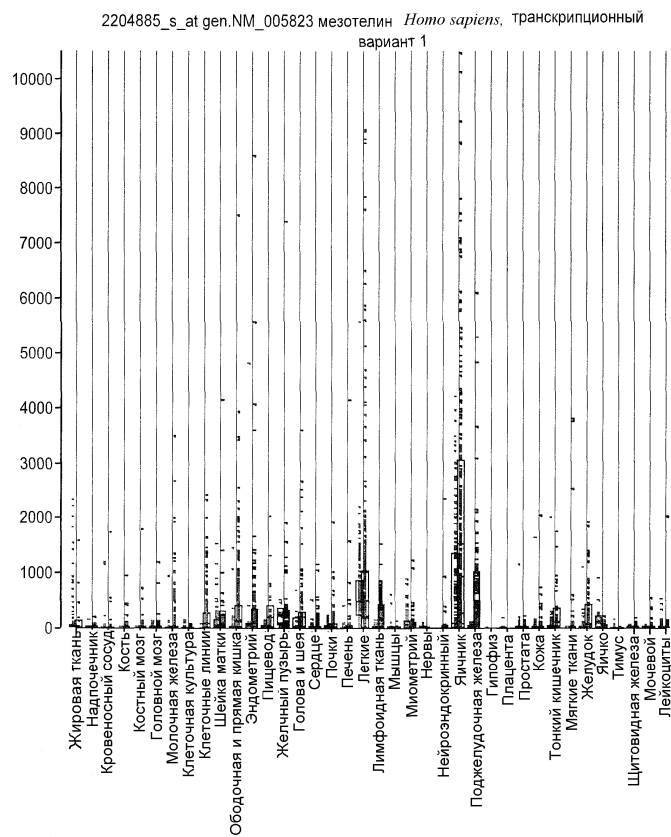
30. Антитело по п.29, где меткой является излучатель позитронов.

31. Антитело по п.30, где излучателем позитронов является  $^{89}Zr$ .



Фиг. 1





Фиг. 2  
Моноклональные антитела против мезотелина

mAb	Изотип	Группа эпитопа	Участок эпитопа	Блокирует связывание тис16?	Kd (нМ) Biacore
7D9	G1	A	152-175	Усиливает	0.23
19C3	G2b	C	1-70	Да	0.06
2E5	G2	C	1-70	Да	0.49
8B11	G1	B1	71-131	Нет	138
17A5	G1	B1	71-131	Нет	Не определено
11H8	G2b	B1	71-131	Нет	Не определено
16D5	G2a	B2	71-131	Усиливает	2.21
18D12	G2b	B3	131-178	Нет	Не определено
3H2	G1	B	71-131	Усиливает	Не определено
22A10	G2a	D	209-212	Усиливает	4.25
15F7	G2a	E	1-131	Нет	Не определено
12F6	G2a	E	Не определено	Не определено	780

Фиг. 3



Фиг. 4



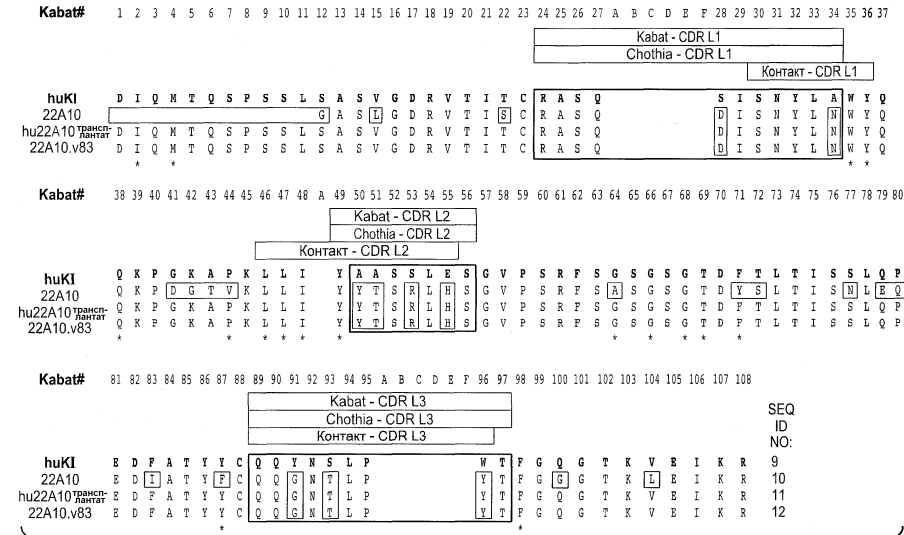
Фиг. 5

## Химерные и гуманизированные варианты 7D9

	LC	HC	KD (нМ) в отношении MSLN человека
Химерное 7D9	Химерная	Химерная	1.84
7D9.v1	V <sub>KI</sub> трансплантат	VH <sub>АТА</sub> трансплантат	3.98
7D9.v2	Y36F, Y87F	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S и L80M	1.78
7D9.v3	Y36F, Y87F	VH <sub>АТА</sub> трансплантат	1.9
7D9.v4	V <sub>KI</sub> трансплантат	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S и L80M	3.01
7D9.v5	Y36F	VH <sub>АТА</sub> трансплантат	3.49
7D9.v6	Y87F	VH <sub>АТА</sub> трансплантат	4.08

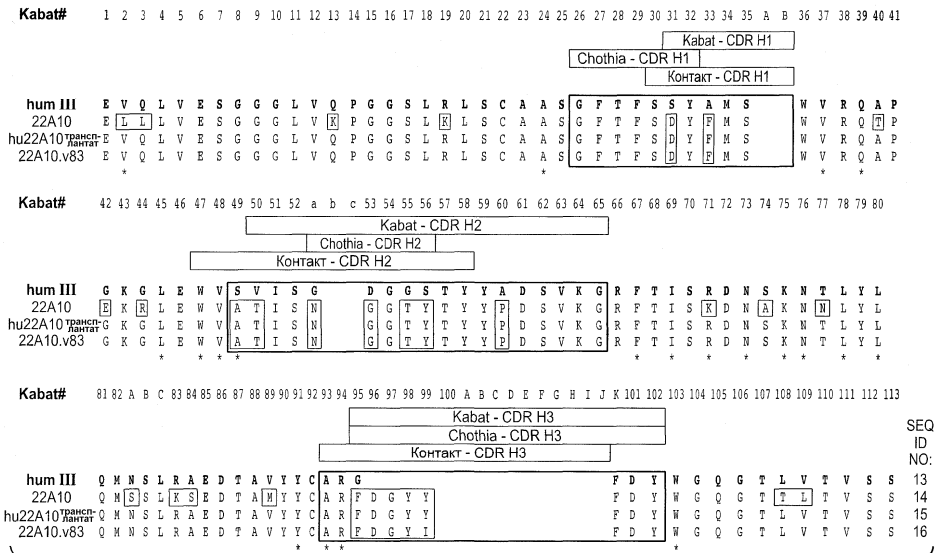
Фиг. 6

## Совмещение переменных участков легкой цепи (мышинное и гуманизированное 22A10)



Фиг. 7

## Совмещение переменных участков тяжелой цепи (мышинное и гуманизированное 22A10)

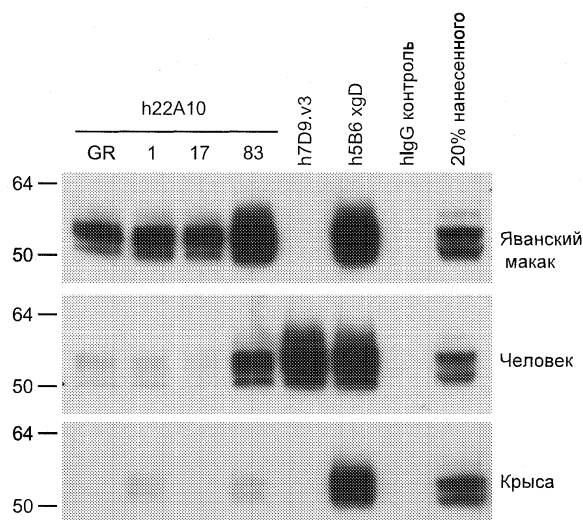


Фиг. 8

Анализ Скэтчарда гуманизированных вариантов 22A10 на стабильных клетках  
BJAB, трансфицированных gD-мезотелином

Присоединенные к			Яванский макак		Яванский макак +человек		Яванский макак	
версия h2A10	Трансплантат нМ	Сайты трансплантата	v1 нМ	v1 сайты	v17 нМ	v17 сайты	v83 нМ	v83 сайты
BJAB яванского макака	1.0	25000	1.0	21000	1.0	25000	1.3	45000
BJAB человека	1.6	18000	1.9	16000	1.7	17000	1.8	31000
BJAB крысы	1.9	22400	2.8	15000	3.9	24000	2.7	31000

Фиг. 9A



Фиг. 9B

Участок гуманизированного антитела 7D9	Последовательность	SEQ ID NO:
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L1	KSSQSVLYSSNQKNYLA	17
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L2	WASTRES	18
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L3	HQYLSSYT	19
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H1	GYTFTTYWMH	20
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H2	GYRPSSTGYTEYNQKFKD	21
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H3	ARSRWLLDY	22
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h7D9.v1 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h7D9.v3 VL-FR2	WFQQKPGKAPKLLIY	25
h7D9.v1 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	26
h7D9.v3 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFC	27
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	31
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR4	WGQGTLLTVTS	32

Фиг. 10A

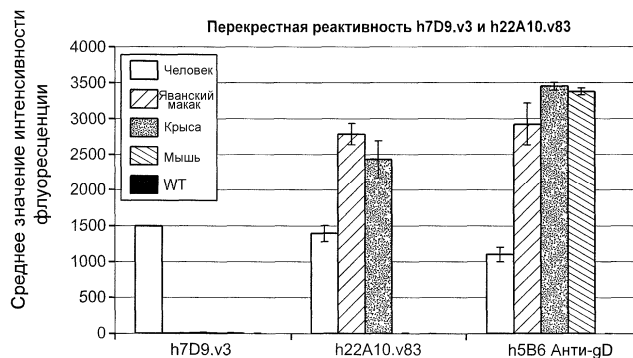
Участок гуманизированного антитела 22A10	Последовательность	SEQ ID NO:
h22A10 транс-платат h22A10.v83 HVR-L1	RASQDISNYLN	33
h22A10 транс-платат h22A10v.83 HVR-L2	YTSRLHS	34
h22A10 транс-платат h22A10v.83 HVR-L3	QQGNTLPYT	35
h22A10 транс-платат h22A10v.83 HVR-H1	GFTFSDYFMS	36
h22A10 транс-платат h22A10v.83 HVR-H2	ATISNGGTYTYPDSVKG	37
h22A10 транс-платат HVR-H3	ARFDGYIFYDY	38
h22A10v.83 HVR-H3	ARFDGYIFYDY	39
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	26
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VH-FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	40
h22A10 транс-платат h22A10.v83 VH-FR4	WGQGTLLTVSS	41

Фиг. 10B

## Гомология последовательности мезотелина среди различных видов

Секвенция	Человек	Шимпанзе-яванский маймак	Крыса	Мышь
1	E V E K T A C P S G K K A R E I D E S L I F Y Q K K W E L E A C V D A A L L A T Q M D R V V N A I P F F T	50		
1	D V E R T C P P G K E V H V I D E N L I F Y Q K K R E L E A C V D A A L L A A Q M D R V V N A I P F F T	50		
1	D B E T Q K A C P P G K E V H V I D E N L I F Y Q N W E L E A C V D G T L L A A Q M D L R V V N A I P F F T	50		
1	D A E Q K A C P P G K E P Y K V D E D L I F Y Q N W E L E A C V D G T M L A R Q M D L V N E I P F F T	50		
51	Y E Q L D V L K H K L D E L Y P Q G Y P E S V I T Q H L G Y L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L	100		
51	Y E Q L D V L K H K L D D E L Y P Q G Y P E S V I R H L G H L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L	100		
51	Y E Q L S I F K H K L D K E L Y P Q G Y P E S L I Q Q L G H F F R Y V S P E D I H Q W N V T S L E T V	100		
51	Y E Q L S I F K H K L D K T Y P Q G Y P E S L I Q Q L G H F F R Y V S P E D I H Q W N V T S P D T V	100		
101	K A L L E V N K G H E M S P Q V A T L I D R F V K G R G Q L D K D T L D T L T A F Y P G Y L C S L S	150		
101	K A L L K V S K G H E M S A Q V A T L I D R V V V G R G Q L D K D T L D T L T A F C P G C L C D F S	150		
101	N L L K V S K G G K M A Q V I A L I D R A C Y L G G G K L D E D I V K A L D N I P L S Y L C D F S	150		
101	K T L L K V S K G Q K M A Q V I A L I V A C Y L R G G G Q L D E D I M V K A L G D I P L S Y L C D F S	150		
151	P E E L S S V P P S S I W A V R P Q D L D T C D P R Q L D V L Y P K A R L A F Q N M N G S E Y F V K	200		
151	P E R L L S V P P S S V M G W L V G L H Q D L D T C G P R H L D V L Y P K A R L A F Q N M S G S E Y F V K	200		
151	P Q D L H A I P S S V M G W L V G L H Q D L D K C S Q R H L G L Y Q K A C S A F Q N V S G L E Y F E K	200		
151	P Q D L H S V P S S V M W L V G P Q D L D K C S Q R H L G L Y Q K A C S A F Q N V S G L E Y F E K	200		
201	I Q S F L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R T D A V L P L T V A E V Q K L L G P	250		
201	I R P F L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R R A V L P L T V A E V Q K L L G P	250		
201	I R T F L G G A S R E D L R A L S Q H N V S M D I A T F K K L Q V D A L V G L S V A E V Q K L L G P	250		
201	I R T F L G G A S V K D L R A L S Q H N V S M D I A T F K R L Q V D S L V G L S V A E V Q K L L G P	250		
251	H V E G L K A E E R H R P V R D W I L R Q R Q D D L D T L G L G L G Q	285		
251	H V E G L K V E E Q H S P V R D W I L K Q R Q D D L D T L G L G L G Q	285		
251	H I G D L K T E E D K S P V R D W L F R Q Q Q K D L D S L G L G L G Q	285		
251	N I G D L K T E E D K S P V R D W L F R O H Q K D L D S L G L G L G Q	285		

ФИГ. 11



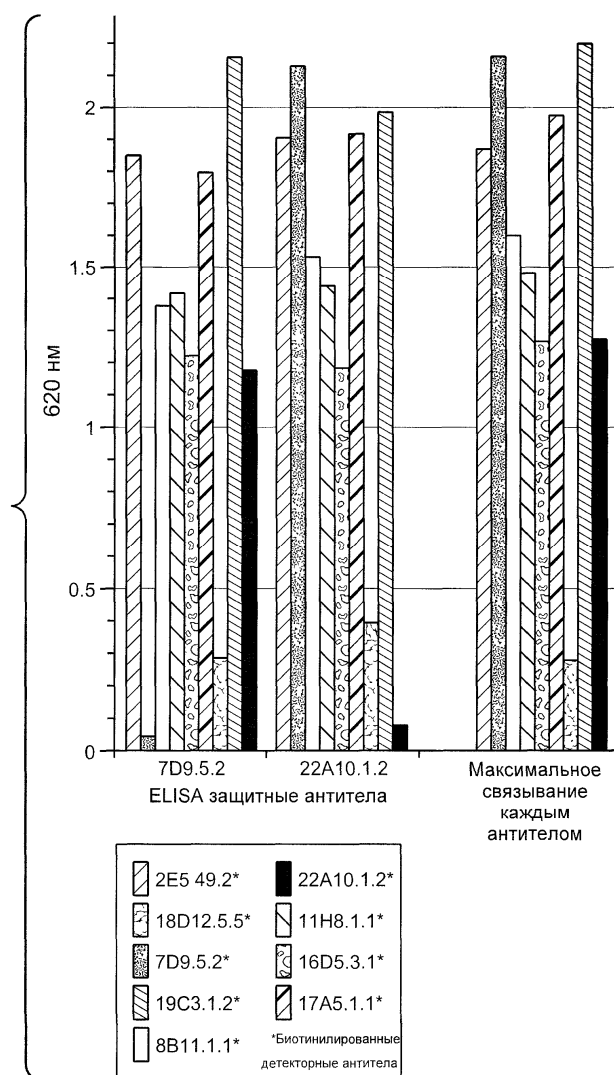
ФИГ. 12

### Аффинность антитела против мезотелина

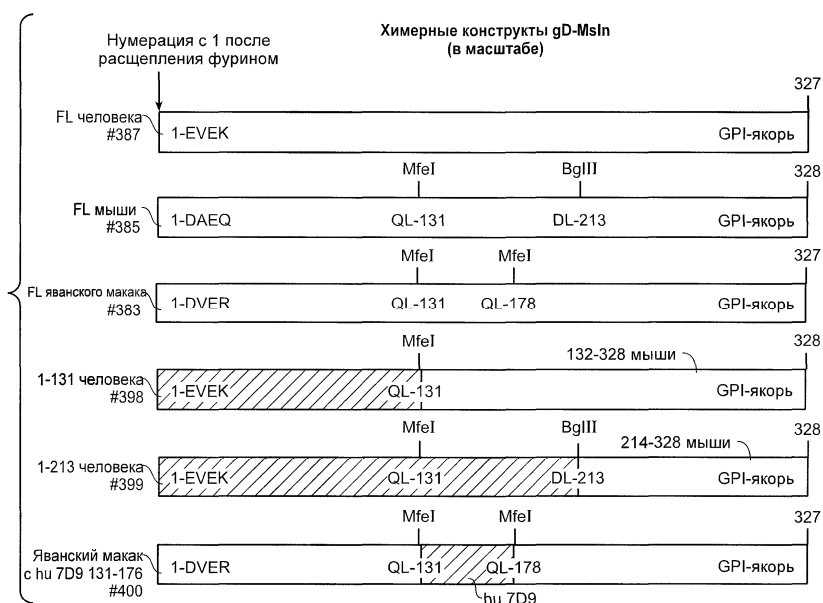
### Анализ Скэтчарда на клеточных линиях со стабильно трансфицированным и эндогенным

мезотелином				
	h7D9.v3 Kd (нМ)	Число копий	h22A10.v83 Kd (нМ)	Число копий
ВJAB человека	0.25	20000	1.8	45000
ВJAB яванского макака	Не определено		1.3	31000
ВJAB крысы	Не определено		2.7	31000
293 человека	0.2	Не определено	2.7	80500
293 яванского макака	Не определено		4.3	356000
293 крысы	Не определено		7.3	81000
HT1080 человека	0.97	130000	6.2	38000
HT1080 яванского макака	Не определено		6.4	113000
4/4-RM4 крысы	Не определено		6.2	171000
OvCar3	0.53	14178	9.2	5516
OvCar3x2.1	0.56	39963	9	15294
HPAC	1	2600	9.4	7300
Capan2	0.63	10000	4.2	11250
AsPC1	0.58	2300	9.3	7100
HPAF-II	0.41	4200	10.45	6400

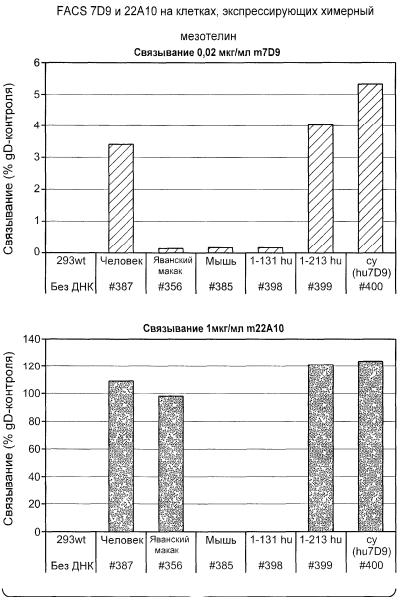
ФИГ. 13



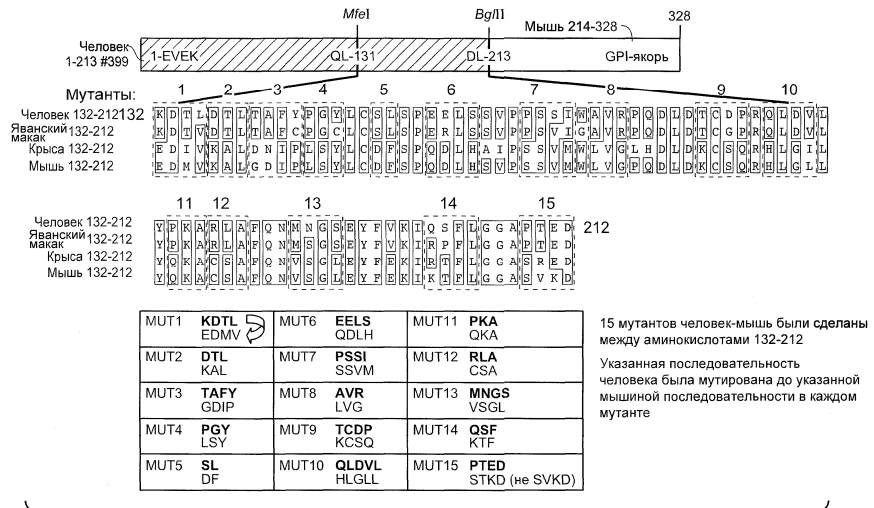
Фиг. 14



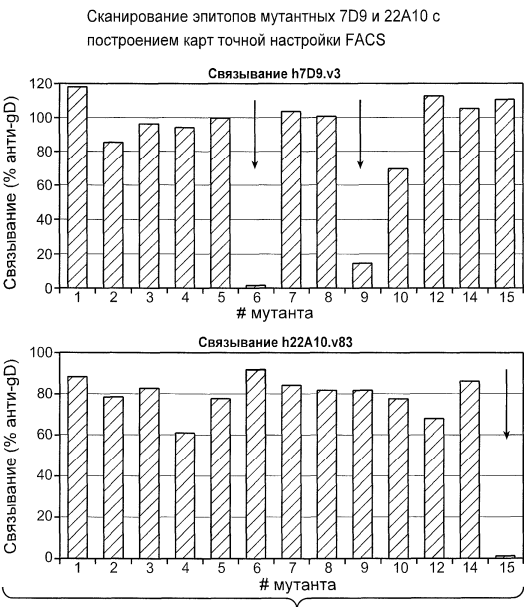
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

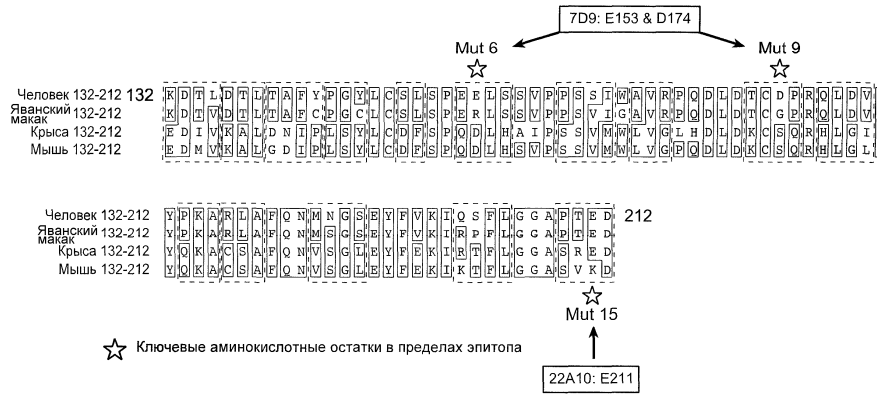


Фиг. 18A

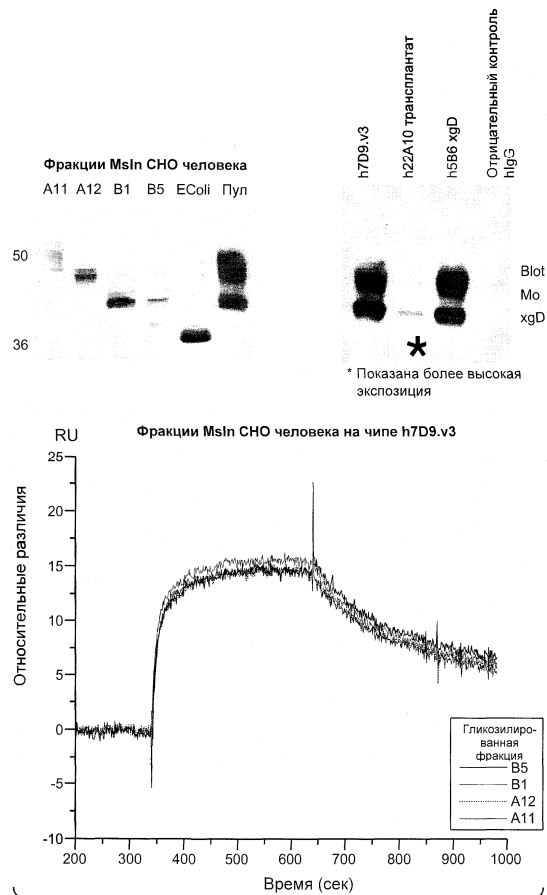


ФИГ. 18В

Эпитопы 7D9 и 22A10, картированные на различных сайтах

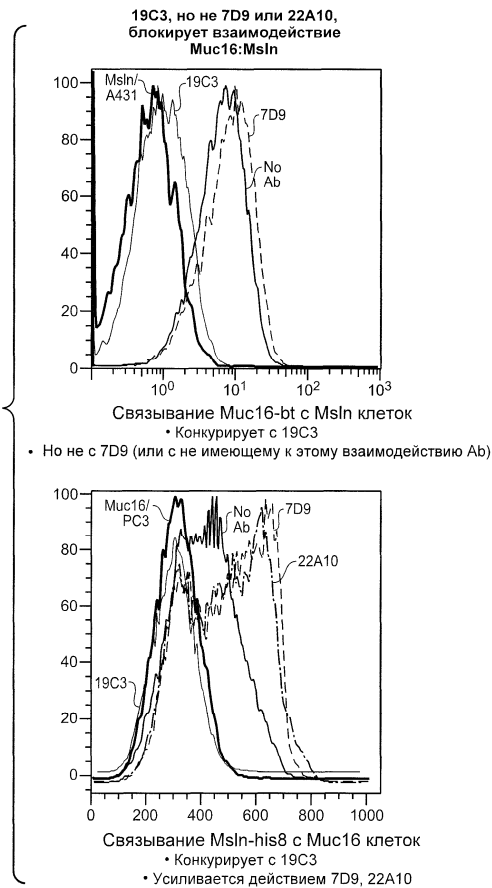


Фиг. 19



Фиг. 20

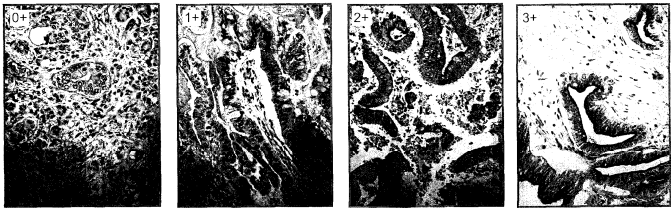




Фиг. 21

ИНС мезотелина в протоочной аденокарциноме поджелудочной железы (PDAC)

	Баллы ИНС			
	0+	1+	2+	3+
PDAC (N=76)	30%	37%	24%	9%

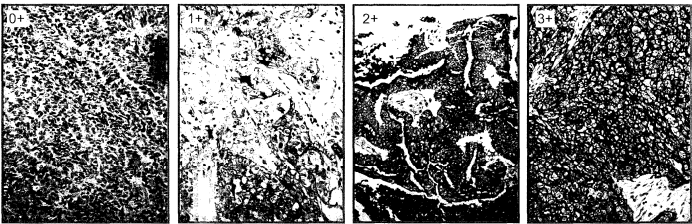


Положительны 70% PDAC, 33%  $\geq 2+$

Фиг. 22

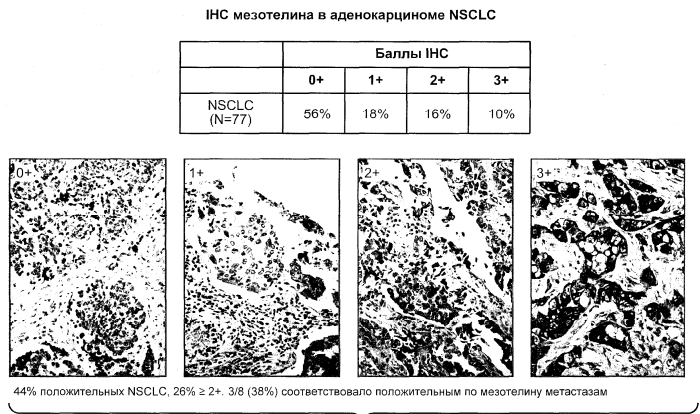
ИНС мезотелина в опухолях яичника

	Баллы ИНС			
	0+	1+	2+	3+
Серозная аденокарцинома (N=43)	2%	23%	44%	30%

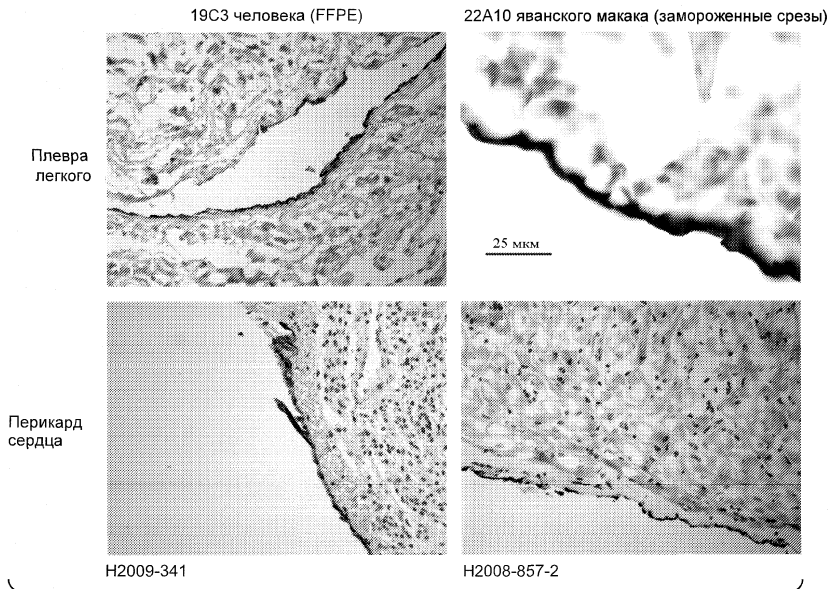


Положительны 98% серозных, 74%  $\geq 2+$ . 8/8 соответствовало положительным по мезотелину метастазам серозных опухолей

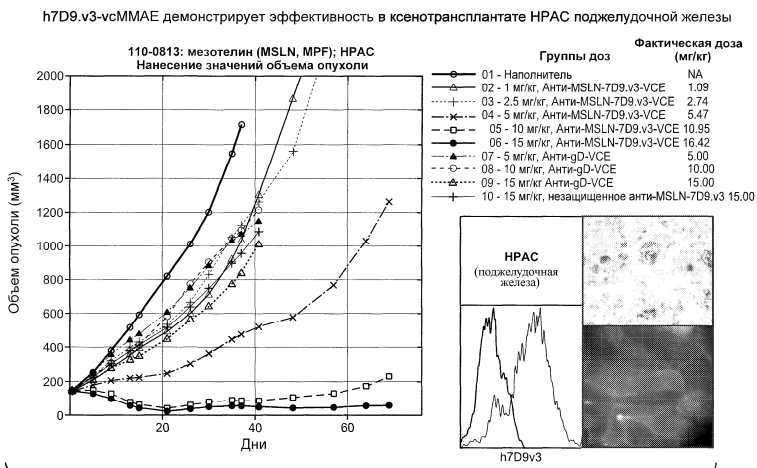
Фиг. 23



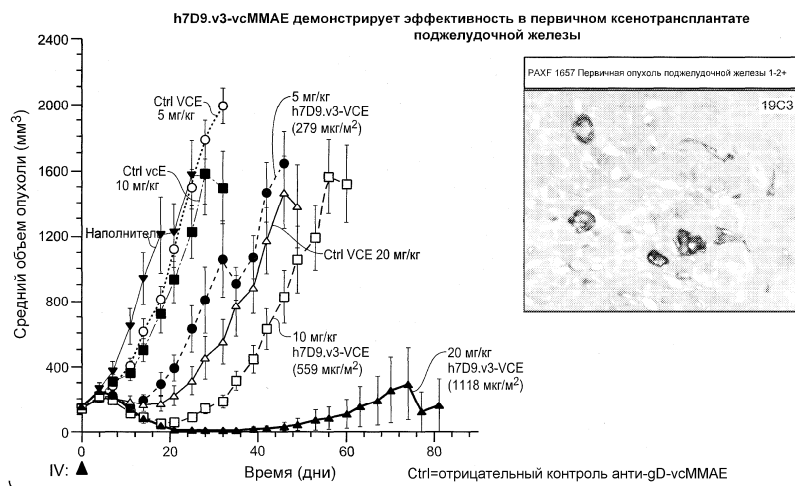
Фиг. 24



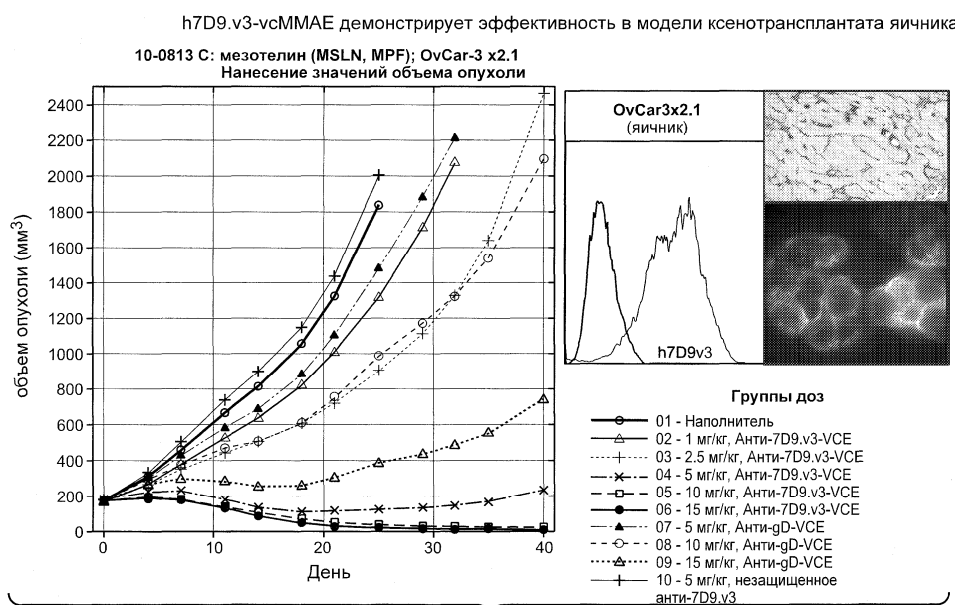
Фиг. 25



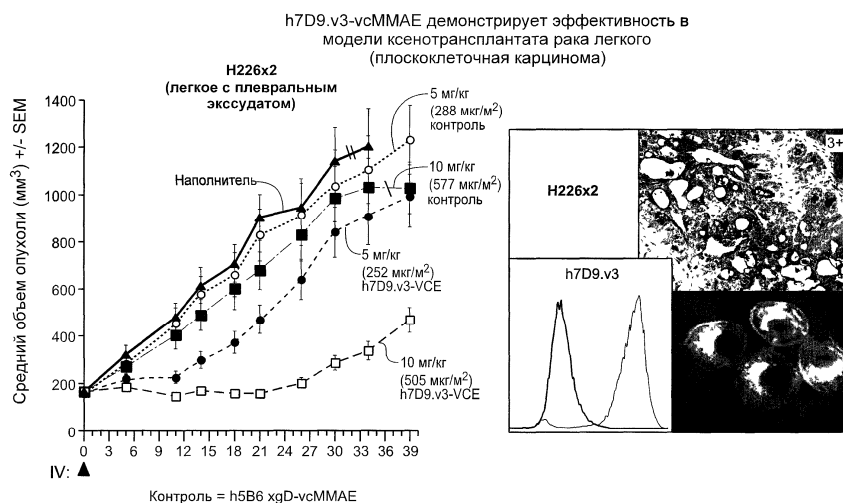
Фиг. 26



Фиг. 27

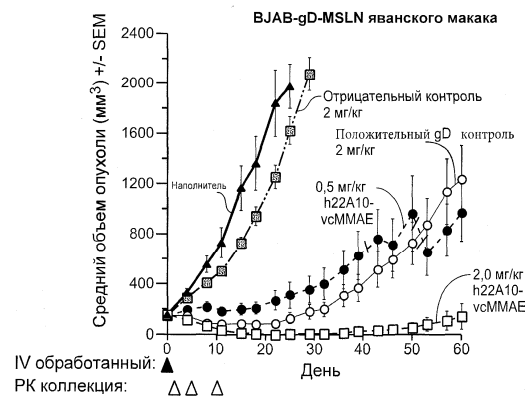
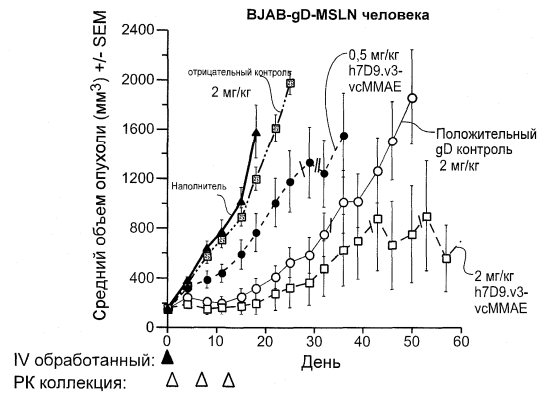


Фиг. 28



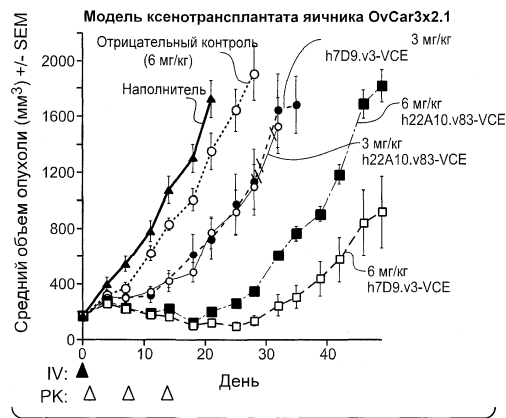
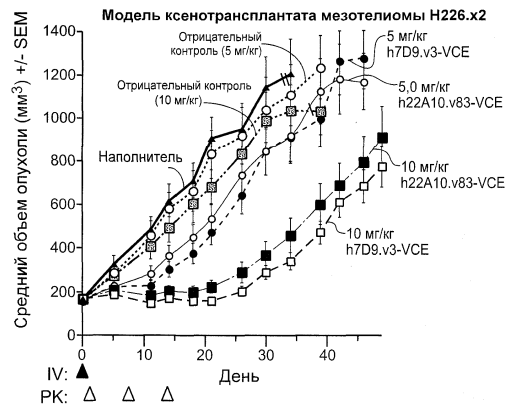
Фиг. 29

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE подобна h22A10-vcMMAE



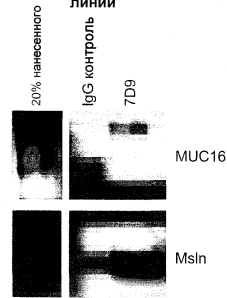
Фиг. 30

Эффективность h7D9.v3-vcMMAE подобна h22A10-vcMMAE

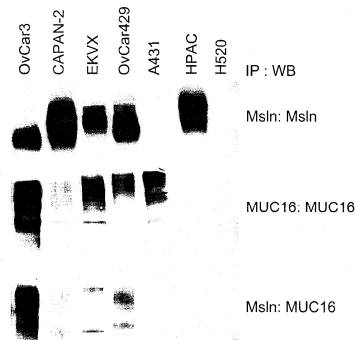


Фиг. 31

MUC16 образует комплекс с мезотелином, и два белка выделяются из положительных по двум антигенам клеточных линий

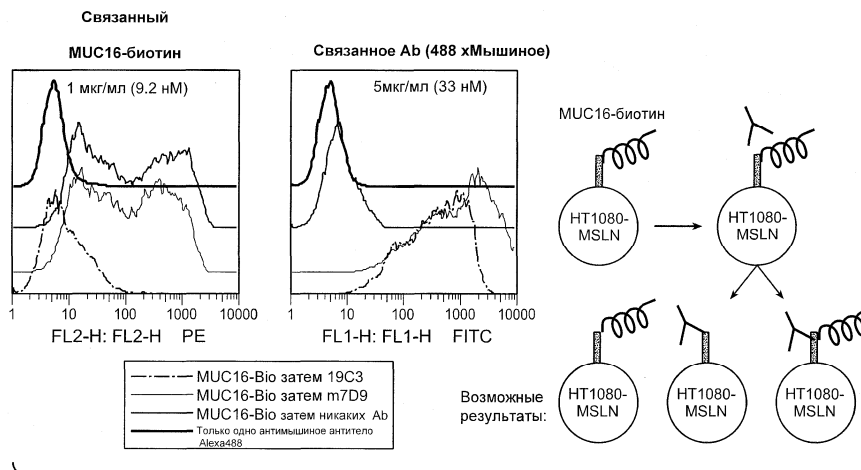


MUC16 иммунопреципитирует вместе с Msln в клеточных лизатах OvCar3



Кондиционированные среды демонстрируют совместную иммунопреципитацию Msln с MUC16 только из линий, экспрессирующих оба белка

Фиг. 32



Фиг. 33



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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