

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201591801 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.03.31

(22) Дата подачи заявки
2014.03.12

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ

(31) 61/793,641

(32) 2013.03.15

(33) US

(86) PCT/US2014/024597

(87) WO 2014/150937 2014.09.25

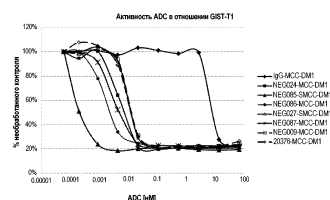
(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Абрамс Тиния, Коэн Стивен, Фантон
Кристи П. (US), Хубер Томас (CH),
Миллер Кэти, Шлейер Сью Хо
(US), Тиссо-Дагетт Катрин Ульрике,
Финнер Катрин (DE)

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

(57) Изобретение относится к антителам против сКИТ, фрагментам антител, лекарственным конъюгатам антител и их применению в лечении злокачественного новообразования.

Активность ADC против с-Kit в отношении клеток GIST-T1



201591801

A1

A1

201591801

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам против cKIT, фрагментам антител, лекарственным конъюгатам антител и их применению для лечения злокачественных новообразований.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

cKIT является рецепторной тирозинкиназой с одним трансмембранным доменом, связывающейся с лигандом фактором стволовых клеток (SCF). SCF индуцирует гомодимеризацию cKIT, активирующую его тирозинкиназную активность и сигналы через пути PI3-AKT и MAPK (Kindblom et al., Am J. Path. 1998 152(5): 1259). Исходно cKIT открыли как онкоген в виде укороченной формы, экспрессируемой ретровирусом кошачьих (Besmer et al., J Virol. 1986; 60(1): 194-203). Клонирование соответствующего гена человека показало, что cKIT является членом класса рецепторных тирозинкиназ типа III, насчитывающим среди членов семейства FLT3, рецептор CSF-1 и рецептор PDGF.

У мышей, мутантных по cKIT, обнаруживали, что cKIT необходим для развития гематopoэтических клеток, половых клеток, тучных клеток и меланоцитов. У человека потеря функции cKIT может приводить к глухоте и депигментации кожи и волос. Описан ряд мутаций с приобретением функции cKIT при различных злокачественных новообразованиях. Такие злокачественные новообразования включают гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), острый миелолейкоз (AML), мелкоклеточный рак легких (SCLC), тучноклеточный лейкоз (MCL) и рак поджелудочной железы (Hirota et al., Science 1998 (279):577; Esposito et al., Lab. Invest. 2002 82(11): 1481).

Учитывая эти предварительные данные о том, что cKIT является онкогеном, получали антитело, с помощью которого идентифицировали cKIT в качестве маркера AML (Gadd et al., Leuk. Res. 1985 (9): 1329). Это моноклональное антитело мыши, известное как YB5.B8, получали с использованием лейкозных бластных клеток от пациента-человека, и оно связывалось с cKIT, избыточно экспрессирующимся на поверхности клеток AML, но cKIT

не определяли на нормальных клетках крови или костного мозга (Gadd et al., выше). Получали второе антитело против cKIT (SR-1), блокирующее связывание SCF с cKIT и, таким образом, блокирующее передачу сигнала cKIT (Broudy et al., Blood 1992 79(2):338). Биологическим эффектом антитела SR-1 являлось ингибирование роста BFU-E и CFU-GM, и, основываясь на этих данных, предлагали его использование в дальнейших исследованиях гемопоэза или роста опухолевых клеток (Broudy et al., выше).

В дальнейших исследованиях злокачественных новообразований исследователи обнаруживали, что обработка иматинибом, низкомолекулярным ингибитором cKIT, будет значительно снижать пролиферацию клеточных линий GIST. Однако клетки, обработанные иматинибом, со временем становятся резистентными по причине вторичных мутаций cKIT (Edris et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Early On-line Edition 2013). Однако когда клетки GIST обрабатывали антителом SR-1 в качестве второго терапевтического средства, наблюдали значительное снижение пролиферации клеток и снижение экспрессии cKIT на поверхности клеток (Edris et al., выше). Таким образом, неконъюгированное антитело SR-1 являлось эффективным в решении проблемы резистентности к иматинибу в линиях GIST человека, что позволяет предполагать, что комбинация иматиниба/антитела против cKIT может являться применимой.

Лекарственные конъюгаты антител

Лекарственные конъюгаты антител ("ADC") используют для местной доставки цитотоксических средств при лечении злокачественных новообразований (см. например, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005). ADC делают возможной направленную доставку остатка лекарственного средства, когда можно достигать максимальной эффективности при минимальной токсичности. По мере того, как все больше ADC демонстрируют многообещающие клинические результаты, существует повышенная потребность в разработке новых терапевтических средств для терапии злокачественных новообразований.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лекарственному конъюгату

антитела формулы $Ab-(L-(D)_m)_n$ или его фармацевтически приемлемой соли; где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом специфически связывающимся с эпитопом cKIT человека; L является линкером; D является остатком лекарственного средства; m является целым числом от 1 до 8; и n является целым числом от 1 до 10.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное n является 3 или 4.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с внеклеточным доменом cKIT (SEQ ID NO:160).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO:155).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ

ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Лекарственный конъюгат антитела, в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующей CDR другого антитела против sKIT из таблицы 1.

Лекарственный конъюгат антитела, в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицируют, подвергают делеции или заменяют.

Лекарственный конъюгат антитела, сохраняющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности по сравнению с переменной областью легкой цепи или переменной областью тяжелой цепи.

Лекарственный конъюгат антитела, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанный линкер (L) выбран из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, заряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.

Лекарственный конъюгат антитела, где линкер получают из перекрестносшивающего реагента, выбранного из группы, состоящей из N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноата (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфо-бутаноата (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилйодоацетата (SIA), N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоата (SIAB), малеинимида PEG NHS, N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазептадекан-1-оата (CX1-1).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанный линкер получают из перекрестносшивающего реагента N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанный остаток лекарственного средства (D) выбран из группы, состоящей из ингибитора V-АТФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибиторов реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9,

ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

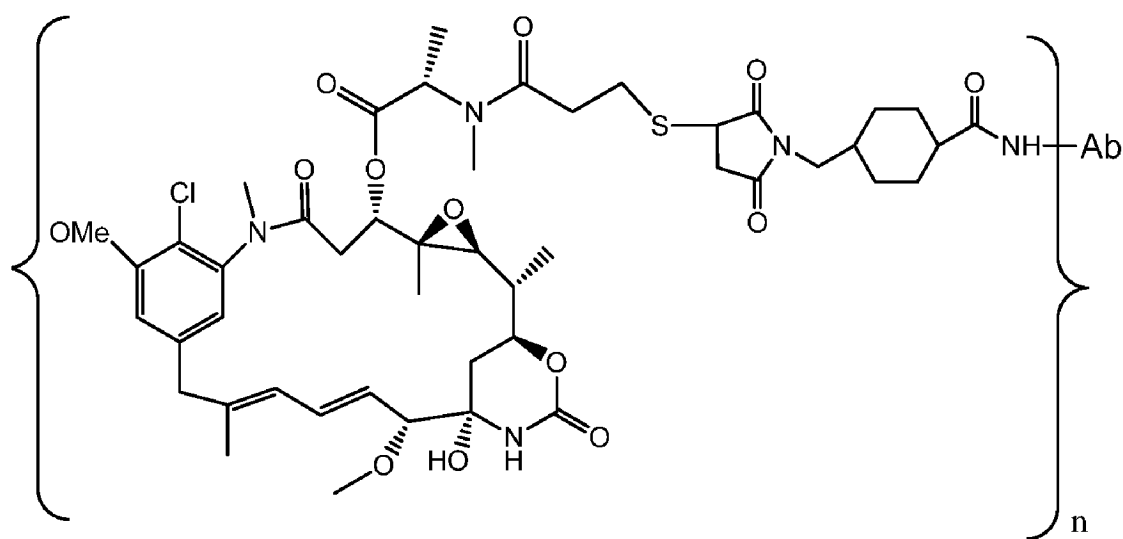
Лекарственный конъюгат антитела, где остаток лекарственного средства является майтанзиноидом.

Лекарственный конъюгат антитела, где майтанзиноид является N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзином (DM1) или N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтанзином (DM4).

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

Лекарственный конъюгат антитела формулы



или его фармацевтически приемлемая соль; где Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с cKIT человека и по меньшей мере n-числом первичных аминов; и n является целым числом от 1 до 10.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO:155).

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с

сКІТ человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с сКІТ человека в SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим: (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Лекарственный конъюгат антитела, в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующего CDR другого антитела против sKIT из таблицы 1.

Лекарственный конъюгат антитела, в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицировали, подвергали делеции или заменяли.

Лекарственный конъюгат антитела, сохраняющий по меньшей мере, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности по сравнению с переменной областью легкой цепи или переменной областью тяжелой цепи.

Лекарственный конъюгат антитела, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное n является целым числом от 2 до 8.

Лекарственный конъюгат антитела, где указанное n является целым числом от 3 до 4.

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный конъюгат антитела в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственный конъюгат антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция, где указанную композицию

получают в виде лиофилизата.

Фармацевтическая композиция, где указанный лиофилизат содержит лекарственный конъюгат антитела, сукцинат натрия и полисорбат 20.

Способ лечения cKIT-положительного злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту лекарственного конъюгата антитела или фармацевтической композиции.

Способ лечения, где указанное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы.

Способ, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

Способ, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

Лекарственный конъюгат антитела для применения в качестве лекарственного средства.

Лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическая композиция для применения в лечении cKIT-положительного злокачественного новообразования.

Лекарственный конъюгат антитела, вводимый в комбинации с другим терапевтическим средством.

Лекарственный конъюгат антитела, вводимый в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

Клетка-хозяин, содержащая вектор.

Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина и

выделение антитела из культуры.

Способ получения лекарственного конъюгата антитела против cKIT, включающий: (a) химическое соединение SMCC с остатком лекарственного средства DM-1; (b) конъюгирование указанного линкера-лекарственного средства с антителом, выделенным из культуры клеток; и (c) очистку лекарственного конъюгата антитела.

Лекарственный конъюгат антитела, имеющий среднее соотношение майтазонида и антитела (MAR), измеряемое с помощью УФ-спектрофотометра, приблизительно 3,5.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, являющийся меченым.

Диагностический реагент, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего средства и иона металла.

Определения

Если не указано иначе, предполагают, что следующие термины и фразы, как применяют в настоящем описании, имеют следующие значения:

Термин "алкил" относится к моновалентной насыщенной углеводородной цепи, содержащей конкретное количество атомов углерода. Например, C₁₋₆-алкил относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода. Алкильные группы могут являться неразветвленными или разветвленными. Типичные разветвленные алкильные группы содержат одну, две или три цепи. Примеры алкильных групп включают, в качестве неограничивающих примеров, метил, этил, пропил (n-пропил и изопропил), бутил (n-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил), пентил (n-пентил, изопентил и неопентил) и гексил.

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело" относится к полипептиду из семейства иммуноглобулинов,

способному связываться с соответствующим антигеном нековалентно, обратимо и специфичным образом. Например, природное антитело IgG является тетрамером, содержащим по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на гипервариабельные области, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антитело" включает, в качестве неограничивающих примеров, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела верблюжьих, химерные антитела и антиидиотипические (против Id) антитела (включая, например, антитела против Id к антителам по настоящему изобретению). Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

Термины "определяющие комплементарность домены" или "определяющие комплементарность области" ("CDR") взаимозаменяемо относятся к гипервариабельным областям VL и

VH. CDR являются участком цепей антитела, связывающим белок-мишень, имеющим специфичность к такому белку-мишени. В каждой VL или VH человека находятся три CDR (CDR1-3, последовательно пронумерованные от N-конца), составляющие приблизительно 15-20% переменных доменов. CDR можно обозначать по их области и порядку. Например, "VHCDR1" или "HCDR1" относятся к первой CDR переменной области тяжелой цепи. CDR являются структурно комплементарными эпитопу белка-мишени и, таким образом, напрямую отвечают за специфичность связывания. Оставшиеся участки VL или VH, так называемые каркасные области, проявляют меньше изменчивости аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

Положения CDR и каркасных областей можно определять с использованием различных хорошо известных определений в этой области, например, по Kabat, по Chothia и AbM (см., например, Johnson *et al.*, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих участков также описывают в следующих источниках: Ruiz *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); and Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); and Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); and Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

Легкие и тяжелые цепи разделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "переменная" используют функционально. В связи с этим, следует понимать, что переменные домены частей легких (VL) и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. С другой стороны, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные

биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Общепринято, номер доменов константной области повышается с их удалением от антигенсвязывающего участка или amino-конца антитела. N-конец является вариабельной областью, и на C-конце находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбокси-концевые домены тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как применяют в настоящем описании, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к одной или нескольким частям антитела, сохраняющим способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического препятствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры связывающих фрагментов включают, в качестве неограничивающих примеров, одноцепочечные Fv (scFv), Fv, связанные дисульфидными связями (sdFv), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)2-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), состоящий из домена VH; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или другие эпитоп-связывающие фрагменты антитела.

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединять с использованием рекомбинантных способов, с помощью синтетического линкера, позволяющего получать их в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спаривают для образования моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv ("scFv"); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающий фрагмент". Эти антигенсвязывающие фрагменты получают с использованием

общепринятых способов, известных специалистам в этой области, и фрагменты подвергают скринингу на применимость аналогично интактным антителам.

Антигенсвязывающие фрагменты также можно включать в однодоменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интраантитела, диатела, триотела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты подвергать графтингу в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описывают фибронектиновые полипептидные моноклетки).

Антигенсвязывающие фрагменты можно включать в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных сегментов Fv (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., *Protein Eng.* 8: 1057-1062, 1995; и патент США № 5641870).

Как применяют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител" относится к полипептидам, включающим антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие, по существу, идентичную аминокислотную последовательность или полученные из того же генетического источника. Этот термин также включает препараты молекул антител одной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа.

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело человека" включает антитела, содержащие переменные области, в которых каркас и области CDR получают из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, ее также получают из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека, или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные при анализе каркасных последовательностей человека,

например, как описано в Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000).

Антитела человека по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*, или консервативную замену для обеспечения стабильности или производства).

Как применяют в настоящем описании, термин "распознавать" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, обнаруживающему и взаимодействующему (например, связывающемуся) со своим эпитопом, является ли эпитоп линейным или конформационным. Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым специфически связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, располагающихся рядом благодаря третичному фолдингу белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные при третичном фолдинге, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают способы, известные в этой области, например, рентгеноструктурную кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). "Паратоп" является частью антитела, распознающей эпитоп антигена.

Фраза "специфически связывает" или "избирательно связывает" при использовании в отношении описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и антителом, фрагментом антитела, или полученным из антитела связывающим средством, относится к реакции связывания, с помощью которой определяют наличие антигена в гетерогенной популяции белков и

других биологических препаратах, например, в биологическом образце, например, крови, сыворотке, плазме или образце ткани. Таким образом, в условиях конкретного обозначенного иммунологического анализа антитела или связывающие средства с конкретной специфичностью связывания связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в два раза сильнее фоновых значений и, по существу, не связываются в значительной степени с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном из аспектов в условиях конкретного обозначенного иммунологического анализа антитело или связывающее средство с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном по меньшей мере в десять (10) раз сильнее фоновых значений и, по существу, не связывается в значительной степени с другими антигенами, присутствующими в образце. Специфическое связывание с антителом или связывающим средством в таких условиях может потребовать селекции антитела или средства по его специфичности к конкретному белку. При желании или необходимости, этой селекции можно достигать, удаляя антитела, перекрестно реагирующие с молекулами других видов (например, мыши или крысы) или других подтипов. Альтернативно, в некоторых аспектах выбирают антитела или фрагменты антител, перекрестно реагирующие с конкретными желаемыми молекулами.

Как применяют в настоящем описании, термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных участках. В каждом антигенном участке переменная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном посредством слабых нековалентных сил в многочисленных участках; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, по существу, не содержащему другие антитела, имеющие другие антигенные специфичности. Однако, выделенное антитело, специфически связывающееся с одним антигеном, может иметь перекрестную реактивность по отношению к другим антигенам. Кроме того, выделенное антитело, по существу, может не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Термин "соответствующая последовательность зародышевой

линии человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность вариабельной области человека, обладающую наибольшей определенной идентичностью аминокислотных последовательностей по отношению к референсной аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области при сравнении со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми последовательностями вариабельной области иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области человека с наибольшей идентичностью аминокислотных последовательностей по отношению к аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области при сравнении со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может являться только каркасными областями, только определяющими комплементарность областями, каркасными и определяющими комплементарность областями, вариабельным сегментом (как определено выше) или другими комбинациями последовательностей или подпоследовательностей, содержащих вариабельную область. Идентичность последовательности можно определять с использованием способов, представленных в настоящем описании, например, выравнивая две последовательности с использованием BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в этой области. Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может иметь по меньшей мере приблизительно 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности по отношению к референсной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности вариабельной области.

Для выбора антител, специфически иммунореактивных по

отношению к конкретному белку, можно использовать множество форматов иммунологических анализов. Например, для выбора антител, специфически иммунореактивных по отношению к белку, общепринято используют твердофазные иммунологические анализы ELISA (см., например, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), на предмет описания форматов и условий иммунологических анализов, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности). Как правило, при специфической или избирательной реакции связывания будут получать сигнал по меньшей мере в два раза выше фонового сигнала и, более типично, по меньшей мере в 10-100 раз выше фона.

Термин "равновесная константа диссоциации (KD, M)" относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), разделенной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ M⁻¹). Равновесные константы диссоциации можно измерять с использованием любого способа, известного в этой области. Как правило, антитела по настоящему изобретению будут иметь равновесную константу диссоциации менее приблизительно 10^{-7} или 10^{-8} M, например, менее приблизительно 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых аспектах менее приблизительно 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

Термин "биодоступность" относится к системной доступности (т.е. уровням в крови/плазме) указанного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. Биодоступность является абсолютным термином, указывающим на измерение времени (скорости) и общего количества (меры) лекарственного средства, достигающего общего кровотока из вводимой лекарственной формы.

Как применяют в настоящем описании, фраза "по существу, состоящий из" относится к роду или виду активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также любым эксципиентам, не являющимися активными в отношении целей способов или композиций. В некоторых аспектах фраза "по существу, состоящий из" прямо исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, иных, чем лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению. В

некоторых аспектах фраза "по существу, состоящий из" прямо исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, иных, чем лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению и второе совместно вводимое средство.

Термин "аминокислота" относится к природным, синтетическим и неприродным аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функционирующим схожим с природными аминокислотами образом. Природные аминокислоты являются аминокислотами, кодируемыми генетическим кодом, а также аминокислотами, модифицированными позднее, например, гидроксипролину, γ -карбоксиглутаминовой кислоте и О-фосфосерину. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, имеющим ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. α -атом углерода, соединенный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфония. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, имеющим структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но функционирующим схожим с природной аминокислоты образом.

Термин "консервативно модифицированный вариант" относится к аминокислотным последовательностям и последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, консервативно модифицированные варианты относятся к нуклеиновым кислотам, кодирующим идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или, в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, по существу, к идентичным последовательностям. По причине вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой указанный белок. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким

образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, кодон можно заменять любым из соответствующих описываемых кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", являющимися одним из видов консервативно модифицированных вариантов. С помощью каждой последовательности нуклеиновой кислоты в настоящем описании, кодирующей полипептид, также описывают каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в этой области будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, как правило, являющегося единственным кодоном для метионина, и TGG, как правило, являющимся единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать для получения функционально идентичной молекулы. Таким образом, в каждой описываемой последовательности подразумевают каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

В случае полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или вставки в полипептидной последовательности, приводящие к замене аминокислоты химически схожей аминокислотой. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в этой области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Следующие восемь групп включают аминокислоты, представляющие собой консервативные замены друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых аспектах, термин "консервативные модификации последовательности" используют в отношении модификаций аминокислот, не влияющие или не изменяющие значительно характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Как применяют в настоящем описании, термин "оптимизированный" относится к нуклеотидной последовательности, измененной так, что она кодирует аминокислотную последовательность с использованием кодонов, являющихся предпочтительными в продуцирующей клетке или организме, как правило, эукариотической клетке, например, дрожжевой клетке, клетка *Pichia*, грибковой клетке, клетке *Trichoderma*, клетке яичника китайского хомяка (CHO) или клетке человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют полностью или насколько возможно сохраняющей аминокислотную последовательность, исходно кодируемую начальной нуклеотидной последовательностью, также известной как "родительская" последовательность.

Термины "процент идентичности" в отношении двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к степени, с которой схожи две или более последовательности или подпоследовательности. Две последовательности являются "идентичными", если они имеют одну последовательность аминокислот или нуклеотидов в сравниваемой области. Две последовательности являются "по существу, идентичными", если две последовательности имеют конкретную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, являющихся одинаковыми (т.е. 60% идентичности, необязательно, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности в конкретной области, или, если не указано, во всей последовательности) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измеряют с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивая вручную и визуальной оценки. Необязательно, идентичность существует в области, составляющей по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов (или 10 аминокислот) в длину, или более предпочтительно - в области, составляющей от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислоты) в длину.

При сравнении последовательностей, как правило, одна

последовательность служит референсной последовательностью, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательности, тестируемые и референсные последовательности вводят в компьютер, обозначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и задают параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или задавать альтернативные параметры. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательности вычисляют процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно референсной последовательности на основе параметров программы.

Как применяют в настоящем описании, "окно сравнения" включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранный из группы, состоящей из от 20 до 600 положений, как правило – от приблизительно 50 до приблизительно 200 положений, более типично – от приблизительно 100 до приблизительно 150 положений, в котором последовательность можно сравнивать с референсной последовательностью из того же количества смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в этой области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), с помощью алгоритма гомологического выравнивания по Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска схожести по Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерных воплощений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или выравнивания вручную и визуальной оценки (см., например, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и схожести

последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описываемые в Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977 и Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для анализа BLAST является общедоступным в National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм включает первоначальную идентификацию пар последовательностей с высокими баллами (HSP) посредством идентификации коротких слов длины W в последовательности запроса, соответствующих или удовлетворяющих некоторым пороговым баллам положительных значений T при выравнивании со словом той же длины из последовательности в базе данных. T обозначают как порог баллов соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти исходные совпадения соседних слов служат начальным материалом для начальных поисков для обнаружения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько можно повышать кумулятивные баллы выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей кумулятивные баллы вычисляют с использованием параметров M (баллы выигрыша для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (баллы штрафа для несовпадающих остатков; всегда < 0). В случае аминокислотных последовательностей для вычисления кумулятивных баллов используют матрицу замен. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращают, если: кумулятивные баллы выравнивания снижаются на количество X от его максимального достигнутого количества; кумулятивные баллы становятся нулем или ниже по причине накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигают конца любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (в случае нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию используют длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используют длину слова 3, ожидание (E) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff and

Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915), выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

С помощью алгоритма BLAST также осуществляют статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Одной из мер сходства, получаемой с помощью алгоритма BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), представляющая собой указание на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет возникать случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают схожей с референсной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с референсной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно – менее приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно – менее приблизительно 0,001.

Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей также можно определять с использованием алгоритма по E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4: 1 1-17, 1988), включенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с использованием алгоритма по Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), включенного в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на www.gcg.com), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250, и веса пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Помимо указанной выше процентной доли идентичности последовательностей, другим свидетельством о том, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида являются, по существу, идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами,

индуцированными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, как правило, полипептид является, по существу, идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим свидетельством того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются, по существу, идентичными, является то, что две молекулы или комплементарные им молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Еще одним свидетельством о том, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются, по существу, идентичными, является то, что для амплификации последовательности можно использовать одни и те же праймеры.

В настоящем описании термин "нуклеиновая кислота" используют взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид", и он относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи в остове, являющиеся синтетическими, природными и неприродными, имеющие свойства связывания, схожие с референсной нуклеиновой кислотой, и метаболизирующиеся аналогично референсным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно включает консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также конкретно указанную последовательность. Конкретно, как подробно описано ниже, можно осуществлять замены вырожденных кодонов, получая последовательности, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяют смешанными основаниями и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzner et al, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; и Rossolini et al, (1994) *Mol. Cell.*

Probes 8:91-98).

Термин "функционально связанный" в отношении нуклеиновых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, он относится к функциональной взаимосвязи регулирующей транскрипцию последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, промоторные регулирующие транскрипцию последовательности, функционально связанные с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они действуют в цис-положении. Однако, некоторые регулирующие транскрипцию последовательности, такие как энхансеры, не нуждаются в том, чтобы быть физически смежными или локализованными в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

В настоящем описании термины "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо в отношении полимера аминокислотных остатков. Термины относятся к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей природной аминокислоты, а также к природным полимерам аминокислот и неприродным полимерам аминокислот. Если не указано иначе, конкретная полипептидная последовательность также косвенно включает ее консервативно модифицированные варианты.

Как применяют в настоящем описании термин "иммуноконъюгат" или "лекарственный конъюгат антитела" относится к связи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с другим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин, иммунотерапевтическое средство, зонд для визуализации и т.п. Связь может являться ковалентными связями или нековалентными взаимодействиями, такими как взаимодействия посредством

электростатических сил. Для получения иммуноконъюгата можно использовать различные линкеры, известные в этой области. Кроме того, иммуноконъюгат можно получать в форме слитого белка, который можно экспрессировать с помощью полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат. Как применяют в настоящем описании, термин "слитый белок" относится к белкам, получаемых соединением двух или более генов или фрагментов генов, исходно кодирующих отдельные белки (включая пептиды и полипептиды). Трансляция слитого гена приводит к образованию единого белка с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков.

Термин "индивидуум" включает человека и не относящихся к человеку животных. Не относящиеся к человеку животные включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как низшие приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии и пресмыкающиеся. Если не указано иначе, в настоящем описании термины "пациент" или "индивидуум" используют взаимозаменяемо.

Как применяют в настоящем описании термин "токсин", "цитотоксин" или "цитотоксическое средство" относится к любому средству, наносящему вред росту и пролиферации клеток, и которое может действовать, снижая, ингибируя или разрушая клетку или злокачественное новообразование.

Как применяют в настоящем описании, термин "противораковое средство" относится к любому средству, которое можно использовать для лечения нарушения пролиферации клеток, такое как злокачественное новообразование, включая, в качестве неограничивающих примеров, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и средства для лучевой терапии, направленные противораковые средства и иммунотерапевтические средства.

Как применяют в настоящем описании, термин "остаток лекарственного средства" или "полезная нагрузка" относится к химическому остатку, конъюгированному с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, и может включать любое терапевтическое или диагностическое средство, например, противораковое, противовоспалительное, противомикробное

(например, противогрибковое, антибактериальное, антипаразитарное, противовирусное) или анестезирующее средство. В определенных аспектах остаток лекарственного средства выбран из ингибитора V-АТФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора протеасом, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR. Способы прикрепления каждого из них к линкеру, совместимому с антителами, и способ по настоящему изобретению известны в этой области. См., например, Singh et al., (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Кроме того, полезная нагрузка может являться биофизическим зондом, флуорофором, спиновой меткой, инфракрасным зондом, аффинным зондом, хелатирующим средством, спектроскопическим зондом, радиоактивным зондом, молекулой липида, полиэтиленгликолем, полимером, спиновой меткой, ДНК, РНК, белком, пептидом, поверхностью, антителом, фрагментом антитела, наночастицей, квантовой точкой, липосомой, частицей PLGA, сахаридом или полисахаридом.

Термин "остаток лекарственного средства майтанзиноида" означает подструктуру конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющую структуру соединения майтанзиноида. Впервые майтанзин выделили из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Затем открыли, что некоторые микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры С-3-майтанзинола (патент США № 4151042). Сообщают о синтетическом майтанзиноле и аналогах майтанзинола. См. патенты США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866;

4424219; 4450254; 4362663 и 4371533, и Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441 -3451), каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Конкретные примеры майтанзиноидов, применимых для конъюгации, включают DM1, DM3 и DM4.

Термин "опухоль" относится к неопластическому росту и пролиферации клеток, злокачественному или доброкачественному, и всем предраковым и злокачественным клеткам и тканям.

Термин "противоопухолевая активность" означает снижение скорости пролиферации опухолевых клеток, жизнеспособности или метастатической активности. Возможным способом демонстрации противоопухолевой активности является демонстрация снижения скорости роста опухолевых клеток, остановки роста размера опухоли или снижения размера опухоли. Такую активность можно оценивать с использованием общепринятых моделей опухолей *in vitro* или *in vivo*, включая, в качестве неограничивающих примеров, модели ксенотрансплантатов, модели аллотрансплантатов, модели MMTV и другие модели, известные в этой области для исследования противоопухолевой активности.

Термин "злокачественное новообразование" относится к недоброкачественной опухоли или злокачественному новообразованию. Как применяют в настоящем описании, термин "злокачественное новообразование" включает злокачественное новообразование, отличающееся нерегулируемым или неконтролируемым ростом клеток. Примеры злокачественных новообразований включают: карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы.

Термин "злокачественное новообразование" включает первичные злокачественные опухоли (например, те, клетки которых не мигрировали в участки организма индивидуума, иные, чем участок исходной опухоли) и вторичные злокачественные опухоли (например, возникающие при метастазировании, миграции опухолевых клеток во вторичные участки, отличающиеся от участка исходной опухоли).

Термин "сKIT" относится к тирозинкиназному рецептору, являющемуся членом семейства рецепторных тирозинкиназ III. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные

последовательности cKIT известны и опубликованы под регистрационными номерами GenBank X06182.1, EU826594.1, GU983671.1, HM015525.1, HM015526.1, AK304031.1 и BC071593.1. См. также последовательность кДНК cKIT человека в SEQ ID NO: 1 и последовательность белка cKIT человека в SEQ ID NO:2. Структурно рецептор cKIT является трансмембранным белком типа I, содержит сигнальный пептид, 5 Ig-подобных доменов C2 во внеклеточном домене, содержит протеинкиназный домен во внутриклеточном домене и по всей своей длине имеет по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Структурно последовательность нуклеиновой кислоты cKIT по всей своей длине имеет по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO 1.

Термины "cKIT-экспрессирующее злокачественное новообразование" или "cKIT-положительное злокачественное новообразование" относится к злокачественному новообразованию, экспрессирующему cKIT и/или мутантную форму cKIT на поверхности злокачественных клеток.

Как применяют в настоящем описании, термины "лечить" или "лечение" любого заболевания или нарушения в одном из аспектов относится к улучшению заболевания или нарушения (т.е. замедлению или остановке или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к облегчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут являться неочевидными для пациента. В еще одном аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к физической модуляции заболевания или нарушения (например, стабилизация очевидного симптома), физиологической модуляции (например, стабилизация физического симптома) или обеим. В еще одном аспекте термины "лечить" или "лечение" относятся к профилактике или задержке дебюта, или развития, или

прогрессирования заболевания или нарушения.

Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяемо относится к количеству, достаточному для получения желаемого результата (т.е. снижения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, профилактики метастазирования, ингибирования или профилактики вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекции). В некоторых аспектах терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательные побочные эффекты. Можно определять терапевтически приемлемое количество, сначала вводя низкую дозу, а затем постепенно повышая эту дозу до достижения желаемого эффекта. "Профилактически эффективная доза" и "терапевтически эффективная доза" молекул по настоящему изобретению может предотвращать дебют или приводить к снижению тяжести, соответственно, симптомов заболевания, включая симптомы, ассоциированные со злокачественным новообразованием.

Термин "совместно вводимый" относится к одновременному наличию двух активных средств в крови индивидуума. Активные средства, вводимые совместно, можно вводить одновременно или последовательно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 показана активность ADC cKIT-MCC-DM1 в субпопуляции линий злокачественных клеток.

На фигуре 2 показана активность 9P3-MCC-DM1, 9P3-SPDB-DM4 и 9P3-CX1-1-DM1 в субпопуляции линий злокачественных клеток.

На фигуре 3 показана активность 9P3-MCC-DM1 в панели линий клеток AML, GIST, меланомы и SCLC с различными уровнями экспрессии поверхностного рецептора cKIT.

На фигуре 4 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток GIST-T1 (иматиниб-чувствительных).

На фигуре 5 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток GIST430 (иматиниб-резистентных).

На фигуре 6 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток NCI-H526 (SCLC с более высокой

экспрессией cKIT).

На фигуре 7 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток NCI-H1048 (SCLC с более низкой экспрессией cKIT).

На фигуре 8 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток CMK11-5 (AML с высокой экспрессией cKIT).

На фигуре 9 показана способность ADC cKIT-MCC-DM1 ингибировать пролиферацию клеток Uke-1 (AML с более низкой экспрессией cKIT).

Фигура 10 представляет собой HDx-MS исходные данные, построенные в виде различий, скорректированных относительно стандартной ошибки измерений. Более отрицательное значение свидетельствует о большей защите от дейтериевого обмена после связывания 9P3 с антигеном cKIT. Две наиболее значимые области защиты обозначены как область 1 и область 2.

На фигуре 11 показаны области защиты HDx-MS, картированные с использованием заполнения поверхности: область 1 (показана черным) и область 2 (показана темно серым). Участки связывания SCF показаны как участок I (светло-серые сферы), участок II (средне-серые сферы) и участок III (более темные серые сферы).

Фигура 12 представляет собой вестерн-блоттинг, демонстрирующий способность SCF, NEG085-MCC-DM1, NEG024-MCC-DM1 и 20376-MCC-DM1 модулировать фосфорилирование cKIT в клеточной линии Mo7e, экспрессирующей cKIT дикого типа (фигура 12(A)), или в клеточной линии GIST-T1, экспрессирующей мутантный cKIT (фигура 12(B)), через 15 минут.

На фигуре 13 показано, что Ab NEG085 и 20376 опосредуют быструю интернализацию поверхностного cKIT на клетках GIST-T1 (A) и на клетках костного мозга человека (B)

Фигура 14 представляет собой вестерн-блоттинги, на которых показана способность SCF или NEG085-MCC-DM1 ускорять деградацию cKIT в клеточной линии GIST-T1, экспрессирующей мутантный cKIT (фигура 14A), и клеточной линии NCI-H526, экспрессирующей cKIT дикого типа (фигура 14B), с течением времени.

На фигуре 15 показана способность NEG085, NEG024, 20376,

NEG085-MCC-DM1 ингибировать SCF-зависимую пролиферацию клеток Mo7e.

На фигуре 16 показана способность NEG085 и NEG085-MCC-DM1 ингибировать SCF-независимую пролиферацию клеток Mo7e.

На фигуре 17 показана оценка способности антител Campath (Ab против CD52), NEG085 или 20376 не индуцировать ADCC *in vitro* в клетках Uke-1.

На фигуре 18 показано, что NEG085 и 20376 не опосредуют первичный апоптоз тучных клеток человека.

На фигуре 19 показано, что NEG085 и 20376 не опосредуют первичную дегрануляцию тучных клеток человека.

На фигуре 20 показана колокализация IgG1 и митотический блок NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1.

На фигуре 21 показаны тканевые срезы с митотическим блоком (p-гистон H3) и апоптозом (каспаза 3) после однократной дозы ADC против cKIT.

На фигуре 22 графически представлена индукция митотического блока и апоптоза через 8 дней после однократной дозы ADC против cKIT.

На фигуре 23 показана (А) дозозависимая эффективность в ксенотрансплантате GIST T1 мыши и (В) изменение массы тела в течение лечения.

На фигуре 24 графически представлен (А) ELISA с антителами против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1 и (В) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1.

Фигура 25 является таблицей дозозависимого эффекта NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши.

Фигура 26 представляет собой гистологические срезы с дозозависимой эффективностью NEG027-MCC-DM1 в GIST T1. (А) представляет собой суммарные опухоли группы 4, (В) представляет собой суммарные опухоли группы 5.

На фигуре 27 показана (А) эффективность при дозе 0,625мг/кг в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши, (В) изменение объема опухоли по сравнению с контролем (% T/C) и (С) изменение массы тела в течение лечения.

На фигуре 28 показана кластеризация в день 41 после введения однократной дозы ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши.

Фигура 29 является таблицей эффективности ADC против cKIT при низкой эффективной дозе в модели ксенотрансплантата GIST T1.

На фигуре 30 показана (A) PK антитела против cKIT в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (левая панель представляет собой ELISA с антителами против DM1), (B) правая панель представляет собой ELISA с антителами против IgG1 человека.

На фигуре 31 А-С показана (A) активность NEG085-MCC-DM1, NEG024MCC-DM1 и NEG086-MCC-DM1 в модели SCLC, (B) изменение массы тела в течение лечения, (C) экспрессия cKIT в образце опухоли.

Фигура 32 является таблицей исследования эффективности ADC против cKIT в NCI-H1048 SCLC.

На фигуре 33 А-В показан (A) дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC), (B) изменение массы тела в течение лечения.

Фигура 34 является таблицей, в которой представлено исследование эффективности NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-1048 (SCLC) мыши.

На фигуре 35 А-С показана (A) эффективность 20376 и NEG024 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLC) мыши, (B) концентрация антитела в сыворотке после введения дозы и (C) IHC для cKIT, показавшая экспрессию уровней cKIT на опухоли H526.

На фигуре 36 показаны ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких (SCLC).

На фигуре 37 показана эффективность ADC против cKIT в модели ксенотрансплантата AML (Kasumi-1).

На фигуре 38 показана эффективность ADC против cKIT в модель ксенотрансплантата мастоцитоза HMC-1 мыши.

На фигуре 39 А/В показана эффективность перекрестно реагирующих с cKIT мыши 20376-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши с (A) дозой и объемом опухоли и (B) изменением массы тела в течение лечения.

На фигуре 40 А/В показана (А) эффективность перекрестно реагирующих с cKIT мыши 20376-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши -РК и (В) концентрация антитела в сыворотке после введения дозы.

На фигуре 41 показано исследование дозозависимой эффективности при GIST T1 у мышей SCID-beige.

На фигуре 42 А/В показана (А) эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (отсутствие эффективности неконъюгированного антитела) и (В) изменение массы тела в течение лечения.

Фигура 43 представляет собой сравнение эффективности в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (немеченое/MCC-DM1/SPDB-DM4).

На фигуре 44 А/В показана (А) эффективность в модели ксенотрансплантата GIST 430 со сравнением SPDB-DM4 и MCC-DM1 и (В) изменение массы тела в течение лечения

На фигуре 45 показана эффективность в модели GIST 430 у мышей SCID-beige.

Фигура 46 представляет собой фотографии иммуноокрашивания р-гистона H3 после обработки NEG085-MCC-DM1.

Фигура 47 представляет собой график митотического блока, показанного посредством окрашивания р-гистона H3 после введения NEG085-MCC-DM1.

На фигура 48А показано окрашивание на cKIT опухоли GIST T1, на фигуре 48В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1, на фигуре 48С показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фигуре 49А показано окрашивание на cKIT опухоли GIST 430, на фигуре 49В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST 430, на фигуре 49С показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фигуре 50А показано окрашивание cKIT опухоли NCI-H526 (мелкоклеточного рака легких (SCLC)), на фигуре 50В показан дозозависимый эффект NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526, на фигуре 50С показано изменение массы тела изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

На фигуре 51A показано количество IgG1 после введения дозы NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526, фигура 51B представляет собой график ELISA с антителами против DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 после введения дозы NEG085-MCC-DM1.

Фигура 52A представляет собой график, на котором показана эффективность NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата первичного AML мыши, на фигуре 52B показано изменение массы тела мышей, которым вводили NEG085-MCC-DM1.

Фигура 53 представляет собой изображение кристаллической структуры Fab NEG085 в комплексе с доменами 1 и 2 cKIT. Тяжелые цепи Fab показаны темно-серым, легкие цепи Fab показаны белым и домены cKIT показаны светло-серым. Эпитопы и паратопы показаны черным.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

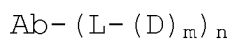
Настоящее изобретение относится к антителам, фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам) и лекарственным конъюгатам антител, связывающимся с cKIT. В частности, настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с cKIT и интернализирующимся после такого связывания. Антитела и фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению можно применять для получения лекарственных конъюгатов антител. Кроме того, настоящее изобретение относится к лекарственным конъюгатам антител, имеющим желаемые фармакокинетические характеристики и другие желаемые свойства, и, таким образом, их можно применять для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего cKIT, в качестве неограничивающих примеров: гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим лекарственные конъюгаты антител, и способам

получения и применения таких фармацевтических композиций для лечения злокачественного новообразования.

Лекарственные конъюгаты антител

Настоящее изобретение относится к лекарственным конъюгатам антител, в которых антитело, антигенсвязывающий фрагмент или его функциональный эквивалент, специфически связывающийся с cKIT, соединяют с остатком лекарственного средства. В одном из аспектов антитела, антигенсвязывающие фрагменты или их функциональные эквиваленты соединяют посредством ковалентного присоединения с помощью линкера с остатком лекарственного средства, являющегося противораковым средством. С помощью лекарственных конъюгатов антител можно избирательно доставлять эффективную дозу противоракового средства (например, цитотоксического средства) в опухолевые ткани, экспрессирующие cKIT, посредством чего можно достигать большей селективности (и более низкой эффективной дозы).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату формулы (I):



Где Ab представляет cKIT-связывающее антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), представленный в настоящем описании;

L является линкером;

D является остатком лекарственного средства;

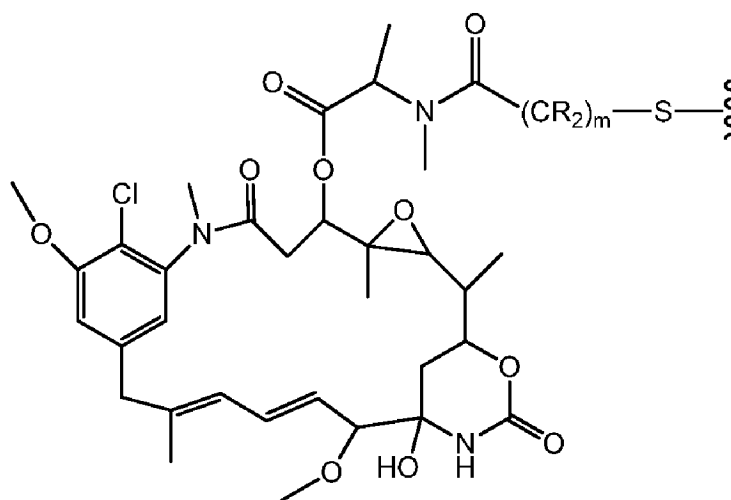
m является целым числом от 1 до 8; и

n является целым числом от 1 до 20. В одном из аспектов n является целым числом от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 5. В конкретном аспекте n составляет от 3 до 4. В некоторых аспектах m представляет собой 1. В некоторых аспектах m представляет собой 2, 3 или 4.

Хотя соотношение лекарственного средства и антитела имеет конкретное целое значение для конкретной молекулы конъюгата (например, n, умноженное на m, в формуле (I)), следует понимать, что значение часто будет являться средним значением при использовании для описания образца, содержащего множество молекул, по причине некоторой степени неоднородности, как

правило, ассоциированной с этапом конъюгации. В настоящем описании среднюю нагрузку для образца иммуноконъюгата обозначают как соотношение лекарственного средства и антитела или "DAR." В случае майтанзиноидов его можно обозначать как соотношение майтанзиноида и антитела или "MAR". В некоторых аспектах DAR составляет от приблизительно 1 до приблизительно 5 и, как правило, составляет приблизительно 3, 3,5, 4, 4,5 или 5. В некоторых аспектах по меньшей мере 50% образца по массе составляет соединение, имеющее среднее $DAR \pm 2$, и предпочтительно – по меньшей мере 50% образца составляет конъюгат, имеющий среднее $DAR \pm 1$. Другие аспекты включают иммуноконъюгаты, где DAR составляет приблизительно 3,5. В некоторых аспектах DAR "приблизительно n" означает, что измеряемое значение DAR составляет в пределах 20% n.

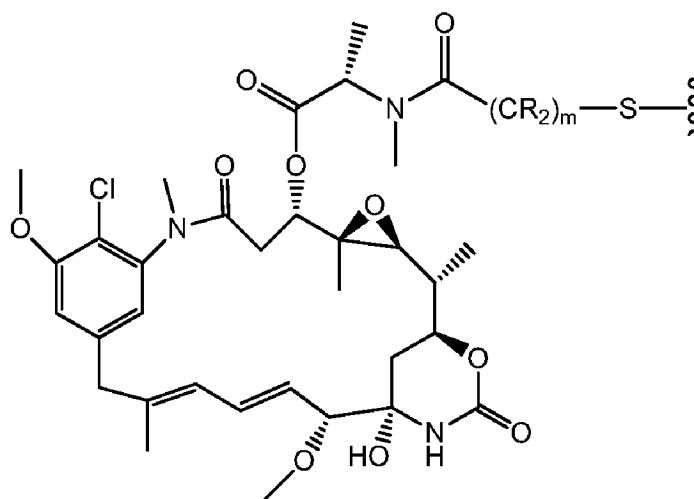
Настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и их функциональный эквиваленты, представленные в настоящем описании, соединенные или конъюгированные с остатком лекарственного средства. В одном из аспектов остаток лекарственного средства D является остатком лекарственного средства майтанзиноида, включая имеющее структуру:



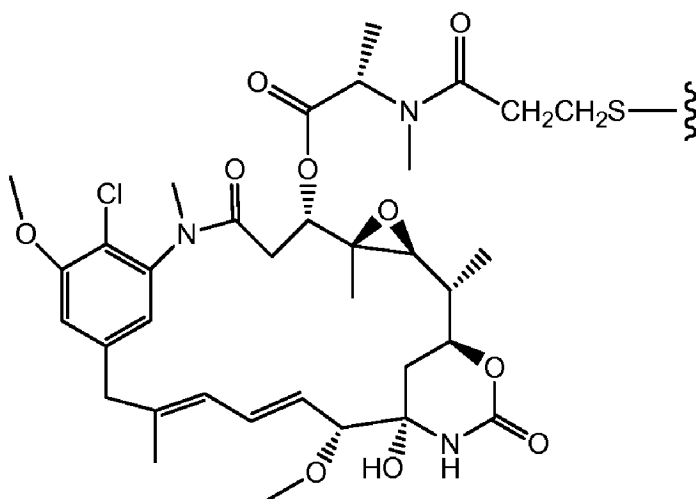
где волнистой линией указано ковалентное соединение атома

серы майтанзиноида с линкером лекарственного конъюгата антитела. В каждом случае R независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил. Алкиленовая цепь, прикрепляющая амидную группу к атому серы, может являться метанилом, этанилом или пропанилом, т.е. m представляет собой 1, 2 или 3 (патент США № 633,410, патент США № 5208020, Chari et al. (1992) Cancer Res. 52; 127-131, Lui et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623).

В описываемые иммуноконъюгаты включены все стереоизомеры остатка лекарственного средства майтанзиноида, т.е. любая комбинация конфигураций R и S в хиральных атомах углерода майтанзиноида. В одном из аспектов остаток лекарственного средства майтанзиноида имеет следующую стереохимию.

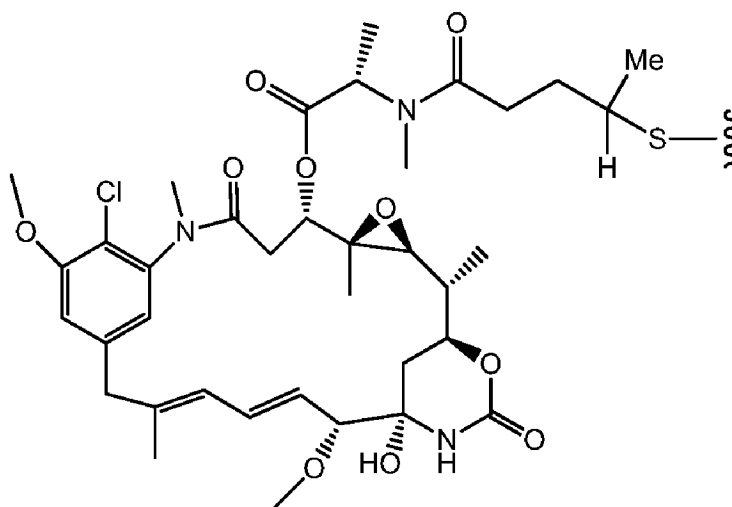


В одном из аспектов остатком лекарственного средства майтанзиноида является N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (также известный как DM1). DM1 представлен следующей структурной формулой.



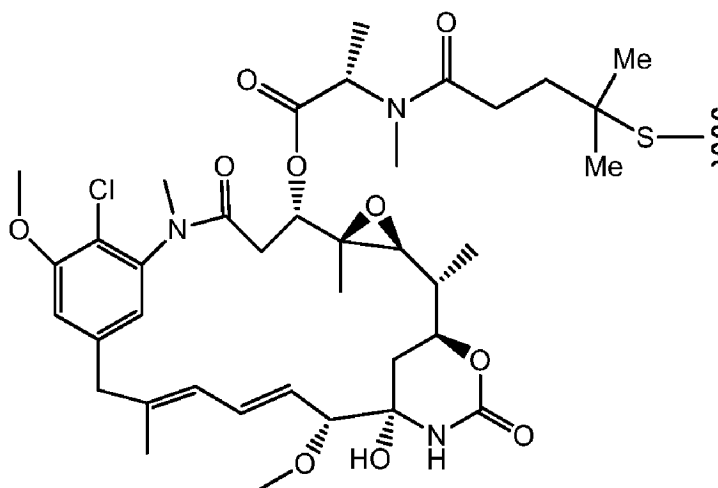
DM1

В другом аспекте остатком лекарственного средства майтанзиноида является N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (также известный как DM3). DM3 представлен следующей структурной формулой.



DM3

В другом аспекте остатком лекарственного средства майтанзиноида является N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (также известный как DM4). DM4 представлен следующей структурной формулой.



DM4

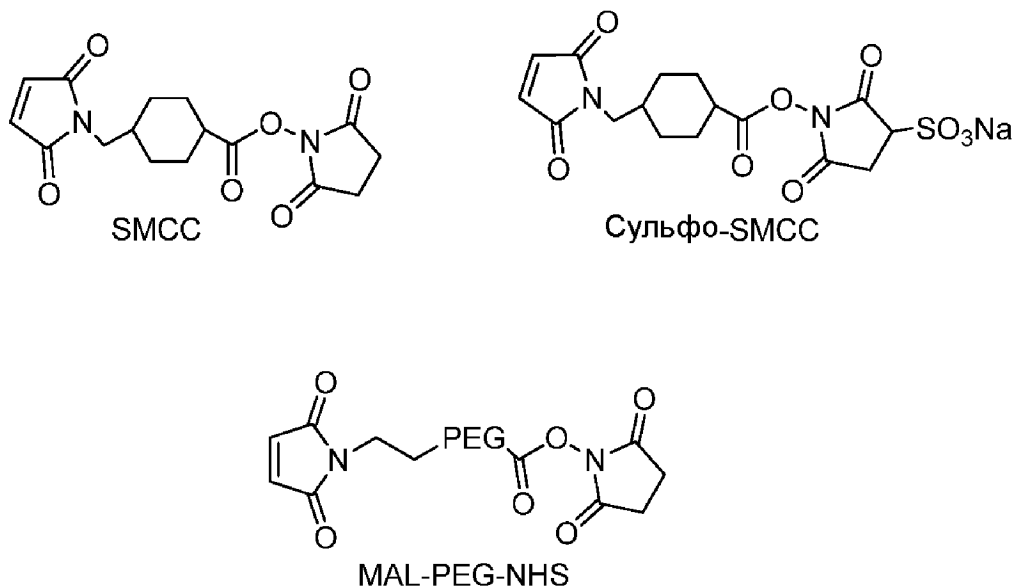
Остаток лекарственного средства D можно соединять с антителом посредством линкера L. L является любым химическим веществом, способным соединять антитело Ab с остатком лекарственного средства D. С помощью линкера L присоединяют антитело Ab к лекарственному средству D посредством ковалентных связей. Линкерный реагент является бифункциональным или многофункциональным остатком, который можно использовать для соединения остатка лекарственного средства D и антитела Ab для получения лекарственных конъюгатов антител. Лекарственные конъюгаты антител можно получать с использованием линкера, имеющего реакционную способность для связывания с остатком лекарственного средства D и антителом Ab. Цистеин, тиол или амин, например, N-конец или боковая цепь аминокислоты, такой как лизин, антитела, может образовывать связь с функциональной группой линкерного реагента.

В одном из аспектов L является расщепляемым линкером. В другом аспекте L является нерасщепляемым линкером. В некоторых аспектах L является кислото-неустойчивым линкером, фотолabileм линкером, линкером, расщепляемым пептидазами, линкером, расщепляемым эстеразами, линкер с восстанавливаемой дисульфидной связью, гидрофильным линкером, заряженным линкером или линкером на основе дикарбоновой кислоты.

Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие

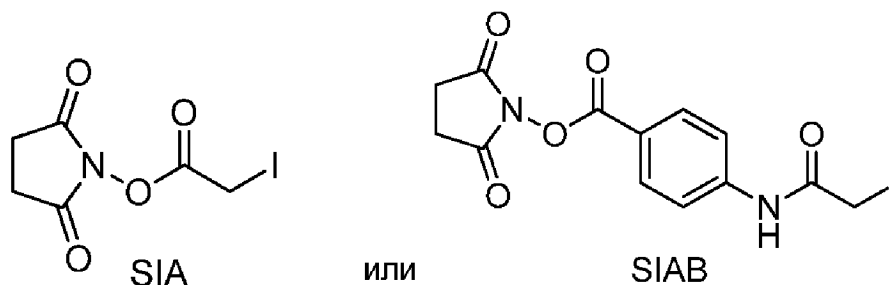
нерасщепляемый линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, хорошо известны в этой области и могут образовывать нерасщепляемые линкеры, содержащие атом серы (такие как SMCC) или не содержащие атом серы. Предпочтительные перекрестносшивающие реагенты, образующие нерасщепляемые линкеры между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, содержат остатки на основе малеинимида или галогенацетила. В соответствии с настоящим изобретением считают, что такие нерасщепляемые линкеры получают из остатков на основе малеинимида или галогенацетила.

Перекрестносшивающие реагенты, содержащие остаток на основе малеинимида, включают, в качестве неограничивающих примеров, N-сукцинимидил-4- (малеинимидометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), сульфосукцинимидил-4- (N-малеинимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4- (малеинимидометил) циклогексан-1-карбокси- (6-амидокапроат), являющийся "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), N-сукцинимидиловый сложный эфир κ -малеинимидоундекановой кислоты (KMUA), N-сукцинимидиловый сложный эфир γ -малеинимидомасляной кислоты (GMBS), N-сукцинимидиловый сложный эфир ε -малеинимидокапроновой кислоты (EMCS), m-малеинимидобензоил-N-гидроксисукцинимид сложный эфир (MBS), N- (a-малеинимидоацетокси) -сукцинимидный сложный эфир (AMSA), сукцинимидил-6- (p-малеинимидопропионамидо) гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил-4- (p-малеинимидофенил) -бутират (SMPB), N- (-p-малеинимидофенил) изоцианат (PMIP) и перекрестносшивающие реагенты на основе малеинимида, содержащие полиэтиленгликолевый спейсер, такие как MAL-PEG-NHS. Эти перекрестносшивающие реагенты образуют нерасщепляемые линкеры, полученные из остатков на основе малеинимида. Типичные структуры перекрестносшивающие реагенты на основе малеинимида представлены ниже.



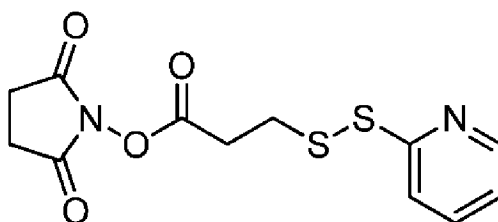
В другом аспекте линкер L получают из N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил) циклогексанкарбоксилата (SMCC), сульфосукцинимидил-4-(N-малеинимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (сульфо-SMCC) или MAL-PEG-NHS.

Перекрестносшивающие реагенты, содержащие остаток на основе галогенацетила, включают N-сукцинимидилйодоацетат (SIA), N-сукцинимидил (4-йодоацетил) аминокбензоат (SIAB), N-сукцинимидил бромацетат (SBA) и N-сукцинимидил-3-(бромацетамидо) пропионат (SBAP). Эти перекрестносшивающие реагенты образуют нерасщепляемый линкер, получаемый из остатков на основе галогенацетила. Типичные структуры перекрестносшивающих реагентов на основе галогенацетила представлены ниже.

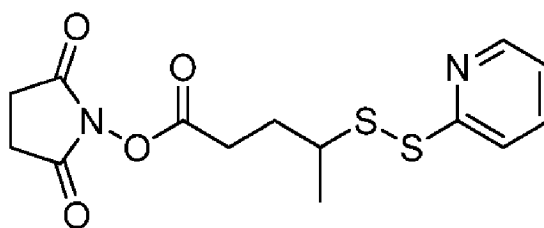


В одном из аспектов линкер L получают из N-сукцинимидилйодоацетата (SIA) или N-сукцинимидил (4-йодоацетил) аминокбензоата (SIAB).

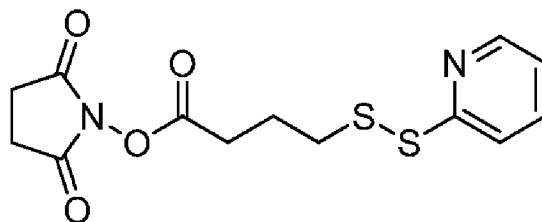
Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие расщепляемый линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, хорошо известны в этой области. Линкеры, содержащие дисульфидные связи, являются линкерами, расщепляемые посредством дисульфидного обмена, который может происходить в физиологических условиях. По настоящему изобретению считают, что такие расщепляемые линкеры получают из остатков на основе дисульфида. Подходящие дисульфидные перекрестносшивающие реагенты включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфо-бутаноат (сульфо-SPDB), структуры которых представлены ниже. Эти дисульфидные перекрестносшивающие реагенты образуют расщепляемые линкер, получаемый из остатков на основе дисульфида.



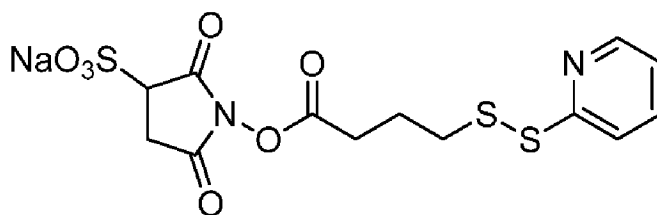
N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP),



N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP),



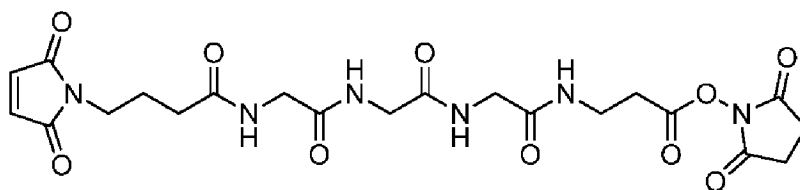
N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) бутаноат (SPDB) и



N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) 2-сульфо-бутаноат (сульфо-SPDB) .

В одном из аспектов линкер L получают из N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) бутаноата (SPDB) .

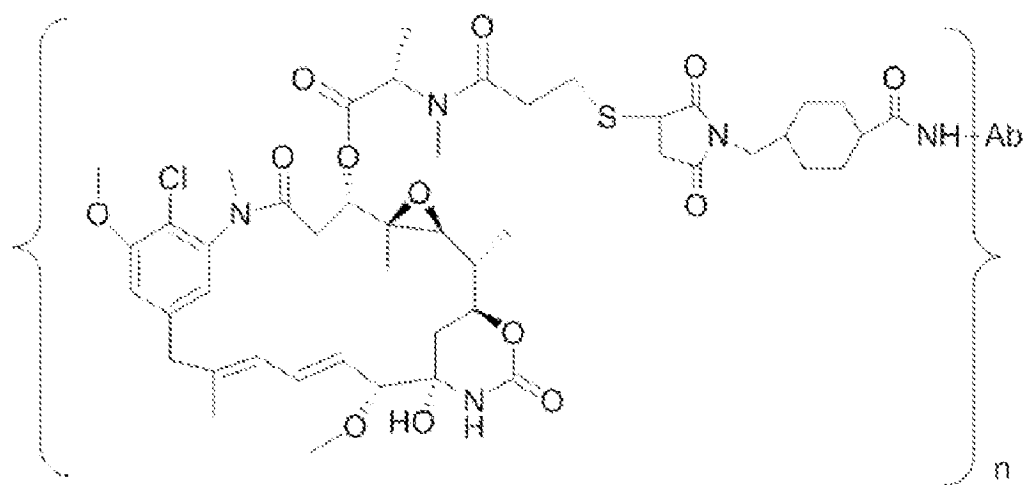
Подходящие перекрестносшивающие реагенты, образующие заряженный линкер между остатком лекарственного средства D, например, майтанзиноидом, и антителом Ab, известны как заряженные перекрестносшивающие реагенты. В одном из аспектов линкер L получают из заряженного перекрестносшивающего реагента, являющегося CX1-1. Структура CX1-1 представлена ниже.



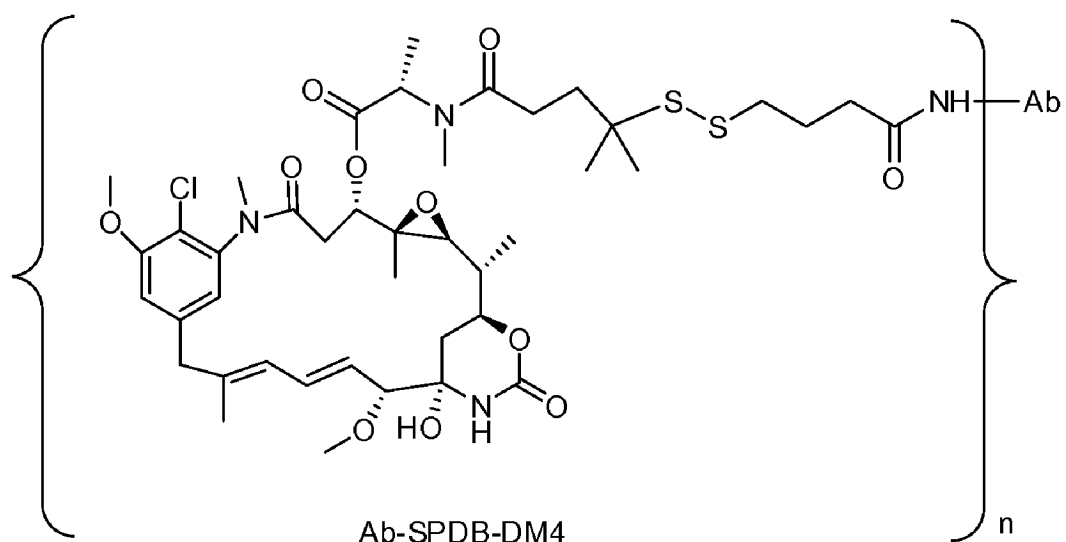
2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1)

В одном из аспектов настоящего изобретения конъюгат

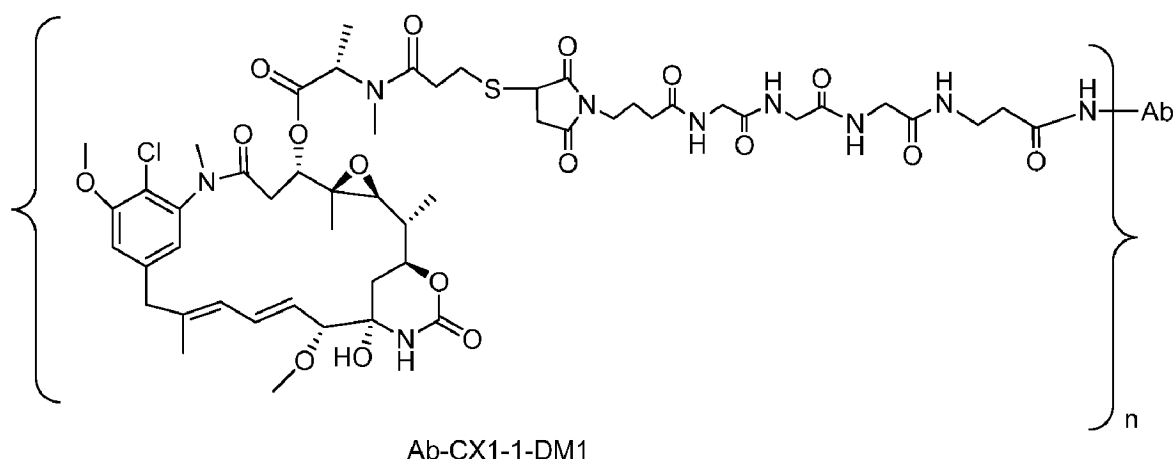
представлен любой из следующих структурных формул:



Ab-MCC-DM1



Ab-SPDB-DM4



где:

Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с cKIT человека;

n, указывающее на количество групп D-L, прикрепленных к Ab посредством образования амидной связи с первичным амином Ab, является целым числом от 1 до 20. В одном из аспектов n является целым числом от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 5. В конкретном аспекте n является 3 или 4.

В одном из аспектов среднее молярное соотношение лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и антитела в конъюгате (т.е. среднее значение w, также известное как соотношение майтанозида и антитела (MAR)) составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0 или 8,1), от приблизительно 2,5 до приблизительно 7, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 2,5 до приблизительно 4,5 (например, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4,

приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9, приблизительно 4,0, приблизительно 4,1, приблизительно 4,2, приблизительно 4,3, приблизительно 4,4, приблизительно 4,5), от приблизительно 3,0 до приблизительно 4,0, от приблизительно 3,2 до приблизительно 4,2 или от приблизительно 4,5 до 5,5 (например, приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4 или приблизительно 5,5).

В одном из аспектов настоящего изобретения конъюгат, по существу, имеет высокую чистоту и обладает одним или несколькими из следующих свойств: (а) более приблизительно 90% (например, более или равно приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), предпочтительно – более приблизительно 95% молекул конъюгата являются мономерными, (b) уровень неконъюгированного линкера в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 10% (например, менее или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%) (относительно общего линкера), (с) менее 10% молекул конъюгата являются перекрестносшитыми (например, менее или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%), (d) уровень свободного лекарственного средства (например, DM1 или DM4) в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 2% (например, менее или равно приблизительно 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% или 0%) (моль/моль относительно общего цитотоксического средства).

Как применяют в настоящем описании, термин "неконъюгированный линкер" относится к антителу, ковалентно связанному с линкером, полученным из перекрестносшивающего реагента (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1), где антитело не является ковалентно соединенным с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) посредством линкера (т.е. "неконъюгированный линкер" может представлять собой Ab-SMCC, Ab-SPDB или Ab-CX1-1).

1. Остаток лекарственного средства

Настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, специфически связывающимся с cKIT. Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат антитела против cKIT, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты, конъюгированные с остатком лекарственного средства, например, противораковым средством, средством против гематологических нарушений, средством для лечения аутоиммунных заболеваний, противовоспалительным средством, противогрибковым средством, антибактериальным средством, антипаразитарным средством, противовирусным средством или анестезирующим средством. Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты можно конъюгировать с несколькими идентичными или разными остатками лекарственных средств с использованием любых известных в этой области способов.

В определенных аспектах остаток лекарственного средства в иммуноконъюгатах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из ингибитора V-ATФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибитора реакций переноса фосфора в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

В одном из аспектов остаток лекарственного средства в иммуноконъюгатах по настоящему изобретению является остатком лекарственного средства майтанзиноида, такого как, в качестве неограничивающих примеров, DM1, DM3 или DM4.

Кроме того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по

настоящему изобретению можно конъюгировать с остатком лекарственного средства, модифицирующего указанный биологический ответ. Остатки лекарственных средств нельзя истолковывать как ограниченные классическими химиотерапевтическими средствами. Например, остаток лекарственного средства может являться белком, пептидом или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas*, холерный токсин или дифтерийный токсин, белок, такой как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, тканевый активатор плазминогена, цитокин, апоптотическое средство, антиангиогенным средством или модификатор биологического ответа, таким как, например, лимфокин.

В одном из аспектов, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгируют с остатком лекарственного средства, такого как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Примеры цитотоксина включают, в качестве неограничивающих примеров, таксаны (см. например, международные патентные заявки (РСТ) №№ WO 01/38318 и РСТ/US03/02675), ДНК-алкилирующие средства (например, аналоги СС-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармицина, ауристатин Е, ауристатин F, майтанзиноиды и цитотоксические средства, содержащие реактивный остаток полиэтиленгликоля (см., например, Sasse et al, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa et al, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura et al, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco et al, Blood 2003 15; 102(4): 1458-65), патенты США №№ 5475092, 6340701, 6372738 и 6436931, публикацию патентной заявки США № 2001/0036923 A1, рассматриваемые патентные заявки США №№ 10/024290 и 10/116053 и международную патентную заявку (РСТ) № WO 01/49698), таксон, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин,

колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), аблирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин C, и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин, антрациклины (например, даунорубицин (ранее известный как дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее известный как актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антimitотические средства (например, винкристин и винбластин) (См. например, Seattle Genetics US20090304721).

Другие примеры цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителами, фрагментами антител (антигенсвязывающими фрагментами) или функциональными эквивалентами по настоящему изобретению, включают дуокармицины, калихимицины, майтанзины и ауристатины и их производные.

Различные типы цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических средств с антителами известны в этой области, см., например, Saito *et al.*, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail *et al.*, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических средств, обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для диагностического или терапевтического применения включают, в

качестве неограничивающих примеров, йод-131, индий-111, иттрий-90 и лютеций-177. Способы получения радиоиммуноконъюгатов известны в этой области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, включая Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) и Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и можно использовать аналогичные способы для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител, представленных в настоящем описании. В определенных аспектах макроциклическим хелатирующим средством является 1,4,7,10-тетреазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота (DOTA), которую можно прикреплять к антителу с помощью линкерной молекулы. Такие линкерные молекулы общеизвестны в этой области и описаны в Denardo et al, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al, (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; и Zimmerman et al, (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно, с полипептидом по меньшей мере из 10, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 30, по меньшей мере из 40, по меньшей мере из 50, по меньшей мере из 60, по меньшей мере из 70, по меньшей мере из 80, по меньшей мере из 90 или по меньшей мере из 100 аминокислот) для получения слитых белков. В частности, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), представленный в настоящем описании (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)2-фрагмент, домен VH, CDR VH, домен VL или CDR VL) и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

Дополнительные слитые белки можно получать способами перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (в совокупности обозначаемых как "ДНК-перетасовка"). ДНК-перетасовку можно осуществлять для изменения активностей антител по настоящему изобретению или их

фрагментов (например, антител или их фрагментов с более высокими аффинностями и более низкими скоростями диссоциации). В общем, см. патенты США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al, (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson et al, (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313 (таким образом, каждый из этих патентов и публикаций включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять, подвергая случайному мутагенезу с помощью ПЦР пониженной точности, инсерции случайных нуклеотидов или других способов до рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, специфически связывающийся с антигеном, можно подвергать рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. из одной или нескольких гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению можно конъюгировать с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных аспектах маркерная аминокислотная последовательность является гекса-гистиридиновым пептидом, таким как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz et al, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, например, гекса-гистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают в качестве неограничивающих примеров, гемагглютининовую ("HA") метку, соответствующую эпитопу, полученному из белка гемагглютинаина вируса гриппа (Wilson et al, (1984) *Cell* 37:767), и метку "FLAG" (A. Einhauser et al, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001). Как представлено в настоящем описании, антитела или антигенсвязывающие фрагменты также можно конъюгировать с пептидами, проникающими в опухоль,

для повышения их эффективности.

В других аспектах антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгируют с диагностическим или детектируемым средством. Такие иммуноконъюгаты могут быть применимы для мониторинга или прогнозирования дебюта, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или нарушения, как часть способа клинического тестирования, такого как определение эффективности конкретной терапии. Такую диагностику и определение можно осуществлять, соединяя антитело с детектируемыми веществами, включая, в качестве неограничивающих примеров, различные ферменты, в качестве неограничивающих примеров, такие как, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, в качестве неограничивающих примеров, люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, в качестве неограничивающих примеров, такие как, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), серу (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{64}Cu , ^{113}Sn и ^{117}Sn ; и позитрон-эмитирующие металлы с использованием различных способов позитрон-эмиссионной томографии, и ионы

нерadioактивных парамагнитных металлов.

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению можно прикреплять к твердым подложкам, особенно подходящим для иммунологических анализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают, в качестве неограничивающих примеров, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

2. Линкер

Как применяют в настоящем описании, "линкер" является любым химическим веществом, способным связывать антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональный эквивалент с другим остатком, таким как остаток лекарственного средства. Линкеры могут являться восприимчивыми к расщеплению (расщепляемый линкер), такому как, вызываемое кислотами расщепление, фото-индуцируемое расщепление, вызываемое пептидазами расщепление, вызываемое эстеразами расщепление и расщепление дисульфидной связи, в условиях, в которых соединение или антитело остается активным. Альтернативно, линкеры могут являться, по существу, устойчивыми к расщеплению (например, стабильный линкер или нерасщепляемый линкер). В некоторых аспектах, линкер является заряженным линкером, гидрофильным линкером или линкером на основе дикарбоновой кислоты.

В одном из аспектов используемый линкер получают из перекрестносшивающего реагента, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфо-бутаноат (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилйодоацетат (SIA), N-сукцинимидил (4-йодоацетил)аминобензоат (SIAB), малеинимид-PEG NHS, N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил 17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-

тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1). В другом аспекте используемый линкер получают из сшивающего средства, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил) циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил) циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфо-бутаноат (сульфо-SPDB) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1).

Нерасщепляемые линкеры являются любым химическим веществом, способным связывать лекарственное средство, такое как майтанзиноид, с антителом стабильным, ковалентным образом и не подпадающим под категории, указанные выше для расщепляемых линкером. Таким образом, нерасщепляемые линкеры являются, по существу, устойчивыми к вызываемому кислотами расщеплению, фото-индуцируемому расщеплению, вызываемому пептидазами расщеплению, вызываемому эстеразами расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Кроме того, термин "нерасщепляемый" относится к способности химической связи в линкере или смежной с линкером быть устойчивой к кислоте, фотолабильному расщепляющему средству, пептидазе, эстеразе или химическому или физиологическому соединению, расщепляющему дисульфидную связь, в условиях, в которых лекарственное средство, такое как майтазонид, или антитело не теряет свою активность.

Кислото-лабильные линкеры являются линкерами, расщепляемыми при кислом pH. Например, конкретные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют кислый pH (pH 4-5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислото-лабильных линкеров.

Фото-лабильные линкеры являются линкерами, применимыми на поверхности тела и во многих полостях тела, доступных для света. Кроме того, инфракрасное излучение может проникать в ткань.

Некоторые линкеры могут расщепляться пептидазами, т.е. расщепляемые пептидазами линкеры. Только конкретные пептиды

легко расщепляются внутри или снаружи клеток, см., например, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 626-629 (1982) и Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Кроме того, пептиды состоят из α -аминокислот и пептидных связей, химически представляющих собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Следует понимать, что другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и ϵ -аминогруппой лизина, не являются пептидными связями, и их считают нерасщепляемыми.

Некоторые линкеры могут расщепляться эстеразами, т.е. расщепляемые эстеразами линкеры. И снова, только конкретные сложные эфиры могут расщепляться эстеразами, присутствующими снаружи и внутри клеток. Сложные эфиры образуются посредством конденсации карбоновой кислоты и спиртов. Простые сложные эфиры являются сложными эфирами, получаемыми с использованием простых спиртов, таких как алифатические спирты, и небольших циклических и небольших ароматических спиртов.

Заряженные линкеры получают из заряженных перекрестносшивающих реагентов, сохраняющих свой заряд после включения в лекарственный конъюгат антитела. Примеры заряженных линкеров можно найти в US 2009/0274713.

3. Конъюгация и получение ADC

Конъюгаты по настоящему изобретению можно получать любыми известными в этой области способами, такими как описываемые в патентах США №№ 7811572, 6411163, 7368565 и 8163888 и публикациях патентных заявок США № 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 и 2012/0259100. Полное содержание этих патентов и публикаций патентных заявок включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Одноэтапный способ

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать одноэтапным способом. Способ включает комбинирование антитела, лекарственного средства и сшивающего средства в, по существу, водной среде, необязательно, содержащей один или несколько соразтворителей, при подходящем pH. В одном из аспектов способ включает этап приведения

антитела по настоящему изобретению в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство, а затем приведение первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство, в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции.

В одном из аспектов одноэтапный способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 6 или выше (например, от приблизительно 6 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 7, от приблизительно 7 до приблизительно 9, от приблизительно 7 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,0, от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,0 или от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,0). Например, способ включает приведение связывающегося с клетками средства в контакт с лекарственным средством (DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9, приблизительно 8,0, приблизительно 8,1, приблизительно 8,2, приблизительно 8,3, приблизительно 8,4, приблизительно 8,5, приблизительно 8,6, приблизительно 8,7, приблизительно 8,8, приблизительно 8,9 или приблизительно 9,0. В другом аспекте способ включает приведение связывающегося с

клетками средства в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH приблизительно 7,8 (например, pH от 7,6 до 8,0 или pH от 7,7 до 7,9).

Одноэтапный способ (т.е. приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1)) можно осуществлять при любой подходящей температуре, известной в этой области. Например, одноэтапный способ можно осуществлять при температуре от приблизительно 20°C или менее (например, приблизительно -10°C (при условии, что предотвращают замерзание раствора, например, посредством включения органического растворителя, используемого для растворения цитотоксического средства и бифункционального перекрестносшивающего реагента) до приблизительно 20°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 18°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C или от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C) или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30°C до приблизительно 37°C). В одном из аспектов одноэтапный способ осуществляют при температуре от приблизительно 16°C до приблизительно 24°C (например, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C, или приблизительно 25°C). В другом аспекте одноэтапный способ осуществляют при температуре приблизительно 15°C или менее (например, от приблизительно -10°C до приблизительно 15°C или от приблизительно 0°C до приблизительно 15°C). Например, способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-

SPDB или CX1-1) при температуре приблизительно 15°C, приблизительно 14°C, приблизительно 13°C, приблизительно 12°C, приблизительно 11°C, приблизительно 10°C, приблизительно 9°C, приблизительно 8°C, приблизительно 7°C, приблизительно 6°C, приблизительно 5°C, приблизительно 4°C, приблизительно 3°C, приблизительно 2°C, приблизительно 1°C, приблизительно 0°C, приблизительно -1°C, приблизительно -2°C, приблизительно -3°C, приблизительно -4°C, приблизительно -5°C, приблизительно -6°C, приблизительно -7°C, приблизительно -8°C, приблизительно -9°C, или приблизительно -10°C, при условии, что предотвращают замерзание раствора, например, посредством включения органических растворителей, используемых для растворения сшивающего средства (например, SMCC, сульфо-SMCC, сульфо-SPDB SPDB или CX1-1). В одном из аспектов способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) при температуре от приблизительно -10°C до приблизительно 15°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 15°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 10°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 5°C, от приблизительно 5°C до приблизительно 15°C, от приблизительно 10°C до приблизительно 15°C или от приблизительно 5°C до приблизительно 10°C. В другом аспекте способ включает приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) при температуре приблизительно 10°C (например, температуре от 8°C до 12°C или температуре от 9°C до 11°C).

В одном из аспектов описываемое выше приведение в контакт осуществляют, получая антитело, затем приводя антитело в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения первой смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), а затем приводя первую смесь,

содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Например, в одном из аспектов антитело помещают в сосуд для проведения реакции, в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) (таким образом, приводя антитело в контакт), а затем к смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), добавляют сшивающее средство (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) (таким образом, приводя смесь, содержащую антитело и лекарственное средство, в контакт). В одном из аспектов, антитело помещают в сосуд для проведения реакции, и в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) непосредственно после помещения антитела в сосуд. В другом аспекте антитело помещают в сосуд для проведения реакции, и в сосуд для проведения реакции добавляют лекарственное средство (например, DM1 или DM4) через временной интервал после помещения антитела в сосуд (например, через приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 50 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 1 день или более после помещения связывающего клетки средства внутрь сосуда). Лекарственное средство (например, DM1 или DM4) можно добавлять быстро (т.е. в пределах короткого временного интервала, такого как приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут) или медленно (например, с использованием насоса).

Затем смесь, содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), можно приводить в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) непосредственно после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) или некоторый более поздний момент времени (например, от приблизительно 5 минут до приблизительно 8 часов или более) после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4). Например, в одном из аспектов сшивающее средство (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1)

добавляют к смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), непосредственно после добавления лекарственного средства (например, DM1 или DM4) в сосуд для проведения реакции, содержащий антитело. Альтернативно, смесь, содержащую антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), можно приводить в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) через приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов или более после приведения антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4).

После приведения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) реакции позволяют происходить в течение приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 часов, приблизительно 22 часов, приблизительно 23 часов, приблизительно 24 часов или более (например, приблизительно 30 часов, приблизительно 35 часов, приблизительно 40 часов, приблизительно 45 часов или приблизительно 48 часов).

В одном из аспектов одноэтапный способ дополнительно включает этап тушения для тушения любого непрореагировавшего лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и/или непрореагировавшего сшивающего средства (например, SMCC,

сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Как правило, этап тушения осуществляют до очистки конъюгата. В одном из аспектов смесь подвергают тушению посредством приведения смеси в контакт с тушащим реагентом. Как применяют в настоящем описании, термин "тушащий реагент" относится к реагенту, реагирующему со свободным лекарственным средством (например, DM1 или DM4) и/или сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). В одном из аспектов для обеспечения того, что любую непрореагировавшую группу (такую как тиол) в лекарственном средстве (например, DM1 или DM4) подвергают тушению, можно использовать тушащие реагенты малеинимид или галогенацетамид, такие как 4-малеинимидомасляная кислота, 3-малеинимидопропионовая кислота, N-этилмалеинимид, йодацетамид или йодацетамидопропионовая кислота. Этап тушения может помогать предотвращать димеризацию лекарственного средства (например, DM1). Димеризованный DM1 может быть трудно удалить. После тушения полярными, заряженными тиол-тушащими реагентами (такими как 4-малеинимидомасляная кислота или 3-малеинимидопропионовая кислота), избыток, непрореагировавший DM1, превращается в полярный, заряженный, водорастворимый аддукт, который можно легко отделять от ковалентно-связанного конъюгата на этапе очистки. Также можно использовать тушение неполярными и нейтральными тиол-тушащими реагентами. В одном из аспектов смесь подвергают тушению, приводя ее в контакт с тушащим реагентом, реагирующим с непрореагировавшим сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Например, для тушения любого непрореагировавшего SMCC в смесь можно добавлять нуклеофилы. Предпочтительно, нуклеофил является аминогруппой, содержащей нуклеофил, такой как лизин, таурин и гидроксилламин.

В другом аспекте реакции (т.е. приведению антитело в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4), а затем сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1)) позволяют происходить до завершения перед приведением смеси в контакт с тушащим реагентом. В связи с этим, тушащий реагент добавляют в смесь через от

приблизительно 1 часа до приблизительно 48 часов (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа или приблизительно 25 часов до приблизительно 48 часов) после приведения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1).

Альтернативно, смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до приблизительно 5,0 (например, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 или 5,2). В другом аспекте смесь подвергают тушению, понижая pH до менее 6,0, менее 5,5, менее 5,0, менее 4,8, менее 4,6, менее 4,4, менее 4,2, менее 4,0. Альтернативно, pH понижают до от приблизительно 4,0 (например, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 или 4,2) до приблизительно 6,0 (например, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 или 6,2), от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,5 (например, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 или 4,7) до приблизительно 5,0. В одном из аспектов смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до 4,8. В другом аспекте смесь подвергают тушению, понижая pH смеси до 5,5.

В одном из аспектов одноэтапный способ дополнительно включает этап выдержки для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из антитела. Этап выдержки включает выдержку смеси перед очисткой конъюгата (например, после этапа реакции, между этапом реакции и этапом тушения или после этапа тушения). Например, способ включает (а) приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство

(например, DM1 или DM4); а затем приведение смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции, (b) выдержку смеси, полученной на этапе (a), для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из связывающегося с клетками средства, и (c) очистку смеси для получения очищенного конъюгата.

В другом аспекте способ включает (a) приведение антитела в контакт с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) для получения смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4); а затем приведение смеси, содержащей антитело и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, содержащей (i) конъюгат, (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции, (b) тушение смеси, полученной на этапе (a), для тушения любого непрореагировавшего лекарственного средства (например, DM1 или DM4) и/или непрореагировавшего сшивающего средства (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1), (c) выдержку смеси, полученной на этапе (b), для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из связывающегося с клетками средства, и (d) очистку смеси для получения очищенного конъюгата (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1).

Альтернативно, этап выдержки можно осуществлять после очистки конъюгата с последующим дополнительным этапом очистки.

В другом аспекте реакции позволяют происходить до завершения перед этапом выдержки. В связи с этим, этап выдержки можно осуществлять приблизительно через интервал от 1 часа до приблизительно 48 часов (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4

часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа или от приблизительно 24 часов до приблизительно 48 часов) после приведения смеси, содержащей антители и лекарственное средство (например, DM1 или DM4), в контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1).

Этап выдержки включает поддержание раствора при подходящей температуре (например, от приблизительно 0°C до приблизительно 37°C) в течение подходящего период времени (например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 8 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 4 часов) для высвобождения нестабильно связавшихся линкеров из антитела при, по существу, отсутствии высвобождения стабильно связавшихся линкеров из антитела. В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре приблизительно 20°C или менее (например, от приблизительно 0°C до приблизительно 18°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C или от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C) или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30°C до приблизительно 37°C). В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 16°C до приблизительно 24°C (например, приблизительно 15°C, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C,

приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C или приблизительно 25°C). В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C (например, приблизительно 0°C, приблизительно 1°C, приблизительно 2°C, приблизительно 3°C, приблизительно 4°C, приблизительно 5°C, приблизительно 6°C, приблизительно 7°C, приблизительно 8°C, приблизительно 9°C или приблизительно 10°C). В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствора при температуре приблизительно 37°C (например, приблизительно 34°C, приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39°C или приблизительно 40°C).

Длительность этапа выдержки зависит от температуры и pH, при которых его осуществляют. Например, длительность этапа выдержки, по существу, можно снижать, осуществляя его при повышенной температуре, при этом максимальная температура ограничена стабильностью конъюгата связывающегося с клетками средства и цитотоксического средства. Этап выдержки может включать поддержание раствора в течение от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 дня (например, приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 22 часов, или приблизительно 24 часов), от приблизительно 10 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 14 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 16 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 18 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 20 часов до приблизительно 24 часов, от

приблизительно 5 часов до приблизительно 1 недели, от приблизительно 20 часов до приблизительно 1 недели, от приблизительно 12 часов до приблизительно 1 недели (например, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, или приблизительно 7 дней) или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 недели.

В одном из аспектов этап выдержки включает поддержание раствора при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение периода по меньшей мере от приблизительно 12 часов до недели. В другом аспекте этап выдержки включает поддержание раствор при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение ночи (например, от приблизительно 12 до приблизительно 24 часов, предпочтительно – приблизительно 20 часов).

Значение pH для этапа выдержки, предпочтительно, составляет от приблизительно 4 до приблизительно 10. В одном из аспектов, значение pH для этапа выдержки составляет приблизительно 4 или более, но менее приблизительно 6 (например, от 4 до 5,9), или приблизительно 5 или более, но менее приблизительно 6 (например, от 5 до 5,9). В другом аспекте значения pH для этапа выдержки находятся в диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 10 (например, от приблизительно 6,5 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 8). Например, значения pH для этапа выдержки могут составлять приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5, или приблизительно 10.

В других аспектах этап выдержки может включать инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 6–7,5 в течение от приблизительно 12 часов до приблизительно 1 недели, инкубацию смеси при 4°C и pH приблизительно 4,5–5,9 в течение от

приблизительно 5 часов до приблизительно 5 дней, или инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 4,5-5,9 в течение от приблизительно 5 часов до приблизительно 1 дня.

Одноэтапный способ, необязательно, может включать добавление сахарозы на этапе реакции для повышения растворимости и выделения конъюгатов. Желательно, сахарозу добавляют в концентрации от приблизительно 0,1% (масс./об.) до приблизительно 20% (масс./об.) (например, приблизительно 0,1 % (масс./об.), 1% (масс./об.), 5% (масс./об.), 10% (масс./об.), 15% (масс./об.) или 20% (масс./об.)). Предпочтительно, сахарозу добавляют в концентрации от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 10% (масс./об.) (например, приблизительно 0,5% (масс./об.), приблизительно 1% (масс./об.), приблизительно 1,5% (масс./об.), приблизительно 2% (масс./об.), приблизительно 3% (масс./об.), приблизительно 4% (масс./об.), приблизительно 5% (масс./об.), приблизительно 6% (масс./об.), приблизительно 7% (масс./об.), приблизительно 8% (масс./об.), приблизительно 9% (масс./об.), приблизительно 10% (масс./об.) или приблизительно 11% (масс./об.)). Кроме того, этап реакции также может включать добавление буферного средства. Можно использовать любое подходящее буферное средство, известное в этой области. Подходящие буферные средства включают, например, цитратный буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер и фосфатный буфер. В одном из аспектов буферное средство выбрано из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты)), POPSO (дегидрата пиперазин-1,4-bis-(2-гидрокси-пропан-сульфоновой кислоты)), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты), HEPPS (EPPS) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновой кислоты), TES (N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновой кислоты) и их комбинации.

Одноэтапный способ дополнительно может включать этап очистки смеси для получения очищенного конъюгата (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1). Для очистки конъюгатов по настоящему изобретению можно использовать любые способы

очистки, известные в этой области. В одном из аспектов для конъюгатов по настоящему изобретению используют тангенциальную поточную фильтрацию (TFF), неадсорбционную хроматографию, адсорбционную хроматографию, адсорбционную фильтрацию, селективное осаждение или любой другой подходящий способ очистки, а также их комбинации. В другом аспекте перед подверганием конъюгатов описываемой выше очистке, их сначала фильтруют через одну или несколько PVDF мембран. Альтернативно, конъюгаты фильтруют через одну или несколько PVDF мембран после подвергания конъюгатов описываемой выше очистке. Например, в одном из аспектов конъюгаты фильтруют через одну или несколько PVDF мембран, а затем очищают с использованием тангенциальной поточной фильтрации. Альтернативно, конъюгаты очищают с использованием тангенциальной поточной фильтрации, а затем фильтруют через одну или несколько PVDF мембран.

Для очистки можно использовать любые подходящие системы TFF, включая систему типа Pellicon® (Millipore, Billerica, MA), кассетную систему Sartocan® (Sartorius AG, Edgewood, NY) и систему типа Centrasette® (Pall Corp., East Hills, NY).

Для очистки можно использовать любую подходящую смолу для адсорбционной хроматографии. Предпочтительные способы адсорбционной хроматографии включают хроматографию на гидроксипатите, гидрофобную хроматографию с индукцией заряда (HCIC), хроматографию с гидрофобными взаимодействиями (HIC), ионообменную хроматографию, комбинированную ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC), хроматографию с красителем-лигандом, аффинную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию и их комбинации. Примеры подходящих гидроксипатитных смол включают керамический гидроксипатит (СНТ типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), гидроксипатит HA Ultrogel® (Pall Corp., East Hills, NY) и керамический фторпатит (CFT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примером подходящей смолы для HCIC является смола MEP Hypercel® (Pall Corp., East Hills, NY). Примеры подходящих смол для HIC включают бутил-сефарозную,

гексил-сефарозную, фенил-сефарозную и октил-сефарозную смолы (все от GE Healthcare, Piscataway, NJ), а также метиловую смолу Macro-prep® и трет-бутиловую смолу Macro-Prep® (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих ионообменных смол включают смолы SP-Sepharose®, CM-Sepharose® и Q-Sepharose® (все от GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Unosphere® S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих комбинированных ионообменных материалов включают смолу Bakerbond® ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Примеры подходящих смол для IMAC включают смолу Chelating Sepharose® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Profinity® IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих смол с красителем-лигандом включают смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих аффинных смол включают сефарозную смолу с протеином А (например, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) и лектиновые аффинные смолы, например, смолу Lentil Lectin Sepharose® (GE Healthcare, Piscataway, NJ), где антитело несет соответствующие лектин-связывающие участки. Примеры подходящих смол для обращенно-фазовой хроматографии включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Для очистки можно использовать любую подходящую смолу для неадсорбционной хроматографии. Примеры подходящих смол для неадсорбционной хроматографии включают, в качестве неограничивающих примеров, смолы SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEX™ (например, SUPERDEX™ 75 и SUPERDEX™ 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60, и P-100) и другие смолы, известные специалистам в этой области.

Двухэтапный способ и способ, осуществляемый в одном реакционном сосуде

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать, как описано в патенте США № 7811572 и публикации патентной заявки США № 2006/0182750. Способ включает этапы (а) приведения антитела по настоящему изобретению в

контакт со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1) для ковалентного присоединения линкера (т.е. Ab-SMCC, Ab-SPDB или Ab-CX1-1) к антителу и, таким образом, получения первой смеси, содержащей антитело со связавшимся с ним линкером; (b) необязательно, подвергания первой смеси очистке для получения очищенной первой смеси антитела со связавшимся с ним линкером; (c) конъюгирования лекарственного средства (например, DM1 или DM4) с антителом со связавшимся с ним линкером в первой смеси посредством осуществления реакции антитела со связавшимся с ним линкером с лекарственным средством (например, DM1 или DM4) в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения второй смеси, содержащей (i) конъюгат (например, Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 или Ab-CX1-1-DM1), (ii) свободное лекарственное средство (например, DM1 или DM4) и (iii) побочные продукты реакции; и (d) подвергания второй смеси очистке для очистки конъюгата от других компонентов второй смеси. Альтернативно, можно пропускать этап очистки (b). Для этапов (b) и (d) можно использовать любые способы очистки, представленные в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления для этапов (b) и (d) используют TFF. В другом варианте осуществления для этапа (b) используют TFF и для этапа (d) используют абсорбционную хроматографию (например, СНТ).

Одноэтапный реагент и способ in situ

В одном из аспектов конъюгаты по настоящему изобретению можно получать посредством конъюгирования заранее полученного соединения лекарственное средство-линкер (например, SMCC-DM1, сульфо-SMCC-DM1, SPDB-DM4 или CX1-1-DM1) с антителом по настоящему изобретению, как описано в патенте США 6441163 и публикациях патентных заявок США №№ 2011/0003969 и 2008/0145374, с последующим этапом очистки. Можно использовать любые способы очистки, представленные в настоящем описании. Соединение лекарственное средство-линкер получают, проводя реакцию лекарственного средства (например, DM1 или DM4) со сшивающим средством (например, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB, сульфо-SPDB или CX1-1). Соединение лекарственное средство-линкер

(например, SMCC-DM1, сульфо-SMCC-DM1, SPDB-DM4 или CX1-1-DM1), необязательно, подвергают очистке перед конъюгированием с антителом.

4. Определение характеристик и селекция желаемых антител и лекарственных конъюгатов антител

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или лекарственные конъюгаты антител по настоящему изобретению можно охарактеризовывать и выбирать по их физическим/химическим свойствам и/или видам биологической активности с помощью различных анализов, известных в этой области.

Например, антитело по настоящему изобретению можно тестировать на его антигенсвязывающую активность известными способами, такими как ELISA, FACS, Biacore или вестерн-блоттинг.

Трансгенные животные и клеточные линии особенно подходят для скрининга лекарственных конъюгатов антител (ADC), обладающих потенциалом в качестве профилактического или терапевтического лечения злокачественного новообразования, гиперэкспрессирующего опухолеспецифические антигены и рецепторы поверхности клетки. Скрининг на применимые ADC может включать введение трансгенному животному тестируемых ADC в диапазоне доз и анализ в различные моменты времени эффектов ADC в отношении оцениваемого заболевания или нарушения. Альтернативно или дополнительно, в соответствующих случаях лекарственное средство можно вводить перед или одновременно с воздействием индуктора заболевания. Тестируемые ADC можно подвергать скринингу серийно и отдельно, или параллельно в средне- или высокопроизводительном формате скрининга.

Один из аспектов относится к способу скрининга, включающему (a) трансплантацию клеток из стабильной линии злокачественных клеток или опухоли пациента-человека, экспрессирующей cKIT (например, клеточной линии или фрагмента опухоли GIST, клеточной линии или фрагмента опухоли меланомы, первичных клеток AML) в не относящееся к человеку животное, (b) введение тестируемого лекарственного средства ADC не

относящемуся к человеку животному и (с) определение способности кандидата ингибировать рост опухолей из трансплантируемой клеточной линии. Настоящее изобретение также включает способ скрининга тестируемых ADC для лечения заболевания или нарушения, отличающегося гиперэкспрессией cKIT, включающий (а) приведение клеток из стабильной линии злокачественных клеток, экспрессирующих cKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством и (b) оценку способности тестируемого ADC ингибировать рост стабильной клеточной линии.

Другой аспект относится к способу скрининга, включающему (а) приведение клеток из стабильной линии злокачественных клеток, экспрессирующих cKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством ADC и (b) оценку способности тестируемого ADC блокировать активацию лиганда cKIT. В другом аспекте оценивают способность тестируемого ADC блокировать стимулированное лигандом фосфорилирование тирозина.

Дополнительный аспект относится к способу скрининга, включающему (а) приведение клеток из стабильной линии злокачественных клеток, экспрессирующих cKIT, в контакт с тестируемым лекарственным средством ADC и (b) оценку способности тестируемого ADC индуцировать гибель клеток. В одном из аспектов оценивают способность тестируемого ADC индуцировать апоптоз.

Тестируемое ADC можно подвергать скринингу, вводя его трансгенному животному в диапазоне доз и оценивая физиологический ответ животного на соединения с течением времени. В некоторых случаях, подходящим может являться введение соединения в комбинации с кофакторами, которые будут повышать эффективность соединения. Если для скрининга на ADC, применимые в лечении различных нарушений, ассоциированных с гиперэкспрессией cKIT, используют клеточные линии, получаемые из исследуемых трансгенных животных, тестируемые ADC добавляют в среду для культивирования клеток в соответствующий момент времени и оценивают клеточный ответ на ADC с течением времени с использованием соответствующих биохимических и/или гистологических анализов.

Таким образом, настоящее изобретение относится к анализам для идентификации ADC, специфичных к cKIT и связывающихся с cKIT, и гиперэкспрессии cKIT на опухолевых клетках.

Антитела против cKIT

Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT человека. Антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению включают, в качестве неограничивающих примеров, моноклональные антитела человека или их фрагменты, выделенные, как описано в примерах ниже.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 28, 46, 64, 82, 100, 118 или 136 (таблица 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат CDR VH, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенной в таблице 1. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, содержащим (или альтернативно, состоящим из) одну, две, три, четыре, пять или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, приведенных в таблице 1 ниже.

Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 37, 55, 73, 91, 109, 127 или 145 (таблица 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или фрагментам антител (например,

антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат CDR VL, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VL, приведенной в таблице 1 ниже. В частности, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), специфически связывающимся с cKIT, указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат (или альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VL, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VL, приведенных в таблице 1.

Другие антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению включают аминокислоты, подвергнутые мутагенезу, но имеющие по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичности в областях CDR по отношению к областям CDR, приведенным в последовательностях, описываемых в таблице 1. В некоторых аспектах они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот подвергнуты мутагенезу в областях CDR по сравнению с областями CDR, приведенными в последовательностях, описываемых в таблице 1.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, специфически связывающих с cKIT. Такие последовательности нуклеиновой кислоты можно оптимизировать для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таблица 1

Примеры антител против cKIT

<u>9P3</u>		
SEQ ID NO 3: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 4:	HCDR2	NINYDGSSTYYLDSLKS

(Kabat)		
SEQ ID NO 5: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 6: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 7: (Chothia)	HCDR2	NYDGSS
SEQ ID NO 8: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 9:	VH	EVRLVESEGGLVQPRSSMKLSCTASGFTFSDYY MAWVRQVPEKGLEWVANINYNIGSSTYYLDSLKS RFIIISRDNAKNILYLQMSSLKSEDTATYYCARG DYYGTTYWYFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO 10	Константная область тяжелой цепи	VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO 11:	Тяжелая цепь (гуманизи- рованное)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKLEWVANINYNIGSSTYYLDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 12: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 13: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS

SEQ ID NO 14: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 15: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 16: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 17: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 18:	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYL NWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKKLWSFGG GTKLEIKR
SEQ ID NO:19	Константная область легкой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 20:	Легкая цепь (гуманизи- рованное VK1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 21:	ДНК легкой цепи (гуманизи- рованное VK3 NEG009)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISLLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ

		GLSSPVTKSFNRGEC
<u>NEG024</u>		
SEQ ID NO 22: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 23: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 24: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 25: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 26: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 27: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 28:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYLDSVRG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 29:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYLDSVRG RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 30:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC

		AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 31: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 32: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 33: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 34: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 35: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 36: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 37:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISILEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 38:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISILEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 39:	ДНК легкой цепи	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCC AGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGC CTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC

		CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<u>NEG026</u>		
SEQ ID NO 40: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 41: (Kabat)	HCDR2	NINQNTGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 42: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 43: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 44: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 45: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 46:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKLEWVANINQNTGSTYYVDSVQG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 47:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKLEWVANINQNTGSTYYVDSVQG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 48:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAAACACC GGCAGCACCTACTACGTGGACAGCGTGCAAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGA CCCTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA

		GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 49: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 50: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 51: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 52: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 53: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 54: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 55:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 56:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

		CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 57:	ДНК легкой цепи	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCC AGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGC CTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<u>NEG027</u>		
SEQ ID NO 58: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 59: (Kabat)	HCDR2	SINQNTGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 60: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 61: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 62: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 63:	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV

(Chothia)		
SEQ ID NO 64:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO 65:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 66:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGGCCAGTATCAACCAAAACACC GGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGCGAGGC CGGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCC

		GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGA CCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 67: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 68: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 69: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 70: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 71:	LCDR2	YTS

(Chothia)		
SEQ ID NO 72: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 73:	VL	EIVMTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISLLEPEDFAVYYCQQGKKLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 74:	Легкая цепь	EIVMTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISNYL NWKYQQKPGQAPRLLIYYTSRLQSGIPARFSGSG SGTDYTLTISLLEP EDFAVYYCQQGKKLWSFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO 75:	ДНК легкой цепи	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCC AGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGC CTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC CAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC

NEG085		
SEQ ID NO 76: (Kabat)	HCDR1	GYMA
SEQ ID NO 77: (Kabat)	HCDR2	NINYPGSSTYYLDSVKG
SEQ ID NO 78: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 79: (Chothia)	HCDR1	GFAFSGY
SEQ ID NO 80: (Chothia)	HCDR2	NYPGSS
SEQ ID NO 81: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 82:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGY MAWVRQAPGKGLEWVANINYPGSSTYYLDSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 83:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGY MAWVRQAPGKGLEWVANINYPGSSTYYLDSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 84:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCGCCTTACGCGGCTACTAC ATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC

		TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 85: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 86: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 87: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 88: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 89: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 90: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 91:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWKYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 92:	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWKYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 93:	ДНК легкой цепи	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGA

		GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<u>NEG086</u>		
SEQ ID NO 94: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 95: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 96: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 97: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 98: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 99: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 100:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYVDSVQG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO 101:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVANINQIAGSTYYVDSVQG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC

					PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ 102:	ID	NO	ДНК цепи	тяжелой	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAATCGCC GGCAGCACCTACTACGTGGACAGCGTGCAAGGC CGGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTCAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG TCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGA CCCTCCGTGTTCTTGTTCACCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG

		TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 103: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 104: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 105: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 106: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 107: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 108: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 109:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYL NWKYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 110:	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYL NWKYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG

					SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 111:			ДНК легкой цепи		GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
<u>NEG087</u>					
SEQ ID NO 112: (Kabat)			HCDR1		DYYMA
SEQ ID NO 113: (Kabat)			HCDR2		SINQNTGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 114: (Kabat)			HCDR3		GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 115: (Chothia)			HCDR1		GFTFSDY

SEQ ID NO 116: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 117: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 118:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 119:	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MAWVRQAPGKGLEWVASINQNTGSTYYLDSVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG DYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 120:	ДНК тяжелой цепи	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACTAC ATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGGTGGCCAGTATCAACCAAAACACC GGCAGCACCTACTACCTGGACAGCGTGCGAGGC CGGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAC AGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACTACTGGTACTTCGAC GTGTGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTCAGC

SEQ ID NO 123: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 124: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 125: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 126: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 127:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIK
SEQ ID NO 128:	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRRLWSFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 129:	ДНК легкой цепи	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGC AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCCGCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGA GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC

		AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
20376		
SEQ ID NO 130: (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO 131: (Kabat)	HCDR2	GIIPMSGRTTYAQKFQG
SEQ ID NO 132: (Kabat)	HCDR3	DYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 133: (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
SEQ ID NO 134: (Chothia)	HCDR2	IPMSGR
SEQ ID NO 135: (Chothia)	HCDR3	DYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 136:	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARD YGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDPWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 137:	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARD YGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDPWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

					TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ENSGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ 138:	ID	NO	ДНК цепи	тяжелой	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTG AAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGT AAAGCTAGTGGGGGCACCTTCTCTAGCTACGCT ATTAGCTGGGTGACAGGCCCCAGGTCAAGGC TTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATGAGC GGTAGAACTACCTACGCTCAGAAATTTGAGGGT AGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGC ACCGCCTATATGGAAGTGTCTCTGAGGTCA GAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAC TACGGCCCCGAGGCCCCCGACTACGGTCAATCA ACTAGCTACTTCTGGTACTACGCCTTCGACCCT TGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACCGTGTCTTCA GCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACT GCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGG GCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC AGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCC CCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TCGGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCA GAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC

		GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO 139: (Kabat)	LCDR1	SGDNIPSYFVH
SEQ ID NO 140: (Kabat)	LCDR2	DDNDRPS
SEQ ID NO 141: (Kabat)	LCDR3	SSWDQDTV
SEQ ID NO 142: (Chothia)	LCDR1	DNIPSYF
SEQ ID NO 143: (Chothia)	LCDR2	DDN
SEQ ID NO 144: (Chothia)	LCDR3	WDQDTV
SEQ ID NO 145:	VL	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVH WYQQKPGQAPVLVIYDDNDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQDTVVFVG GTKLTVL
SEQ ID NO 146:	Легкая цепь	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVH WYQQKPGQAPVLVIYDDNDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQDTVVFVG

					GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ 147:	ID	NO	ДНК цепи	легкой	GATATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGTCAGCCCTGGTCAAACCGCCTCTATCACCTGTAGCGGCGATAATATCCCTAGCTACTTCGTGCAC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGTCAAGCCCCCGTGCTGGTGATCTACGACGATAACGATAGACCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGACTATTAGCGGCACTCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCTAGCTGGGATCAGGACACCGTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGTGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACC GAGTGCAGC

Другие антитела по настоящему изобретению включают антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, подвергнуты мутагенезу, но имеют по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичности по отношению к последовательностям, описываемым в таблице 1. В некоторых аспектах они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в переменных областях подвергнуты мутагенезу по сравнению с переменными областями, приведенными в последовательностях, описываемых в таблице 1, одновременно сохраняя, по существу, ту же терапевтическую активность.

Т.к. каждое из этих антител может связываться с cKIT, последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) можно "смешивать и сопоставлять" для получения других cKIT-связывающих антител. Такие "смешанные и сопоставленные" cKIT-связывающие антитела можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в этой области (например, ELISA и другие анализы, описываемых в примерах). Когда эти цепи смешивают и сопоставляют, последовательность VH из конкретной пары VH/VL необходимо заменять структурно схожей последовательностью VH. Аналогично, последовательность полноразмерной тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь необходимо заменять структурно схожей последовательностью полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично, последовательность VL из конкретной пары VH/VL необходимо заменять структурно схожей последовательностью VL. Аналогично, последовательность полноразмерной легкой цепи из конкретной пары полноразмерная тяжелая цепь/полноразмерная легкая цепь необходимо заменять структурно схожей последовательностью полноразмерной легкой цепи. Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей области, имеющей: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 28, 46, 64, 82, 100, 118 или 136 (таблица 1); и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 37, 55, 73, 91, 109, 127 или 145 (таблица 1); где антитело специфически связывается с cKIT.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к (i) выделенному моноклональному антителу, имеющему: полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, оптимизированную для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 29, 47, 65, 83, 101, 119 или 137; и полноразмерную легкую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, оптимизированную для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 38, 56, 74, 92, 110, 128 или 146; или (ii) функциональному белку, содержащему его антигенсвязывающую часть.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к сKIT-связывающим антителам, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в таблице 1, или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 VH антител приведены в SEQ ID NO: 3, 22, 40, 58, 76, 94, 112 и 130. Аминокислотные последовательности CDR2 VH антител приведены в SEQ ID NO: 4, 23, 41, 59, 77, 95, 113 и 131. Аминокислотные последовательности CDR3 VH антител приведены в SEQ ID NO: 5, 24, 42, 60, 78, 96, 114 и 132. Аминокислотные последовательности CDR1 VL антител приведены в SEQ ID NO: 12, 31, 49, 67, 85, 103, 121 и 139. Аминокислотные последовательности CDR2 VL антител приведены в SEQ ID NO 13, 32, 50, 68, 86, 104, 122 и 140. Аминокислотные последовательности CDR3 VL антител приведены в SEQ ID NO: 14, 33, 51, 69, 87, 105, 123 и 141.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с сKIT, и что антигенсвязывающую специфичность обеспечивают, главным образом, области CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL можно "смешивать и сопоставлять" (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и сопоставлять, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, 2 и 3 VH и CDR1, 2 и 3 VL для получения других C5-связывающих молекул). Такие "смешанные и сопоставленные" сKIT-связывающие антитела можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в этой области и описываемых в примерах (например, ELISA). При смешивании и сопоставлении последовательностей CDR VH последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH необходимо заменять структурно схожими последовательностями CDR. Аналогично, при смешивании и сопоставлении последовательностей VL CDR последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной

последовательности VL необходимо заменять структурно схожими последовательностями CDR. Специалистам в этой области будет очевидно, что новые последовательности VH и VL можно получать, заменяя одну или несколько последовательностей областей CDR VH и/или VL структурно схожими последовательностями из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании для моноклональных антител по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей области, содержащей CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 22, 40, 58, 76, 94, 112 и 130; CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 23, 41, 59, 77, 95, 113 и 131; CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 24, 42, 60, 78, 96, 114 и 132; CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 31, 49, 67, 85, 103, 121 и 139; CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 32, 50, 68, 86, 104, 122 и 140; и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 33, 51, 69, 87, 105, 123 и 141; где антитело специфически связывается с cKIT.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 12; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 13 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 14.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 22, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 24; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 31; CDR2 легкой цепи SEQ ID

NO: 32 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 33.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 40, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 41; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 42; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 49; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 50 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 51.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 58, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 59; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 60; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 67; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 68 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 69.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 76, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 77; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 78; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 85; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 86 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 87.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 94, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 95; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 96; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 103; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 104 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 105.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 112, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 113; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 114; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 121; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 122 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 123.

В конкретном аспекте антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), специфически связывающегося с cKIT, содержит CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 130, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 131; CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 132; CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 139; CDR2 легкой цепи SEQ

ID NO: 140 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 141.

В определенных аспектах антитело, специфически связывающееся с cKIT, является антителом или фрагментом антитела (например, антигенсвязывающим фрагментом), описываемым в таблице 1.

1. Идентификация эпитопов и антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом

Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с эпитопом во внеклеточном домене рецептора cKIT. В определенных аспектах антитела и фрагменты антител могут связываться с эпитопами в доменах 1-3 внеклеточного домена cKIT.

Настоящее изобретение также относится к антителам и фрагментам антител (например, антигенсвязывающим фрагментам), связывающимся с тем же эпитопом, что и антитела против cKIT, описываемые в таблице 1. Таким образом, дополнительные антитела и фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) можно идентифицировать с учетом их способности перекрестно конкурировать (например, полностью ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания cKIT. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) по настоящему изобретению с белком cKIT (например, cKIT человека) свидетельствует о том, что тестируемое антитело может конкурировать с тем антителом или фрагментом антитела (например, антигенсвязывающими фрагментами) за связывание с cKIT; согласно неограничивающей теории, такое антитело может связываться с тем же или родственным (например, структурно схожим или пространственно близким) эпитопом на белке cKIT, что и антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты), с которым оно конкурирует. В определенном аспекте антитело, связывающееся с тем же эпитопом на cKIT, что и антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению, является моноклональным антителом человека или

гуманизированным моноклональным антителом. Такие моноклональные антитела человека или гуманизированные моноклональные антитела можно получать и выделять, как представлено в настоящем описании.

2. Дополнительное изменение каркаса Fc-области

Настоящее изобретение относится к сайт-специфичным меченым иммуноконъюгатам. Эти иммуноконъюгаты могут содержать модифицированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, дополнительно содержащие модификации в каркасных остатках в VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является "обратная мутация" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, подвергнутое соматической мутации, может содержать каркасные остатки, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой получают антитело. Такие остатки можно идентифицировать, сравнивая последовательности каркаса антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получают антитело. Для возвращения последовательностей каркасной области в ее конфигурацию зародышевой линии соматические мутации можно подвергать "обратной мутации" в последовательность зародышевой линии, например, посредством сайт-специфического мутагенеза. Такие антитела "с обратной мутацией" также предназначены для включения в настоящее изобретения.

Другой тип модификации каркаса включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы, таким образом, снижать потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также обозначают как "деиммунизация" и подробно описывают в патентной публикации США № 2003/0153043 Carr et al.

Дополнительно или альтернативно модификациям, осуществляемым в каркасных областях или областях CDR, можно конструировать антитела, включающие модификации в Fc-области,

как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело можно химически модифицировать (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических остатков) или модифицировать для изменения его гликозилирования также для изменения одного или нескольких функциональных свойств антител. Каждый из этих аспектов подробно описывают ниже.

В одном из аспектов шарнирную область CH1 модифицируют таким образом, что изменяют количество остатков цистеина в шарнирной области, например, повышают или снижают. Этот подход описывают в патенте США № 5677425 Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом аспекте шарнирную область Fc антитела подвергают мутагенезу для снижения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот встраивают в пограничную область домена CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнирная область таким образом, что антитело имеет нарушенное связывание со стафилококковым протеином А (SpA) относительно связывания SpA нативным Fc-шарнирным доменом. Этот подход подробно описывают в патенте США № 6165745 Ward et al.

В других аспектах Fc-область изменяют, заменяя по меньшей мере один аминокислотный остаток другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, например, может являться Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход описывают, например, в патентах США №№ 5624821 и 5648260 Winter et al.

В другом аспекте одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или устраненную обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC). Этот подход описывают, например, в патенте США № 6194551 Idusogie et al.

В другом аспекте изменяют один или несколько аминокислотных остатков, чтобы, таким образом, изменять способность антитела фиксировать компонент. Этот подход описывают, например, в публикации РСТ № WO 94/29351 Bodmer et al. В конкретном аспекте одну или несколько аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменяют одним или несколькими аллотипичными аминокислотными остатками для подкласса IgG1 и каппа-изотипа. Аллотипичные аминокислотные остатки также включают, в качестве неограничивающих примеров, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи каппа-изотипа, как описывают в Jefferis et al, MAbs. 1:332-338 (2009).

В еще одном аспекте Fc-область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход описывают, например, в публикации РСТ № WO 00/42072 Presta. Кроме того, картировали участки связывания на IgG1 к FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn человека и описывали варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

В другом аспекте модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к "антигену". Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, изменяя один или несколько участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько замен аминокислот, приводящих к устранению

одного или нескольких участков гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы, таким образом, устранять гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход описывают, например, в патентах США № 5714350 и 6350861 Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно получать антитело, имеющее измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее сниженные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное содержание структур GlcNac в точке ветвления. Показано, что такие измененные профили гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, экспрессируя антитело в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования описаны в этой области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела, чтобы, таким образом, получать антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 Hang et al. описывают клеточную линию с функционально разрушенным геном FUT8, кодирующим фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT № WO 03/035835 Presta описывают вариант клеточной линии CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, также приводящую к гипофукозилированию антител, экспрессируемой в такой клетке-хозяине (см. также Shields et al, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT № WO 99/54342 Umana et al. описывают клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета (1,4)-N ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное содержание структур GlcNac в точке ветвления, приводящее к повышенной активности ADCC антител (см. также Umana et al, Nat. Biotech. 17: 176-180, 1999).

В другом аспекте антитело модифицируют для повышения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно встраивать одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 Ward. Альтернативно, для повышения биологического времени полужизни антитело можно изменять в области CH1 или CL так, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора спасения, взятый из двух петель домена CH2 Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 Presta et al.

В случае минимизации активности ADCC антитела конкретные мутации в Fc-области приводят к "Fc-молчащим" антителам, имеющим минимальное взаимодействие с эффекторными клетками. В основном, "Fc-область IgG" используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая нативную последовательность Fc-области и вариант Fc-области. Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяют как содержащую аминокислотные остатки от положения C226 или от P230 к карбоксильному концу антитела IgG. Нумерацию остатков в Fc-область осуществляют согласно индексу EU по Kabat. C-концевой лизин (остаток K447) Fc-области можно удалять, например, при получении или очистке антитела.

Молчащие эффекторные функции можно получать посредством мутации в Fc-области антител, и они описаны в этой области: LALA и N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); и D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69), см. также Heusser et al., WO2012065950. Примерами антител IgG1 с молчащей Fc являются мутант LALA, содержащий мутацию L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другим примером молчащего антитела IgG1 является мутация DAPA (D265A, P329A) (патент США № 6737056). Другое молчащее антитело IgG1 содержит мутацию N297A, приводящую к агликозилированным/негликозилированным антителам.

Fc-молчащие антитела приводят к низкой активности ADCC или ее отсутствию, что означает, что Fc-молчащее антитело проявляет активность ADCC, составляющую менее 50% специфического лизиса клеток, отсутствие активности ADCC означает, что Fc-молчащее

антитело проявляет активность ADCC (специфичный лизис клеток), составляющую менее 1%.

3. Получение антитела против SKIT

Антитела против SKIT и их фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) можно получать любыми способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетрамеров антитела, в то время как полноразмерные моноклональные антитела можно получать, например, с помощью гибридной или рекомбинантной продукции. Рекомбинантная экспрессия может происходить в любых соответствующих клетках-хозяевах, известных в этой области, например, клетках-хозяевах млекопитающих, бактериальных клетках-хозяевах, клетках-хозяевах дрожжей, клетках-хозяевах насекомых и т.д.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полинуклеотидам, кодирующим антитела, представленные в настоящем описании, например, полинуклеотидам, кодирующим переменные области тяжелой или легкой цепи или сегменты, содержащие определяющие комплементарность области, как представлено в настоящем описании. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 48, 66, 84, 102, 120 и 137. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 57, 75, 93, 111, 129 и 147.

В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, имеет по меньшей мере, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к

полинуклеотиду SEQ ID NO: 30, 48, 66, 84, 102, 120. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий легкую цепь, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты по отношению к полинуклеотиду SEQ ID NO: 39, 57, 75, 93, 111, 129 и 147.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать только последовательность вариабельной области антитела против cKIT. Они также могут кодировать вариабельную область и константную область антитела. Некоторые полинуклеотидные последовательности кодируют полипептид, содержащий вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи одного из примеров антитела против cKIT. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, соответственно, по существу, идентичных вариабельным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из антител мыши.

Полинуклеотидные последовательности можно получать твердофазным синтезом ДНК *de novo* или ПЦР-мутагенезом существующей последовательности (например, последовательностей, описываемых в примерах ниже), кодирующей антитело против cKIT или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять известными в этой области способами, такими как фосфотриэфирный способ по Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979; фосфодиэфирный способ по Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; диэтилфосфорамидатный способ по Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; и твердофазный способ из патента США № 4458066. Встраивание мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществлять как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим

векторам и клеткам-хозяевам для продукции описываемых выше антител против cKIT. Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи антител против cKIT или связывающие фрагменты можно использовать различные экспрессирующие векторы. Для продукции антител в клетке-хозяине млекопитающего можно использовать вирусные и невирусные экспрессирующие векторы. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с экспрессирующей кассетой для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al, Nat Genet 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов против cKIT в клетках млекопитающего (например, человека), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, San Diego, CA), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные в этой области для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса Vaccinia и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al, выше; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992.

Выбор экспрессирующего вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых вектор будет экспрессироваться. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент антитела против cKIT. В некоторых аспектах для предотвращения экспрессии встраиваемых последовательностей, за исключением экспрессии в индуцирующих условиях, используют индуцибельный промотор. Индуцибельные промоторы включают, например, арабинозный промотор, промотор lacZ, промотор металлотioneина или промотор генов теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно выращивать в неиндуцирующих условиях без смещения популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше

переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, другие регуляторные элементы также могут являться необходимыми или желательными для эффективной экспрессии цепи или фрагмента антитела против cKIT. Эти элементы, как правило, включают иницирующий кодон ATG и смежный участок связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повышать посредством включения энхансеров, соответствующих используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; и Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Например, для повышения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV.

Экспрессирующие векторы также могут обеспечивать позиционирование секреторной сигнальной последовательности для образования слитого белка с полипептидами, кодируемыми встраиваемыми последовательностями антитела против cKIT. Чаше, встраиваемые последовательности антитела против cKIT соединяют с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, подлежащие использованию для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела против cKIT, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы делают возможной экспрессию переменных областей в виде слитых белков с константными областями, таким образом, приводя к продукции интактных антител или их фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева, содержащие и экспрессирующие цепи антитела против cKIT, могут являться прокариотическими или эукариотическими. *E. coli* является одним из прокариотических хозяев, применимых для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы-хозяева, пригодные для использования, включают бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и других энтеробактерий, таких как *Salmonella*, *Serratia*, и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получать экспрессирующие векторы, как правило, содержащие

последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, участок начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество множества из хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (trp) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, необязательно, с использованием последовательности оператора, и имеют последовательности участка связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Для экспрессии полипептидов против сКИТ также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

В других аспектах для экспрессии и продукции полипептидов против сКИТ по настоящему изобретению используют клетки-хозяева млекопитающих. Например, они могут являться гибридной клеточной линией, экспрессирующей эндогенные гены иммуноглобулинов (например, миеломные гибридомные клоны, как описано в примерах), или линией клеток млекопитающих, несущей экзогенный экспрессирующий вектор (например, миеломные клетки SP2/0, пример которых приведен ниже). Они включают любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортализованные клетки животного или человека. Например, разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая CHO клеточные линии, различные клеточные линии COS, клетки HeLa, линии миеломных клеток, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов, в общем, описывают, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как участок начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), и необходимые участки обработки информации, такие как участки

связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Эти экспрессирующие векторы, как правило, содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут являться конститутивными, специфичными для типа клеток, стадиейспецифичными и/или модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают, в качестве неограничивающих примеров, промотор металлотioneина, конститутивный основной поздний промотор аденовируса, дексаметазон-индуцибельный промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPSV, тетрациклин-индуцибельный промотор CMV (такой как предранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в этой области.

Способы встраивания экспрессирующих векторов, содержащих интересующие полинуклеотидные последовательности, варьируются в зависимости от типа клеток-хозяев. Например, трансфекцию с хлоридом кальция общепринято используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев (см. Sambrook et al. выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, депротенинизированную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленный средствами захват ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом часто желательной будет являться стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, стабильно экспрессирующие цепи или связывающие фрагменты антитела против sKIT, можно получать с использованием экспрессирующих векторов, содержащих вирусные участки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективного маркера. После встраивания вектора клеткам

можно позволять расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах до переноса на селективные среды. Целью включения селективного маркера является придание резистентности к селекции, и его наличие делает возможным рост клеток, успешно экспрессирующих встроенные последовательности, в селективных средах. Резистентные, стабильно трансфицированные клетки могут пролиферировать при использовании способов культивирования ткани, соответствующих типу клеток.

Терапевтическое и диагностическое применение

Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные конъюгаты антител по настоящему изобретению применимы во множестве областей применения, включая, в качестве неограничивающих примеров, лечение злокачественного новообразования, такого как солидные злокачественные новообразования. В определенных аспектах антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные конъюгаты антител применимы для ингибирования роста опухоли, индуцирования дифференцировки, снижения объема опухоли и/или снижения онкогенности опухоли. Способы применения могут являться способами *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

В одном из аспектов антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные конъюгаты антител применимы для детекции наличия cKIT в биологическом образце. Как применяют в настоящем описании, термин "детекция" включает количественную или качественную детекцию. В определенных аспектах биологический образец содержит клетку или ткань. В определенных аспектах такие ткани включают нормальные и/или опухолевые ткани, экспрессирующие cKIT на более высоких уровнях относительно других тканей.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции наличия cKIT в биологическом образце. В определенных аспектах способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом против cKIT в условиях, допускающих связывание антитела с антигеном, и детекцию образования комплекса между антителом и антигеном.

Также включен способ диагностики нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией cKIT. В определенных аспектах способ включает приведение тестируемой клетки в контакт с антителом против cKIT; определение уровня экспрессии (количественно или качественно) cKIT на тестируемой клетке посредством детекции связывания антитела против cKIT с антигеном cKIT и сравнение уровня экспрессии cKIT в тестируемой клетке с уровнем экспрессии cKIT в контрольной клетке (например, нормальной клетке, происходящей из той же ткани, что и тестируемая клетка, или клетке, экспрессирующей cKIT на уровнях, сравнимых с такой нормальной клетке), где более высокий уровень экспрессии cKIT на тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой свидетельствует о наличии нарушения, ассоциированного с повышенной экспрессией cKIT. В определенных аспектах тестируемую клетку получают от индивидуума, который, как полагают, имеет нарушение, ассоциированное с повышенной экспрессией cKIT. В определенных аспектах нарушение является нарушением пролиферации клеток, таким как злокачественное новообразование или опухоль.

В определенных аспектах способ диагностики или детекции, такой как описываемый выше, включает детекцию связывания антитела против cKIT с cKIT, экспрессирующимся на поверхности клетки или препарата мембраны, полученного из клетки, экспрессирующей cKIT на своей поверхности. Примером анализа для детекции связывания антитела против cKIT с cKIT, экспрессируемым на поверхности клетки, является анализ "FACS".

Для детекции связывания антител против cKIT с cKIT можно использовать конкретные другие способы. Такие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, анализы связывания антигена, хорошо известные в этой области, такие как вестерн-блоттинг, радиоиммунологические анализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунологические анализы "сэндвич"-типа, анализы иммунопреципитации, флуоресцентные иммунологические анализы, иммунологические анализы с протеином А и иммуногистохимию (IHC).

В определенных аспектах антитела против cKIT являются

мечеными. Метки включают, в качестве неограничивающих примеров, метки или вещества, детектируемые напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также вещества, такие как ферменты или лиганды, детектируемые косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия.

В определенных аспектах антитела против cKIT иммобилизуют на нерастворимой матрице. Иммобилизация вызывает отделение антитела против cKIT от любых белков cKIT, остающихся свободными в растворе. Общепринято ее осуществлять посредством инсолубилизации антитела против cKIT до осуществления анализа, посредством адсорбции к нерастворимой в воде матрице или поверхности (Bennich et al, патент США № 3720760) или посредством ковалентного присоединения (например, с использованием глутаральдегидной перекрестной сшивки), или посредством инсолубилизации антитела против cKIT после образования комплекса между антителом против cKIT и белком cKIT, например, посредством иммунопреципитации.

Любой из указанных выше аспектов диагностики или детекции можно осуществлять с использованием иммуноконъюгата по настоящему изобретению вместо или в дополнение к антителу против cKIT.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики или улучшения заболевания, включающему введение антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) и лекарственных конъюгатов антител пациенту, таким образом, осуществляя лечение заболевания. В определенных аспектах заболевание, подвергнутое лечению с использованием антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) и лекарственных конъюгатов антител, является злокачественным новообразованием. Примеры заболеваний, которые можно подвергать лечению и/или профилактике, включают, в качестве неограничивающих примеров, гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), мелкоклеточный рак легких (SCLC), острый миелолейкоз (AML), меланому,

тучноклеточный лейкоз (MCL), мастоцитоз, нейрофиброматоз, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и рак поджелудочной железы. В определенных аспектах злокачественное новообразование отличается экспрессирующими cKIT клетками, с которыми могут специфически связываться антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и лекарственные конъюгаты антител.

Настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественного новообразования, включающим введение терапевтически эффективного количества антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах злокачественное новообразование является солидным раком. В определенных аспектах индивидуум является человеком.

В определенных аспектах способ ингибирования роста опухоли включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах индивидуум является человеком. В определенных аспектах индивидуум имеет опухоль, или ему удаляли опухоль.

В определенных аспектах опухоль экспрессирует cKIT, с которым связывается антитело против cKIT. В определенных аспектах опухоль гиперэкспрессирует cKIT человека.

В случае лечения заболевания соответствующая дозировка антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или лекарственных конъюгатов антител зависит от различных факторов, таких как тип заболевания, подвергнутого лечению, тяжести и течения заболевания, отвечаемости заболевания, проводимой ранее терапии, анамнеза пациента и т.д. Антитело или средство можно вводить однократно или в течение серии введений, длящейся от нескольких дней до нескольких месяцев, или до достижения излечения или достижения снижения стадии заболевания (например, снижения размера опухоли).

Оптимальные режимы дозирования можно вычислять с учетом измерений накопления лекарственного средства в организме

пациента, и они будут варьироваться в зависимости от относительной активности отдельного антитела, фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) или лекарственных конъюгатов антител. В определенных аспектах доза составляет от 0,01 мг до 10 мг (например, 0,01 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг или 10 мг) на кг массы тела, и ее можно вводить один или более раз в сутки, неделю, месяц или год. В определенных аспектах антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению вводят один раз каждые две недели или один раз каждые три недели. Лечащий врач может устанавливать частоту повторений для дозировки с учетом измеряемой длительности лечения и концентраций лекарственного средства в физиологических жидкостях или тканях.

Комбинированное лечение

В конкретных случаях антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению комбинируют с другими терапевтическими средствами, такими как другие противораковые средства, противоаллергические средства, противорвотные средства (или антиэметики), обезболивающие, цитопротекторы и их комбинации.

Общие химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения в способах комбинированного лечения, включают анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицин сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), инъекцию бусульфана (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Cytosar-U®), инъекцию липосом с цитарабином (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Актиномицин D, Cosmegen), даунорубицин гидрохлорид (Cerubidine®), инъекцию липосом с даунорубицином цитратом (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®),

доксорубицин гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабин фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксцитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальций, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), phoenix (иттрий-90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантатом кармустина (Gliadel®), тамоксифен цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекан гидрохлорид для инъекций (Nucamptin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®).

В одном из аспектов антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению комбинируют в фармацевтическом комбинированном составе или режиме дозирования в качестве комбинированного лечения со вторым соединением, имеющим противораковые свойства. Второе соединение из фармацевтического комбинированного состава или режима дозирования может иметь активности, дополняющие антитело или иммуноконъюгат из комбинации таким образом, что они не влияют неблагоприятно друг на друга. Например, антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или лекарственный конъюгат антитела по настоящему изобретению можно вводить в комбинации, в качестве неограничивающих примеров, с химиотерапевтическим средством, ингибитором тирозинкиназ, например, иматинибом, и другими ингибиторами пути cKIT.

Как применяют в настоящем описании, термин "фармацевтическая комбинация" относится к фиксированной комбинации в одной стандартной лекарственной форме или нефиксированной комбинации или набору из частей для комбинированного введения, где два или более терапевтических средств можно вводить независимо одновременно или отдельно с временными интервалами, особенно если эти временные интервалы

позволяют компонентам комбинации демонстрировать совместное, например, синергическое, действие.

Термин "комбинированное лечение" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения, представленного в настоящем описании. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических средств, по существу, одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное соотношение активных ингредиентов. Альтернативно, такое введение включает совместное введение в контейнерах для многократных доз или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости можно восстанавливать или разводить до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное использование каждого типа терапевтического средства приблизительно одновременно или в различные моменты времени. В любом случае схема лечения будет обеспечивать положительное воздействие комбинации лекарственных средств в лечении состояний или нарушений, представленных в настоящем описании.

Комбинированное лечение может обеспечивать "синергию" и оказываться "синергичным", т.е. эффект, достигаемый при совместном использовании активных ингредиентов, является большим, чем сумма эффектов, являющихся результатом использования соединений отдельно. Можно достигать синергического действия, если активные ингредиенты: (1) составляют совместно и вводят или доставляют одновременно в комбинированной, стандартной лекарственной форме; (2) доставляют поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) с помощью некоторой другой схемы лечения. При доставке при поочередном лечении синергического действия можно достигать при последовательном введении или доставке соединений, например, с помощью разных инъекций в отдельных шприцах. В основном, при поочередном лечении эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, т.е. периодически, в то время как при комбинированном лечении эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят

совместно.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы EGFR, ингибиторы Her2, ингибиторы Her3, ингибиторы IGFR и ингибиторы Met.

Например, ингибиторы тирозинкиназ включают, в качестве неограничивающих примеров, эрлотиниб гидрохлорид (Tarceva®); линифаниб (N-[4-(3-амино-1H-индазол-4-ил)фенил]-N'-(2-фтор-5-метилфенил)мочевину, также известный как АВТ 869, доступный в Genentech); сунитиниб малат (Sutent®); босутиниб (4-[(2,4-дихлор-5-метоксифенил)амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил, также известный как SKI-606 и описываемый в патенте США № 6780996); дазатиниб (Sprycel®); пазопаниб (Votrient®); сорафениб (Nexavar®); зактому (ZD6474); нилотиниб (Tasigna®); регорафениб (Stivarga®) и иматиниб или иматиниба мезилат (Gilevec® и Gleevec®).

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) включают, в качестве неограничивающих примеров, Эрлотиниб гидрохлорид (Tarceva®), гефитиниб (Iressa®); N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[3''S'']тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4(диметиламино)-2-бутенамид, Tovok®; вандетаниб (Caprelsa®); лапатиниб (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); канертиниб дигидрохлорид (CI-1033); 6-[4-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]фенил]-N-[(1R)-1-фенилэтил]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEE788, CAS 497839-62-0); мубритиниб (TAK165); пелитиниб (EKB569); афатиниб (BIBW2992); нератиниб (NKI-272); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]-карбаминовую кислоту, (3S)-3-морфолинилметиловый сложный эфир (BMS599626); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3α,5β,6α]-октагидро-2-метилциклопента[c]пиррол-5-

ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); и 4-[4-[[(1R)-1-фенилэтил]амино]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил]-фенол (PKI166, CAS 187724-61-4).

Антитела против EGFR включают, в качестве неограничивающих примеров, цетуксимаб (Erbix®); панитумумаб (Vectibix®); матузумаб (EMD-72000); нимотузумаб (hR3); залутумумаб; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1) и ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (рецептора HER2) (также известного как Neu, ErbB-2, CD340 или p185) включают, в качестве неограничивающих примеров, трастузумаб (Herceptin®); Пертузумаб (Omnitarg®); нератиниб (HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-хлор-4-[(пиридин-2-ил)метокси]фенил]амино]-3-циано-7-этоксихинолин-6-ил]-4-(диметиламино)бут-2-енамид, описываемый в публикации РСТ № WO 05/028443); лапатиниб или лапатиниб дитозилат (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[(3S)тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4-(диметиламино)-2-бутенамид (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]-карбаминовую кислоту, (3S)-3-морфолинилметилловый сложный эфир (BMS 599626, CAS 714971-09-2); канертиниб дигидрохлорид (PD183805 или CI-1033); и N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[(3α,5β,6α)-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8).

Ингибиторы HER3 включают, в качестве неограничивающих примеров, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 и MEHD-7945A.

Ингибиторы MET включают, в качестве неограничивающих примеров, кабозантиниб (XL 184, CAS 849217-68-1); форетиниб (GSK1363089, ранее известный как XL880, CAS 849217-64-7); тивантиниб (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-гидрокси-2-метилпропил)-N-(5-(7-метоксихинолин-4-илокси)пиридин-2-ил)-5-метил-3-оксо-2-фенил-2,3-дигидро-1H-пиразол-4-карбоксамид (AMG

458); кризотиниб (Xalkori®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-дигидро-1H-индол-1-илсульфонил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил) карбонил]-1H-пиррол-2-ил}метилен)-1,3-дигидро-2H-индол-2-он (SU1 1271); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-({3,5-диметил-4-[(4-метилпиперазин-1-ил) карбонил]-1H-пиррол-2-ил}метилен)-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU1 1274); (3Z)-N-(3-хлорфенил)-3-{[3,5-диметил-4-(3-морфолин-4-илпропил)-1H-пиррол-2-ил]метилен}-N-метил-2-оксоиндолин-5-сульфонамид (SU1 1606); 6-[дифтор[6-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-b]пиридазин-3-ил]метил]-хинолин (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(хинолин-6-илметил)-1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиразин-6-ил]-1H-пиразол-1-ил]этанол (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-диоксан-2-илметил)-N-метил-N'-[3-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-5-оксо-5H-бензо[4,5]циклогепта[1,2-b]пиридин-7-ил]сульфамид (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазоло[4,3-пиридазин-3-ил]тио]-хинолин (SGX523, CAS 1022150-57-7); и (3Z)-5-[[2,6-дихлорфенил)метил]сульфонил]-3-[[3,5-диметил-4-[[2R)-2-(1-пирролидинилметил-1)-1-пирролидинил]карбонил]-1H-пиррол-2-ил]метилен]-1,3-дигидро-2H-индол-2-он (PHA665752, CAS 477575-56-7).

Ингибиторы IGF1R включают, в качестве неограничивающих примеров, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 и BI836845. См., например, обзор Yee, JNCI, 104; 975 (2012).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами нижележащего пути передачи сигнала FGF, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы MEK, ингибиторы Braf, ингибиторы PI3K/Akt, ингибиторы SHP2, а также ингибиторы mTOR.

Например, ингибиторы митоген-активируемой протеинкиназы (MEK) включают, в качестве неограничивающих примеров, XL-518 (также известный как GDC-0973, CAS 1029872-29-4, доступный в ACC Corp.); 2-[(2-хлор-4-йодофенил)амино]-N-

(циклопропилметокси)-3,4-дифтор-бензамид (также известный как CI-1040 или PD184352 и описываемый в публикации РСТ № WO2000035436); N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокс]-3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодофенил)амино]-бензамид (также известный как PD0325901 и описываемый в публикации РСТ № WO2002006213); 2,3-бис[амино[(2-аминофенил)тио]метилен]-бутандинитрил (также известный как U0126 и описываемый в патенте США № 2779780); N-[3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодофенил)амино]-6-метоксифенил]-1-[(2R)-2,3-дигидроксипропил]-циклопропансульфонамид (также известный как RDEA1 19 или BAY869766 и описываемый в публикации РСТ № WO2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(этиламино)-8,9,16-тригидрокси-3,4-диметил-3,4,9,19-тетрагидро-1H-2-бензоксоциклотетрадецин-1,7(8H)-дион] (также известный как E6201 и описываемый в публикации РСТ № WO2003076424); 2'-амино-3'-метоксифлавонон (также известный как PD98059, доступный в Biaffin GmbH & Co., KG, Germany); вемурафениб (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-йодофениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7(3H,8H)-дион (ТАК-733, CAS 1035555-63-5); пимасертиб (AS-703026, CAS 1204531-26-9) и траметиниб диметил сульфоксид (GSK-1 120212, CAS 1204531-25-80).

Ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают, в качестве неограничивающих примеров, 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описываемый в публикациях РСТ №№ WO 09/036082 и WO 09/055730); 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-c]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описываемый в публикации РСТ № WO 06/122806); 4-(трифторметил)-5-(2,6-диморфолинопиримидин-4-ил)пиридин-2-амин (также известный как BKM120 или NVP-BKM120 и описываемый в публикации РСТ № WO2007/084786); тозасертиб (VX680 или MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидиндион (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(ацетилокси)-1-[(ди-2-пропениламино)метилен]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-октагидро-11-

гидрокси-4-(метоксиметил)-4а,6а-диметил-циклопента[5,6]нафто[1,2-с]пиран-2,7,10(1H)-трион (PX866, CAS 502632-66-8); и 8-фенил-2-(морфолин-4-ил)-хромен-4-он (LY294002, CAS 154447-36-6).

Ингибиторы mTOR включают, в качестве неограничивающих примеров, темсиролимус (Torisel®); ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,8-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30,3.1.0^{4.9}]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексил диметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669 и описываемый в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afmitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4); и N²-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин-, внутренняя соль (SF1126, CAS 936487-67-1).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими проапоптотическими средствами, включая, в качестве неограничивающих примеров, ингибиторы IAP, ингибиторы Bcl2, ингибиторы Mcl1, средства Trail, ингибиторы Chk.

Например, ингибиторы IAP включают, в качестве неограничивающих примеров, NVP-LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 и TL32711. Другие примеры ингибиторов IAP включают, в качестве неограничивающих примеров, описываемые в WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 и WO08/134679, все из которых включены

в настоящее описание в качестве ссылок.

Ингибиторы BCL-2 включают, в качестве неограничивающих примеров, 4-[4-[[2-(4-хлорфенил)-5,5-диметил-1-циклогексен-1-ил] метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-морфолинил)-1-[(фенилтио) метил] пропил] амино]-3-[(трифторметил) сульфонил] фенил] сульфонил] бензамид (также известный как ABT-263 и описываемый в публикации PCT № WO 09/155386); тетрокарцин А; антимицин; госсипол ((-)-BL-193); обатоклакс; этил-2-амино-6-циклопентил-4-(1-циано-2-этокси-2-оксоэтил)-4Н-хромон-3-карбоксилат (HA14-1); облимерсен (G3139, Genasense®); пептид Bак ВНЗ; (-)-госсипол-уксусная кислота (AT-101); 4-[4-[(4'-хлор[1,1'-бифенил]-2-ил) метил]-1-пиперазинил]-N-[[4-[[(1R)-3-(диметиламино)-1-[(фенилтио) метил] пропил] амино]-3-нитрофенил] сульфонил]-бензамид (ABT-737, CAS 852808-04-9); и навитоклакс (ABT-263, CAS 923564-51-6).

Агонисты проапоптотических рецепторов (PARA), включая DR4 (TRAILR1) и DR5 (TRAILR2), включая, в качестве неограничивающих примеров, дуланермин (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); мапатунумаб (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); лексатумумаб (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); апомаб (Aromab®); конатумумаб (AMG655, CAS 896731-82-1); и тигатузумаб (CS1008, CAS 946415-34-5, доступный в Daiichi Sankyo).

Ингибиторы Checkpoint Kinase (CHK) включают, в качестве неограничивающих примеров, 7-гидроксистауроспорин (UCN-01); 6-бром-3-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-5-(3R)-3-пиперидинил-пиразоло[1,5-а]пиримидин-7-амин (SCH900776, CAS 891494-63-6); 5-(3-фторфенил)-3-уреидотиофен-2-карбоновой кислоты N-[(S)-пиперидин-3-ил] амид (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[((3S)-1-азабицикло[2.2.2]окт-3-ил) амино]-3-(1H-бензимидазол-2-ил)-6-хлорхинолин-2(1H)-он (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-аминодактиномицин (7-AAD), изогранулотимид, дебромгимениалдизин; N-[5-бром-4-метил-2-[(2S)-2-морфолинилметокси]-фенил]-N'-(5-метил-2-пиразинил) мочевины (LY2603618, CAS 911222-45-2); сульфорафан (CAS 4478-93-7, 4-Метилсульфинилбутилизоотиоцианат); 9,10,11,12-тетрагидро-9,12-эпокси-1H-дииндоло[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]пирроло[3,4-

i] [1,6]бензодиазоцин-1,3(2H)-дион (SB-218078, CAS 135897-06-2); и TAT-S216A (Sha et al., Mol. Cancer. Ther 2007; 6(1): 147-153), и CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqr). .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с одним или несколькими ингибиторами FGFR. Например, ингибиторы FGFR включают, в качестве неограничивающих примеров, бриваниб аланинат (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-фтор-2-метил-1H-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)2-аминопропаноат); варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); довитиниб лактиломочная кислота (TKI258, CAS 852433-84-2); 3-(2,6-дихлор-3,5-диметокси-фенил)-1-{6-[4-(4-этил-пиперазин-1-ил)-фениламино]-пиримидин-4-ил}-1-метилмочевину (BGJ398, CAS 87251 1-34-7); данусертиб (PNA-739358); и (PD173074, CAS 219580-11-7). В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму лекарственного конъюгата антитела в комбинации с ингибитором FGFR2, таким как 3-(2,6-дихлор-3,5-диметоксифенил)-1-(6((4-(4-этилпиперазин-1-ил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)-1-метилмочевину (также известную как BGJ-398); или 4-амино-5-фтор-3-(5-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)хинолин-2(1H)-он (также известный как довитиниб или TKI-258), AZD4547 (Gavine et al, 2012, Cancer Research 72, 2045-56, N-[5-[2-(3,5-диметоксифенил)этил]-2H-пиразол-3-ил]-4-(3R,5S)-диметилпиперазин-1-ил)бензамид), понатиниб (AP24534; Gozgit et al, 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99; 3-[2-(имидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)этинил]-4-метил-N-{4-[4-(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-3-(трифторметил)фенил}бензамид, CAS 943319-70-8).

Фармацевтические композиции

Для получения фармацевтических или стерильных композиций, включающих иммуноконъюгаты, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиции могут дополнительно содержать одно

или несколько других терапевтических средств, подходящих для лечения или профилактики гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы.

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать посредством смешивания с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, суспензий, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

В конкретном аспекте лекарственная форма для клинического исследования (CSF) лекарственных конъюгатов антител по настоящему изобретению является лиофилизатом в сосуде, содержащем ADC, сукцинат натрия и полисорбат 20. Лيوфилизат можно восстанавливать с использованием воды для инъекций, раствор содержит ADC, сукцинат натрия, сахарозу и полисорбат 20 при pH приблизительно 5,0. Для последующего внутривенного введения полученный раствор, как правило, будут дополнительно разводить в растворе носителя.

Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость метаболизма вещества в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность вещества и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. В

определенных аспектах с помощью схемы введения максимизируют количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Таким образом, количество доставляемого биологического средства частично зависит от конкретного вещества и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Доступно руководство по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и низкомолекулярных соединений (см., например, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom *et al.*, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon *et al.*, *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz *et al.*, *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky *et al.*, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000).

Определение соответствующей дозы осуществляет практикующий врач, например, с использованием параметров или факторов, которые, как известно, или как предполагают в этой области, или как прогнозируют, влияют на лечение. Как правило, дозу начинают с количества несколько меньше оптимальной дозы и затем повышают с малыми приращениями до достижения желаемого или оптимального эффекта относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические критерии включают симптомы, например, воспаления или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов.

Точные уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях лекарственных конъюгатов антител можно варьировать таким образом, чтобы получать количество активного ингредиента, являющееся эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению

или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов, известных в области медицины.

Композиции, содержащие антитела или их фрагменты, можно вводить с помощью непрерывной инфузии или дозами с интервалами, например, один день, одну неделю или 1-7 раз в неделю. Дозы можно вводить внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, внутрицеребрально или ингаляционно. Конкретный протокол дозирования включает максимальную дозу или частоту дозирования, с помощью которой избегают значительных нежелательных побочных эффектов.

В случае иммуноконъюгатов по настоящему изобретению доза, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента. Доза может составлять от 0,0001 мг/кг до 20 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,0001 до 2 мг/кг, от 0,0001 до 1 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 0,75 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 0,5 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 0,25 мг/кг, от 0,0001 до 0,15 мг/кг, от 0,0001 до 0,10 мг/кг, от 0,001 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 0,25 мг/кг или от 0,01 до 0,10 мг/кг массы тела пациента. Дозу антител или их фрагментов можно вычислять с использованием массы тела пациента в килограммах (кг), умноженной на дозу, подлежащую введению, в мг/кг.

Введения доз иммуноконъюгатов можно повторять и введения можно разделять по меньшей мере 1 днем, 2 днями, 3 днями, 5 днями, 10 днями, 15 днями, 30 днями, 45 днями, 2 месяцами, 75 днями, 3 месяцами или по меньшей мере 6 месяцами. В конкретном аспекте введения доз иммуноконъюгатов по настоящему изобретению повторяют каждые 3 недели.

Эффективное количество в случае конкретного пациента может варьироваться в зависимости от факторов, таких как состояние,

подвергаемое лечению, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001).

Путь введения может являться, например, местным или кожным нанесением, инъекцией или инфузией посредством внутривенного, интраперитонеального, внутримозгового, внутримышечного, внутриглазного, интраартериального, интрацереброспинального введения, введения в очаг поражения, или введением с помощью систем замедленного высвобождения или имплантата (см., например, Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983; Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; патенты США № 6350466 и 6316024). При необходимости композиция также может включать солюбилизатор или местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции, или и то, и другое. Кроме того, также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и состав с аэрозольным средством. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации РСТ № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Композицию по настоящему изобретению также можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества известных в этой области способов. Как будет понятно специалистам в этой области, путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Выбранные пути введения иммуноконъюгатов включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, интраперитонеальный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции

или инфузии. Парентеральное введение может представлять собой способы введения, иные, чем энтеральное и местное введение, как правило, посредством инъекции, и включает, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, интраартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композицию по настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназальный, пероральный, вагинальный, ректальный, сублингвальный или местный. В одном из аспектов иммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят посредством инфузии. В другом аспекте иммуноконъюгаты вводят подкожно.

Если иммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят в системе с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, для достижения контролируемого или замедленного высвобождения можно использовать помпу (см. Langer, выше; Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989). Для достижения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств иммуноконъюгатов можно использовать полимерные материалы (см. например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; see also Levy et al., Science 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard et al., J. Neurosurg. 71:105, 1989; патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публикацию PCT № WO 99/15154 и публикацию PCT № WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в составах с замедленным высвобождением, включают, в качестве

неограничивающих примеров, поли(2-гидрокси этилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) и полиортоэфиры. В одном из аспектов полимер, используемый в составе с замедленным высвобождением, является инертным, несодержащим вымываемые примеси, стабильным при хранении, стерильным и биodeградируемым. Систему с контролируемым или замедленным высвобождением можно помещать вблизи профилактической или терапевтической мишени, таким образом, требуя лишь фракции системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

Системы с контролируемым высвобождением обсуждают в обзоре Langer, *Science* 249: 1527-1533, 1990. Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащим один или несколько иммуноконъюгатов по настоящему изобретению, можно использовать любой способ, известный специалисту в этой области. См., например, патент США № 4526938, публикацию PCT № WO 91/05548, публикацию PCT № WO 96/20698, PCT publication WO 91/05548, PCT publication WO 96/20698, Ning et al., *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, 1996; Song et al., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek et al., *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997; and Lam et al., *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997, содержание каждого из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Если иммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят местно, их можно составлять в форме мази, крема, трансдермального пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой форме, хорошо известной специалисту в этой области. См., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences* и *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). В случае

нераспыляемых местных лекарственных форм, как правило, используют формы от вязких до полутвердых или твердые формы, содержащие носитель или один или несколько эксципиентов, совместимых с местным применением и имеющих динамическую вязкость, в некоторых случаях, большую, чем у воды. Подходящие составы включают, в качестве неограничивающих примеров, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, линименты, мази и т.п., которые, при желании, стерилизуют или смешивают со вспомогательными средствами (например, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, буферами или солями) для воздействия на различные свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие местные лекарственные формы включают распыляемые аэрозольные препараты, где активный ингредиент, в некоторых случаях, в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упаковывают в смеси с летучим веществом под давлением (например, газообразным пропеллентом, таким как фреон) или в мягкой бутылке. При желании, в фармацевтические композиции и лекарственные формы также можно добавлять увлажнители. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в этой области.

Если композиции, содержащие иммуноконъюгаты, вводят интраназально, их можно составлять в аэрозольной форме, спрее, водного аэрозоля или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства для применения по настоящему изобретению может быть удобно доставлять в форме аэрозоля с помощью упаковок, находящихся под давлением, или небулайзера с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортetraфторэтана, диоксид углерода или другого подходящего газа). В случае аэрозоля под давлением можно определять единицу дозирования, предоставляя клапан для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе можно составлять содержащими смесь порошков соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

В этой области известны способы совместного введения или

лечения с использованием второго терапевтического средства, например, цитокина, стероида, химиотерапевтического средства, антибиотика, или лучевой терапии (см., например, Hardman *et al.*, (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^{sup}.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может снижать симптомы по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%; по меньшей мере на приблизительно 30%; по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%.

Дополнительные терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства), которые можно вводить в комбинации с иммуноконъюгатами, можно вводить менее чем через 5 минут, менее чем через 30 минут, через 1 час, через приблизительно 1 час, через от приблизительно 1 до приблизительно 2 часов, через от приблизительно 2 часов до приблизительно 3 часов, через от приблизительно 3 часов до приблизительно 4 часов, через от приблизительно 4 часов до приблизительно 5 часов, через от приблизительно 5 часов до приблизительно 6 часов, через от приблизительно 6 часов до приблизительно 7 часов, через от приблизительно 7 часов до приблизительно 8 часов, через от приблизительно 8 часов до приблизительно 9 часов, через от приблизительно 9 часов до приблизительно 10 часов, через от приблизительно 10 часов до приблизительно 11 часов, через от приблизительно 11 часов до приблизительно 12 часов, через от приблизительно 12 часов до 18 часов, через от 18 часов до 24 часов, через от 24 часов до 36 часов, через от 36 часов до 48 часов, через от 48 часов до 52 часов, через от 52 часов до 60 часов, через от 60 часов до 72 часов, через от 72 часов до 84 часов, через от 84 часов до 96 часов или через от 96 часов до 120 часов после иммуноконъюгатов по настоящему изобретению. Два или более терапевтических средств можно вводить в течение одного посещения пациента.

В определенных аспектах иммуноконъюгаты можно составлять для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гемато-энцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения BBB терапевтическими соединениями по настоящему изобретению (при желании), их можно составлять, например, в липосомах. Способы производства липосом, см., например, в патентах США №№ 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одно или несколько веществ, избирательно транспортируемых в конкретные клетки или органы, таким образом, повышая направленную доставку лекарственного средства (см., например, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Примеры направляющих веществ включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 Low et al); маннозиды (Umezawa et al, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); антитела (Bloeman et al, (1995) FEBS Lett. 357: 140; Owais et al, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); рецептор белка сурфактанта А (Briscoe et al, (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p 120 (Schreier et al, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Настоящее изобретение относится к протоколам введения фармацевтической композиции, содержащей иммуноконъюгаты в отдельности или в комбинации с другими терапевтическими средствами, нуждающемуся в этом индивидууму. Комбинированные терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) можно вводить индивидууму одновременно или последовательно. Терапевтическое средство (например, профилактические или терапевтические средства) из комбинированных терапевтических средств также можно вводить циклически. Циклическая терапия включает введение первого терапевтического средства (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени с последующим введением второго терапевтического средства (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени и повторение этого

последовательного введения, т.е. цикла, для снижения развития резистентности к одному из терапевтических средств (например, средств) для избегания или снижения побочных эффектов одного из терапевтических средств (например, средств) и/или для улучшения эффективности терапевтических средств.

Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) из комбинированных терапевтических средств по настоящему изобретению можно вводить индивидууму одновременно.

Термин "одновременно" не ограничен введением терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств) точно в одно и то же время, но скорее означает, что фармацевтическую композицию, содержащую антитела или их фрагменты, вводят индивидууму последовательно и в пределах временного интервала таким образом, что иммуноконъюгаты могут действовать совместно с другими терапевтическими средствами для обеспечения повышенного благоприятного эффекта относительно того, как если бы их вводили иначе. Например, каждое терапевтическое средство можно вводить индивидууму одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводят одновременно, их необходимо вводить достаточно близко по времени, таким образом, обеспечивая желаемый терапевтический или профилактический эффект. Каждое терапевтическое средство можно вводить индивидууму отдельно в любой соответствующей форме и любым подходящим путем. В различных аспектах терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические средства) вводят индивидууму с интервалом менее 15 минут, менее 30 минут, менее 1 часа, приблизительно 1 час, от приблизительно 1 часа до приблизительно 2 часов, от приблизительно 2 часов до приблизительно 3 часов, от приблизительно 3 часов до приблизительно 4 часов, от приблизительно 4 часов до приблизительно 5 часов, от приблизительно 5 часов до приблизительно 6 часов, от приблизительно 6 часов до приблизительно 7 часов, от приблизительно 7 часов до приблизительно 8 часов, от

приблизительно 8 часов до приблизительно 9 часов, от приблизительно 9 часов до приблизительно 10 часов, от приблизительно 10 часов до приблизительно 11 часов, от приблизительно 11 часов до приблизительно 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часов или 1 неделя. В других аспектах два или более терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств) вводят в течение одного посещения пациента.

Профилактические или терапевтические средства из комбинированных терапевтических средств можно вводить индивидууму в одной фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические средства из комбинированных терапевтических средств можно вводить индивидууму одновременно в отдельных фармацевтических композициях. Профилактические или терапевтические средства можно вводить индивидууму одним или разными путями введения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение Ab против cKIT с помощью гибридной технологии

Антиген и другие белки

Клеточную линию с транзиторной экспрессией, секретирующую белок cKIT человека, получали трансфекцией клеток 293 Freestyle™ (Invitrogen, Carlsbad, Ca). В кратком изложении, клетки, культивируемые в среде Freestyle™ (Invitrogen), трансфицировали с использованием реагента для трансфекции 293Fectin™ и рекомбинантной плазмиды, содержащей ECD из кДНК cKIT человека и метку His6 на C-конце последовательности или Fc мыши (pFUSE, Invivogen, San Diego, CA). Через 48-72 часов среды центрифугируют для удаления клеток, стерилизуют фильтрацией и используют очищенный лизат для очистки белка.

В случае His6-меченного cKIT: Полученный концентрат наносили на колонку NiNTA His-Bind Superflow при скорости 0,5 мл/мин. После исходного промывания с помощью PBS связавшийся материал элюировали с использованием PBS со ступенчатым градиентом имидазола (10-500 мМ). Полученный элюат диализовали относительно PBS, pH 7,3, стерилизовали фильтрацией и

аликвотировали. В случае слияния Fc-cKit использовали колонки Protein G fastFlow (вместо NiNTA) как описано выше, и элюировали с глициновым буфером, pH 3, который нейтрализовали с использованием Трис, pH 8.

Получение гибридомы

Иммунизация мышей и получение гибридом

Очищенный cKIT разбавляли 1:1 полным адъювантом Фрейнда перед иммунизацией трансгенных по Bcl-2 мышей (линия C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 Wehi). Мышей иммунизировали с использованием способа, предусматривающего многократную иммунизацию с использованием нескольких участков (RIMMS) (McIntyre GD., Hybridoma, 1997). В кратком изложении, мышам инъецировали 1-3 мкг антигена в 8 конкретных участков вблизи периферических лимфоузлов (PLN). Эту процедуру повторяли 8 раз в течение 12 дней. В день 12 собирали тестируемую кровь и анализировали титр антител в сыворотке с помощью ELISA. В день 15 у мышей с высоким титром удаляли объединенные PLN. Для сбора лимфоцитов PLN два раза промывали DMEM без добавок, а затем разъединяли, пропуская через экран 0,22 мкм (Falcon #352350, BD Bioscience, San Jose, CA). Полученные лимфоциты промывали еще 2 раза перед слиянием. Миеломные клетки F0 смешивали с лимфоцитами в соотношении 2,5 лимфоцитов к 1 клетке F0. Смесь клеток центрифугировали, а затем к клеточному осадку по каплям добавляли 1 мл PEG 1500 в течение 1 мин. Через 30 секунд медленно добавляли 1 мл DMEM и через 1 мин добавляли 19 мл DMEM в течение 5 мин. Подвергнутые слиянию клетки осаждали, суспендировали при плотности 2×10^5 клеток/мл в средах НАТ (DMEM+20% FBS, Pen/Strep/Glu, 1-кратный NEAA, 1-кратный НАТ, 0,5-кратный HFCS) и помещали при 37°C на один час. Затем клетки помещали в 384-луночные планшеты при 60 мкл/лунку.

Скрининг гибридом, секретирующих антитела против cKIT

Через десять дней после слияния, планшеты с гибридомой подвергали скринингу на наличие cKIT-специфичных антител. Для скрининга с помощью ELISA 384-луночные планшеты Maxisorp (Nunc #464718) покрывали 50 мкл cKIT (разбавленного до 15 нг/лунку в

PBS) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Оставшийся белок отсасывали и лунки блокировали 1% BSA в PBS. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре лунки промывали четыре раза PBS+0,05% Tween (PBST). 15 мкл супернатанта гибридомы переносили на планшеты для ELISA. 15 мкл сыворотки мыши, взятой во время удаления PLN, разбавляли 1:1000 в PBS и добавляли в качестве положительного контроля. 50 мкл вторичного антитела (HRP-конъюгированного антитела козы против IgG мыши (Jackson Immuno Research #115-035-071, West Grove, PA), разбавленного 1:5000 в PBS) добавляли во все лунки на планшетах для ELISA. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа планшеты восемь раз промывали PBST. Добавляли 25 мкл TMB (KPL #50-76-05) и через 30 мин инкубации при комнатной температуре считывают оптическую плотность в планшетах при 605 нм. Клетки из положительных лунок выращивали в 24-луночных планшетах в средах HT (DMEM+20 % FBS, Pen/Strep/Glu, 1-кратный NEAA, 1-кратный HT, 0,5-кратная HFCS).

Очистка антитела

Супернатант, содержащий антитела против cKIT, очищали с использованием протеина G (Upstate # 16-266 (Billerica, MA)). Перед нагрузкой супернатантом смолу уравнивали 10 объемами колонки PBS. После связывания образца колонку промывали 10 объемами колонки PBS, а затем элюировали антитело 5 объемами колонки 0,1 М глицина, pH 2,0. Фракции колонки незамедлительно нейтрализовали 1/10 объема Трис-HCl, pH 9,0. Измеряли OD280 фракции и положительные фракции объединяли и диализовали в течение ночи относительно PBS, pH 7,2.

Пример 2: Гуманизация и созревание аффинности антител против cKIT

Дизайн гуманизации

Последовательностями VH и VL антитела против cKIT 9P3, полученного из гибридомы, являются SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:18, соответственно. Аминокислотными последовательностями константных доменов IgG1 человека, используемых для получения полного IgG1, являются SEQ ID NO:10 для тяжелой цепи и SEQ ID

NO:19 для легкой цепи. Гуманизацию тяжелой цепи осуществляли графтингом 3 областей CDR (GFTFSDYYMA (SEQ ID NO: 148,)) (NINYDGSSTYYLDS (SEQ ID NO:149)) и (GDYYGTTYWYFDV (SEQ ID NO:150)) из антитела против сKIT 9P3 на акцепторный каркас зародышевой линии человека VH3_3-07 (база данных vBASE). Гуманизацию легкой цепи осуществляли графтингом 3 областей CDR (RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 151)), (YTSRLQS (SEQ ID NO: 152)) и (QQGKKLWS (SEQ ID NO: 153)) из антитела против сKIT 9P3 на акцепторный каркас зародышевой линии человека VK3-L25 (база данных vBASE) или графтингом 2 областей CDR (SEQ ID NO:152 и SEQ ID NO:153) на акцепторный каркас зародышевой линии человека VK1-012 (база данных vBASE). В дополнение к областям CDR, из последовательности 9P3 оставляли один каркасный остаток из переменного домена легкой цепи, т.е. VL #71 и в случае VK3-L25 VL #79 (нумерация остатков на основе SEQ ID NO: 21). Кроме того, J-элементы человека JH4 и JK4 использовали для тяжелой и легкой цепи, соответственно. Полученной аминокислотной последовательностью тяжелой цепи гуманизированного антитела являлась SEQ ID NO: 11, и в случае двух легких цепей - SEQ ID NO: 20 (VK1-012) и SEQ ID NO: 21 (VK3-L6).

Авторы настоящего изобретения выдвигали гипотезу о том, что аспартатный аминокислотный мотив с последующим глицином (DG) может являться восприимчивым к посттрансляционной модификации (образованию изоаспартата), и что лизины в CDR могут снижать фракцию активного антитела после конъюгации антитела и лекарственного средства. Для оптимизации гуманизированных антител использовали комбинацию случайного мутагенеза (т.е. ПЦР пониженной точности) и направленного мутагенеза.

Получение гуманизированных последовательностей

Последовательности ДНК, кодирующие гуманизированные домены VL и VH, заказывали в GeneArt (Life Technologies Inc. Regensburg, Germany), включая оптимизацию кодонов для *homo sapiens*. Последовательности, кодирующие домены VL и VH, субклонировали с помощью вырезания и вставки из векторов, полученных из GeneArt, в экспрессирующие векторы, подходящие

для секреции в клетках млекопитающих. Тяжелые и легкие цепи клонировали в отдельные экспрессирующие векторы, чтобы сделать возможной котрансфекцию. Элементы экспрессирующего вектора включают промотор (энхансер-промотор цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, делающий возможной эписомную репликацию и репликацию в прокариотах (например, точку начала репликации SV40 и ColE1 или другие известные в этой области), и элементы, делающие возможной селекцию (ген резистентности к ампициллину и маркер зеоцин).

Экспрессия и очистка гуманизированных антител

Эмбриональные клетки почки человека, конститутивно экспрессирующие большой антиген Т SV40 (HEK293-T ATCC11268), являются одними из предпочтительных линий клеток-хозяев для транзитной экспрессии гуманизированных и/или оптимизированных белков IgG. Трансфекцию осуществляют с использованием PEI (полиэтиленимина, MW 25000, линейный, Polysciences, USA, кат. № 23966) в качестве реагента для трансфекции. Стоковый раствор PEI получают, осторожно растворяя 1 г PEI в 900 мл воды категории для культивирования клеток при комнатной температуре (RT). Для облегчения растворения PEI раствор подкисляют добавлением HCl до pH 3-5 с последующей нейтрализацией с помощью NaOH до конечного pH 7,05. В конечном итоге, объем доводят до 1 л и фильтруют раствор через фильтр 0,22 мкм, аликвотируют и замораживают при -80°C до дальнейшего использования. После размораживания аликвоту можно снова замораживать до 3 раз при -20°C, но нельзя длительно хранить при -20°C. Клетки HEK 293T культивируют с использованием патентованной бессывороточной среды для культивирования Novartis для трансфекции и выращивания клеток и бессывороточной среды для культивирования ExCell VPRO (SAFC Biosciences, USA, кат. № 24561C) в качестве среды для продукции/питательной среды. Клетки, полученные для транзитной трансфекции, культивируют в суспензионной культуре. В случае маломасштабных

(<5 л) трансфекций клетки выращивают во встряхиваемых колбах Corning (Corning, Tewksbury, MA) на орбитальном шейкере (100–120 об./мин.) во влажной камере при 5% CO₂ (колбы для посевных культур). Клетки в посевных культурах необходимо поддерживать в фазе экспоненциального роста (при плотностях клеток от 5×10^5 до 3×10^6 /мл), и для трансфекции они должны демонстрировать жизнеспособность >90%. Плотности клеток вне этого диапазона будут приводить к лаг-фазе после разведения или сниженной эффективности трансфекции. В случае маломасштабной (<5 л) трансфекции отбирают аликвоту клеток из посевных культур и доводят до $1,4 \times 10^6$ клеток/мл в 36% конечного объема с помощью бессывороточной среды для культивирования Novartis. Раствор ДНК (раствор 1: 0,5 мг плазмиды, экспрессирующей тяжелую цепь, и 0,5 мг плазмиды, экспрессирующей легкую цепь, для трансфекции в 1 л) получают разбавлением ДНК до 1 мг/л (конечный объем) в 7% конечного объема культуры с последующим осторожным перемешиванием. Для предотвращения бактериальной контаминации этот раствор фильтруют с использованием фильтра 0,22 мкм (например, Millipore Stericup). Затем 3 мг/л (конечный объем) раствора PEI также разводят в 7% конечного объема культуры и осторожно перемешивают (раствор 2). Оба раствора инкубируют в течение 5–10 мин при комнатной температуре (RT). Затем раствор 2 добавляют в раствор 1 при осторожном перемешивании и инкубируют еще 5–15 минут при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекции добавляют к клеткам и продолжают культивирование клеток в течение 4–6 часов. В конечном итоге, оставшиеся 50% общего объема продукции получают добавлением бессывороточной среды для культивирования ExCell® VPRO. Культивирование клеток продолжают в течение одиннадцати дней после трансфекции. Культуру собирают посредством центрифугирования при 4500 об./мин. в течение 20 минут при 4°C (Heraeus®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Rockford, IL). Полученный супернатант клеток стерилизуют фильтрацией через фильтр Stericup (0,22 мкм) и хранят при 4°C до дальнейшей обработки.

Очистку осуществляли с помощью системы для хроматографии "АКТА 100 explorer Air" при 4°C в охлаждаемой камере с использованием свежепродезинфицированной (0,25 М NaOH) колонки HiTrap ProtA MabSelect®SuRe, 5 мл. Колонку уравнивали 5 объемами колонки (CV) PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), в затем стерилизованный фильтрат супернатант (2 л) загружали при 4,0 мл/мин. Колонку промывали 8 CV PBS для элюирования несвязавшегося образца и снова промывали 5 CV PBS. Антитело элюировали 5 CV 50 мМ цитрата, 70 мМ NaCl pH 3,2. Элюат собирали в 3 мл фракциях; фракции объединяли и доводили до pH 7 с помощью 1 М Трис-HCl, pH 10. Совокупности объединяли и стерилизовали фильтрацией (Millipore Steriflip, 0,22 мкм), измеряли OD 280 нм с помощью спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop), и вычисляли концентрацию белка с учетом данных о последовательности. Элюат тестировали на агрегацию (SEC-MALS) и чистоту (SDS-PAGE, LAL и MS). Для второго этапа очистки, при необходимости, совокупности, полученные при первой очистке, загружали на свежепродезинфицированный (0,5 М NaOH) SPX (Hi Load 16/60 Superdex 200 категории 120 мл (GE-Healthcare)). Колонку уравнивали PBS и осуществляли эксперимент с использованием буфера PBS при 1 мл/мин, элюат собирали в 1,2 мл фракции и анализировали, как описано для первого этапа очистки.

Пример 3: Скрининг на антитела против cKIT

Пэннинг HuCAL PLATINUM®

Для селекции антител, распознающих cKIT человека, использовали множество стратегий пэннинга. Терапевтические антитела против белков cKIT человека получали посредством селекции клонов, имеющих высокие аффинности связывания, с использованием в качестве источника вариантов белков антител коммерчески доступную библиотеку фагового дисплея, библиотеку Morphosys HuCAL PLATINUM® (Morphosys, Munich DE). Фагмидная библиотека основана на концепции HuCAL® (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296: 57-86), и в ней используют технологию CysDisplay® для экспонирования Fab на поверхности фага (Lohning, WO 01/05950). Для выделения антител против cKIT

стандартные стратегии пэннинга осуществляли с использованием подходов твердофазного пэннинга, пэннинга в растворе, пэннинга целых клеток и дифференциального пэннинга целых клеток.

Твердофазный пэннинг против cKIT

96-луночный планшет Maxisorp™ покрывали слитым белком cKIT человека или мыши/Fc в течение ночи при 4°C. Для каждого пэннинга приблизительно 4×10^{13} фаговых антител NuCAL PLATINUM® добавляли к каждому покрывающему антигену и инкубировали в течение 2 часов при RT на шейкере для планшетов для микротитрования. Затем неспецифически связавшиеся фаги вымывали с помощью нескольких этапов промывки и специфически связавшиеся фаги элюировали с использованием 25 mM DTT в 10 mM Трис/HCl, pH 8.

Элюат переносили в 14 мл бактерий *E. coli* и инкубировали для инфицирования фагом. Инфицированные бактерии ресуспендировали в среде 2xYT, переносили на чашки с агаром LB/Sam и инкубировали в течение ночи. Колонии соскребали с чашек и использовали для выделения фага, поликлональной амплификации выбранных клонов и продукции фага. Следующий раунд пэннинга начинали с очищенного фага.

Второй и третий раунд твердофазного пэннинга осуществляли по протоколу первого раунда, за исключением сниженных количеств антигена и более жестких условий промывки.

Пэннинг с захватом против cKIT

Для пэннинга с захватом слитые белки антиген cKIT/Fc мыши иммобилизовали на 96-луночном планшете Maxisorp™ с помощью иммобилизованного антитела козы против Fc мыши. При блокировании фага к блокирующему буферу добавляли γ-глобулин человека и мыши для избежания селекции антител против иммобилизованного антитела и части Fc мыши антигена. Покрывание антигеном и блокирование фага при пэннинге с захватом осуществляли, как описано для твердофазного пэннинга (см. выше).

Пэннинг в растворе с использованием магнитных частиц, связанных со стрептавидином

Пэннинг в растворе осуществляли двумя разными способами ("классическим" и "альтернативным"). Для каждого пэннинга приблизительно 4×10^{13} фаговых антител NuCAL PLATINUM® блокировали равным объемом 2-кратного Chemiblocker/0,1% Tween20. Для удаления фага, связывающегося со стрептавидином или частицами, преадсорбцию заблокированных фаговых частиц осуществляли два раза, каждый раз с использованием 1 мг заблокированных стрептавидиновых частиц.

а) "Классический" способ: Биотинилированное mAb 16P23 инкубировали с белком ECD cKIT человека-His и добавляли к заблокированным фаговым частицам. Антитело 16P23 является полученная для внутреннего пользования гибридома, и его использовали в различных протоколах скрининга в качестве иммобилизованного антитела для экспонирования различных доменов на ECD cKIT. Антитело 16P23 также использовали для связывания антитела. После инкубации комплексы фаг-антиген иммобилизовали с использованием стрептавидиновых частиц и фаговые частицы, связавшиеся со стрептавидиновыми частицами, собирали с использованием магнитного сепаратора.

б) "Альтернативный" способ: Биотинилированное mAb 16P23 добавляли к стрептавидиновым частицам и смесь антитела и частиц инкубировали на ротаторе при RT в течение 30 мин. Частицы промывали и ресуспендировали в PBS, содержащем белок ECD cKIT человека-His. Затем, добавляли фаг и комплекс антитело-частица-антиген-фаг перемешивали на ротаторе еще в течение 1 часа при RT. После этого последнего этапа инкубации частицы иммобилизовали с использованием магнитного сепаратора и отбирали супернатанты.

Используя оба способа дисплея, неспецифически связавшийся фаг вымывали с помощью нескольких этапов промывки с использованием PBS/0,05% Tween20 и PBS. Специфически связавшийся фаг элюировали из стрептавидиновых частиц с использованием 25 mM DTT в 10 mM трис/HCl, pH 8. Последующее инфицирование фагом и продукцию фага осуществляли согласно протоколу твердофазного пэннинга.

Второй и третий раунд пэннинга в растворе осуществляли по протоколу первого раунда, за исключением сниженных количеств антигена и более строгих условий промывки.

Пэннинг целых клеток против cKIT

Клетки-мишени, экспрессирующие антиген cKIT человека, мыши или крысы, использовали в качестве антигенов и приводили в контакт с NuCAL PLATINUM[®] фаг-антителами для пэннинга. Комплексы фаг-клетка промывали три раза в PBS/5% FCS. Элюирование специфически связавшегося фага из клеток-мишеней осуществляли с использованием 0,1 М глицин-HCl/0,5 М NaCl, pH 2,2. Последующее инфицирование фагом и продукцию фага осуществляли согласно протоколу твердофазного пэннинга. Второй и третий раунд пэннинга целых клеток осуществляли по протоколу первого раунда.

Дифференциальный пэннинг целых клеток против cKIT

При дифференциальном пэннинге целых клеток селекцию осуществляли поочередно на клетках и очищенном белке. Раунды селекции на очищенном антигене осуществляли, как описано протоколе твердофазного пэннинга. Раунды селекции на клетках см. в разделе о пэннинге целых клеток против cKIT.

Пэннинг созревания

Для получения специфических антител с повышенными аффинностями осуществляли пэннинг созревания (Prassler et al., Future Med. Immuno. 2009 1(4):571-583)). С этой целью секвенированные клоны, уже протестированные на специфическое связывание с cKIT, использовали для замены кассет LCDR3 или HCDR2. Затем осуществляли два раунда твердофазного пэннинга с использованием слитого белка cKIT человека и/или мыши/Fc, как описано в протоколе твердофазного пэннинга.

а) Для LCDR3 RapMAT[®]: Fab-кодирующие фрагменты полученной из фага ДНК вектора pMORPFBO[®] (Morphosys, Munich DE) ферментативно расщепляли и заменяли вставки кассетами созревания TRIM[™] LCDR3 (Virnekaes et al., NAR 1994 22(25):5600-5607)). Затем, 1,25 мкг вектора для дисплея pMORPFBO[®] лигировали с фрагментом вставки, несущим диверсифицированные LCDR3.

б) Для HCDR2 RapMAT[®]: После 2-го раунда пэннинга Fab-кодирующие фрагменты полученной из фага ДНК вектора pMORPFBO[®] ферментативно расщепляли и заменяли вставки кассетами созревания TRIM[™] HCDR2 (Virnekas et al., выше). Затем, 1,25 мкг вектора для дисплея pMORPFBO[®] лигировали с фрагментом вставки, несущим диверсифицированные HCDR2.

Полученные библиотеки амплифицировали и подвергали двум раундам пэннинга с повышенной жесткостью и сниженной концентрацией антигена или изменениями антигена скИТ человека и мыши для идентификации клонов с улучшенной аффинностью.

Получение Fab-содержащих бактериальных лизатов для скрининга с помощью ELISA

Для исходного скрининга и характеристики ночную культуру отдельных Fab-экспрессирующих клонов *E.coli* лизировали с использованием лизоцима, 4 мМ ЭДТА и 10 Ед./мкл бензоназы. Fab-содержащие лизаты *E. coli* использовали для скрининга с помощью ELISA, FACS и SET.

Скрининг Fab-содержащих необработанных бактериальных лизатов

Скрининг с помощью ELISA

Используя скрининг с помощью ELISA, отдельные клоны Fab из результатов пэннинга идентифицируют по связыванию с антигеном-мишенью. Fab тестируют с использованием Fab-содержащих необработанных лизатов *E. coli*.

ELISA для проверки экспрессии Fab

Для подтверждения экспрессии Fab в полученных лизатах *E. coli* 384-луночные планшеты Maxisorp[™] (Nunc, Sigma-Aldrich, St.Louis MO) покрывали антителом овцы против IgG человека, специфичным к Fd-фрагменту, разведенным 1:1000 в PBS. После блокирования 5% сухим обезжиренным молоком в PBS, содержащим 0,05% Tween20, добавляли Fab-содержащие лизаты *E. coli*. Затем связавшиеся HuCAL[®]-Fab-фрагменты детектировали посредством инкубации с F(ab)₂-специфичным антителом козы против IgG человека, конъюгированным с щелочной фосфатазой (разведенным 1:5000), с последующим добавлением флуоресцентного субстрата AttoPhos[®] (Roche, #11681982001, Mannheim, DE). Флуоресценция

при 535 нм регистрировали с возбуждением при 430 нм.

Скрининг ELISA на прямом покрытии антигеном

384-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали mFc-меченым белком ECD cKIT человека в концентрации 10 мкг/мл в PBS. После блокирования планшетов 5% сухим обезжиренным молоком в PBS добавляли Fab-содержащие лизаты *E. coli*. Связывание Fab детектировали с использованием F(ab)₂-специфичного антитела козы против IgG человека, конъюгированным с щелочной фосфатазой (разведенным 1:5000), с использованием флуоресцентного субстрата Attophos® (Roche, #11681982001, Mannheim, DE). Флуоресценцию при 535 нм регистрировали с возбуждением при 430 нм.

Связывание эпитопа Fab BEL лизатами

Для идентификации потенциальных связывающих лиганд конкурентов перед созреванием аффинности, осуществляли скрининг с помощью конкурентного ELISA с использованием лизатов Fab *E. coli* и антитела 16P23, известного связывающего лиганд конкурента. С этой целью, 384-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали mFc-меченым белком ECD cKIT человека и блокировали, как описано выше (Скрининг ELISA на прямом покрытии антигеном).

Добавляли mAb 16P23 в конечной концентрации 5 мкг/мл с последующей инкубацией с Fab-содержащими лизатами *E. coli*. В конечном итоге, связывание Fab детектировали с помощью конъюгированного с щелочной фосфатазой антитела против FLAG (Sigma A-9469, разведенного до 1:10000) с использованием флуоресцентного субстрата Attophos® (Roche, #11681982001). Флуоресценцию при 535 нм регистрировали с возбуждением с 430 нм.

Скрининг с помощью FACS

При скрининге с помощью FACS из результатов пэннинга идентифицируют отдельные клоны Fab, связывающиеся с поверхностью клеток, экспрессирующих антиген. Fab тестируют с использованием Fab-содержащих необработанных лизатов *E. coli*.

Скрининг с помощью FACS осуществляли в формате 96- или 384-луночного планшета:

а) В формате 96-луночного планшета с использованием

устройства BD FACS 100 мкл суспензии клеток переносили на новый 96-луночный планшет (получая 1×10^5 клеток/лунку). Планшет, содержащий целевую клеточную суспензию, центрифугировали и удаляли супернатант. Оставшийся клеточный осадок ресуспендировали и в соответствующие лунки добавляли 50 мкл Fab-содержащих экстрактов BEL. Планшет инкубировали на льду в течение 1 часа. После инкубации клетки центрифугировали и три раза промывали 200 мкл буфера для FACS (PBS, 3% FCS). После каждого этапа промывки клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали. Добавляли вторичное детекторное антитело (PE-конъюгированное антитело козы против IgG человека; Dianova, Hamburg, DE) и образцы инкубировали на льду, а затем промывали в соответствии с инкубацией Fab. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS на лунку и анализировали образцы с помощью устройства BD FACS.

b) В формате 384-луночного планшета с использованием устройства BD Calibur® HTS (BD Biosciences, San Jose, CA) 20 мкл суспензии клеток переносили в новый 384-луночный круглодонный планшет (получая 4×10^4 клеток/лунку). Планшет, содержащий клеточную суспензию, центрифугировали и удаляли супернатант. Оставшийся клеточный осадок ресуспендировали и в соответствующие лунки добавляли 20 мкл Fab-содержащих экстрактов. Планшет инкубировали в течение 1 часа со встряхиванием при 4°C. После инкубации клетки центрифугировали и три раза промывали 40 мкл буфера для FACS (PBS, 3% FCS). После каждого этапа промывки клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали. Добавляли 40 мкл PE-конъюгированного детекторного антитела козы против человека и инкубировали образцы на льду, а затем промывали в соответствии с инкубацией Fab. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспендировали в 35 мкл буфера для FACS на лунку и образцы измеряли с использованием устройства BD FACS Calibur/HTS.

Определение аффинности

Для определения K_D использовали мономерные фракции белка антитела (содержание мономера по меньшей мере 90%,

анализируемое с помощью аналитического SEC; Superdex 75 PC3.2/30 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) для Fab, или Tosoh TSKgel G3000 SW_{XL} (7,8 мм/30,0 см) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, DE) для IgG, соответственно).

Способ равновесного титрования раствора (SET) для определения KD с использованием Sector Imager 6000 (MSD)

Определение аффинности в растворе, по существу, осуществляли как описано в литературе (Friquet et al., J. Immuno. Meth. 1985; 77:305-319). Для улучшения чувствительности и точности способа SET, его преобразовывали из классического ELISA в технологию на основе ECL (Haenel et al., Anal. Biochem. 2005 339(1):182-4). 1 мг/мл специфичных к (Fab)₂-фрагменту антител козы против человека (Dianova) метили MSD Sulfo-TAGTM NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) по инструкциям производителя. Планшеты MSD покрывали антигеном и на них переносили уравновешенные образцы. После промывки в планшет MSD добавляли 30 мкл на лунку MSD-sulfo-tag-меченого детекторного антитела (против (Fab)₂ человека) и инкубировали на шейкере. После промывки планшета MSD и добавления 30 мкл/лунку MSD Read Buffer T с поверхностно-активным веществом детектировали сигналы электрохемилюминесценции с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Данные оценивали с использованием программного обеспечения XLfit (IDBS), в котором используют специализированные модели аппроксимации. Для определения K_D молекул Fab использовали следующую модель аппроксимации (по (Haenel et al., Anal. Biochem 2005;339(1): 182-184), модифицированную по (Abraham et al., J. Mol. Recogn 1996; 9:456-461)):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

[Fab]_t: используемая общая концентрация Fab

x: используемая общая концентрация растворимого антигена

(участков связывания)

$B_{\max}$: максимальный сигнал Fab без антигена

K_D : аффинность

Для определения K_D молекул IgG следующую модель аппроксимации (модифицированную по (Piehler et al., 1997)):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

$[IgG]$: используемая общая концентрация IgG

x : используемая общая концентрация растворимого антигена (участков связывания)

$B_{\max}$: максимальный сигнал IgG без антигена

K_D : аффинность

Экспериментальные условия:

Определение K_D NuCAL[®] IgG против cKIT, по существу, осуществляли следующим образом: cKIT человека-Fc покрывали при 0,1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C на стандартных планшетах MSD/буфере для анализа в течение 1 часа при RT на планшетах MSD со стрептавидином. Затем планшеты MSD блокировали PBS с 3% BSA в течение 1 часа при RT. Планшеты со стрептавидином блокировали в течение ночи при 4°C с использованием PBS с 5% BSA перед покрыванием антигеном. Для титрования использовали антиген cKIT человека-His.

Затем, количественного анализировали концентрацию несвязавшегося Fab с помощью детекции ECL с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA). Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения XLfit (IDBS), в котором используют соответствующую модель аппроксимации для оценки аффинностей и, таким образом, идентификации клонов, наиболее улучшенных с помощью созревания.

Биохимические анализы *in vitro* (анализ перекрестной

реактивности и связывания доменов)

Очищенные IgG тестировали с помощью ELISA на связывание с полноразмерными белками ECD cKIT человека, яванского макака и мыши, а также конструкциями доменов ECD cKIT человека D1-3 и D4-5. С этой целью планшеты покрывали антигеном в концентрации 5 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Связывание IgG детектировали с помощью F(ab)₂ против человека или против мыши, конъюгированного с щелочной фосфатазой (разведенного 1:5000 в 1% MPBS), с использованием Attophos® в качестве субстрата. Флуоресценцию измеряли при возбуждении при 430 нм и эмиссии при 535 нм.

Сортировка очищенных IgG по эпитопу

Очищенные кандидаты IgG тестировали на конкуренцию с полученными для внутреннего пользования исследовательскими антителами, которые, как показано ранее, определяют отдельные "бины" на внеклеточном домене cKIT. С этой целью планшеты Maxisorp™ покрывали IgG при постоянном количестве и тестировали на конкуренцию с повышающимися количествами конкурентного IgG в растворе. В качестве положительного контроля IgG покрытия анализировали на конкуренцию с самим собой в растворе. Все тестируемые IgG преинкубировали в 50-кратном избытке с гликобiotинилированным слитым белком cKIT человека-Fc в течение 1 часа при RT в растворе. Затем комплексы антиген/антитело добавляли к покрытым антителам и осуществляли детекцию связавшихся комплексов с помощью биотинилированного антигена. В целом, сигналы при высокой концентрации IgG можно получать только, когда IgG покрытия способны связываться с доступными эпитопами на антигене, различными для тестируемых IgG в растворе (т.е. неконкурирующее антитело). Наоборот, в случае конкурирующих антител, антител с частично перекрывающимися эпитопами или антител, блокирующих эпитоп посредством стерического несоответствия, сигналы связывания при высокой концентрации IgG значительно снижались в отличие от контролей.

Соответствующие лунки планшетов Maxisorp™ покрывали с использованием разведения IgG 20 мкл/лунку в концентрации 1,2

мкг/мл в PBS, инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем 3 раза промывали PBST. Планшеты блокировали 90 мкл 3% BSA/PBS на лунку в течение 1 часа при RT и 3 раза промывали PBST.

Определение EC50 на клетках с помощью FACS

Очищенные IgG тестировали в одной концентрации или титровали в FACS для определения значений EC50 для связывания с поверхностью клеток, экспрессирующих cKIT человека, мыши или крысы. С этой целью, клетки Mo7e, P815 или RBL-2H3 собирали с использованием Accutase® (Life Technologies, Carlsbad, CA) и разводили до 1×10^6 /мл в буфере для FACS. Все последующие этапы осуществляли на льду для предотвращения интернализации рецептора. Клеточную суспензию наносили на 96-луночный планшет с U-образным дном при 100 мкл/лунку. После центрифугирования при 210 g в течение 5 мин при 4°C удаляли буфер. Затем добавляли 100 мкл специфичных mAb, разведенных в буфере для FACS, на лунку в концентрации 15 мкг/мл или в экспериментах по титрованию в концентрациях серийного разведения антитела (пошаговое разведение 1:3, начальная концентрация 15 мкг/мл). После инкубации на льду в течение 1 часа клетки промывали три раза 150 мкл буфера для FACS. К клеткам добавляли 100 мкл/лунку вторичного PE-конъюгированного детекторного антитела козы против человека (разбавленное 1:200 в буфере для FACS) и инкубировали на льду в течение 1 часа. Клетки промывали три раза 150 мкл буфера для FACS. В конечном итоге, клеточные осадки ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS на лунку и анализировали образцы с помощью устройства BD FACS.

Биологические анализы *in vitro*

Анализ SCF-зависимой пролиферации

Анализ пролиферации осуществляли с использованием клеточной линии Mo7e (острый мегакариобластический лейкоз человека, DSMZ №: ACC 104), культивируемой в RPMI1640 со стабильным глутамином (PAN #P04-18500), 10 % FCS и 10 нг/мл SCF (R&D кат. №255-SC; Lot#CM2810061, R&D Corp, Berkeley CA).

В анализе SCF-зависимой пролиферации тестировали очищенные IgG или супернатанты культур клеток, содержащих IgG. В обоих

вариантах экспериментальных условий клетки собирали, ресуспендировали в 50 мл "голодной среды" (среды для культивирования без SCF) в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Затем клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в "голодной среде" с 60 нг/мл SCF (2-кратной концентрации, конечная концентрация после добавления антитела составляет 30 нг/мл). Добавляли 50 мкл клеток (5×10^4 клеток/лунку) и 50 мкл 2-кратно концентрированных очищенных антител или неразбавленных супернатантов культур клеток на лунку белых 96-луночных плоскодонных планшетов с прозрачным дном. В качестве отрицательных и положительных контролей включали клетки без SCF и без антитела или клетки с SCF и без антитела. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C и, в конечном итоге, количества клеток определяли с использованием CellTiter-Glo® (Promega #G7571, Promega, Madison, WI) по инструкциям производителя.

Fab-ZAP ADC Piggyback Assay

Для тестирования способности антител интернализироваться после связывания рецептора осуществляли анализ ADC, смешивая реагент Fab-ZAP (mAb козы против человека, соединенное с сапорином; ATS Biotechnology, кат. № IT-51-250, ATS Bio, San Diego, CA) с очищенными IgG или с супернатантами культур клеток, содержащими IgG. Цитотоксический потенциал тестировали с использованием линии злокачественных клеток CMK-11-5 (клеток острого мегакариобластического лейкоза, культивируемых в RPMI1640+10% FCS), т.к. эти клетки демонстрируют высокую экспрессию cKIT.

Клетки в культуре подсчитывали и разбавляли в среде до концентрации 1×10^5 клеток/мл. 50 мкл клеточной суспензии (5000 клеток/лунку) переносили в 96-луночные планшеты (ТС-обработанные белые плоскодонные планшеты с прозрачным дном, Corning кат. № 3903, Corning, Tewksbury, MA). В отдельном планшете (96-луночный с V-образным дном, Nunc, кат. № 249946, Nunc Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) IgG разбавляли в среде.

Разбавляли супернатанты культур клеток, содержащие IgG, 1:125 и очищенные IgG до концентрации 0,4 нМ, получая общий объем 60 мкл/лунку. Добавляли равный объем раствора FabZAP в концентрации 5 нМ и инкубировали планшеты в течение 60 мин при 37°C. 50 мкл конъюгатов антитело/Fab-ZAP переносили к клеткам CMK-11-5 (общий объем 100 мкл). В качестве контролей получали лунки только с клетками (=100% контроль жизнеспособности) и клетками, инкубированными только с Fab-ZAP (для проверки неспецифического уничтожения вторичного реагента). Конечная концентрация Fab-ZAP составляли 1,25 нМ. Планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂. Количества клеток определяли с использованием CellTiter-Glo® (Promega #G7571) по инструкциям производителя. Жизнеспособность нормализовали по контролю только с клетками.

Резюме

При скрининге на антитела против cKIT осуществляли 2 различные стратегии:

Стратегия 1:

Кандидатов с перекрестной реактивностью человека/яванского макака (217 семейств HCDR3) подвергали селекции на высокую аффинность и после конверсии IgG клоны подвергали скринингу на функциональность в анализе CMK-11-5 FabZAP ADC и анализе пролиферации Mo7e. Учитывая функциональную активность и разнообразие, кандидатов подвергали селекции по экспрессии в исследовательском масштабе.

Стратегия 2:

Кандидатов с перекрестной реактивностью человека/яванского макака/мыши (5 семейств HCDR3) подвергали аффинному созреванию и после конверсии IgG кандидатов подвергали селекции по экспрессии.

Таким образом, 82 очищенных IgG-кандидатов из стратегии 1 и 2 подвергали тщательной характеристике. Из этой совокупности 82, 26 IgG-кандидатов подвергали селекции на продукцию большего масштаба, конъюгации с токсином и последующему тестированию в качестве лекарственных конъюгатов антител в экспериментах *in*

vitro и *in vivo*.

После тщательной характеристики 26 антител (14 кандидатов из стратегии 1 и 12 кандидатов из стратегии 2), принадлежащих к 16 различным семействам HCDR3, подвергали селекции а продукцию большего масштаба и тестированию в качестве конъюгата антитело-DM1. Кандидатов подвергали селекции по следующим критериям: 1) Активное уничтожение клеток, экспрессирующих cKIT дикого типа и мутантный cKIT, в анализе piggyback Fab-DM1 с EC50 в суб- и низконаномальном диапазоне, 2) значения KD 24/26 IgG для cKIT яванского макака находятся в пределах 3-кратного диапазона относительно определенного для cKIT человека. Кроме того, 12/26 IgG перекрестно реагируют с cKIT мыши и крысы, экспрессируемым на клетках.

Выбранные кандидаты из этого скрининга можно относить к различным бинами эпитопов:

1) 19/26 IgG принадлежат к бину 1 или бину 6 (связывание с cKIT D1-3, лиганд-связывающие домены)

2) 6/26 IgG принадлежат к бину 8 (связывание с cKIT D4-5, домены димеризации)

3) 1/26 IgG принадлежит к бину 2, имеющему высокую аффинность к cKIT человека, но имеет лишь слабую аффинность к cKIT яванского макака. Примером антитела, полученного с помощью этого типа протокола скрининга, является антитело 20376.

Пример 4: Конструкции для белков ECD cKIT человека, яванского макака, мыши и крысы

Внеклеточные домены cKIT человека, мыши и крысы генетически синтезировали с учетом аминокислотных последовательностей из баз данных GenBank или Uniprot (см. таблицу 2 ниже). Матрицу кДНК cKIT яванского макака и 1 ECD генетически синтезировали с учетом информации об аминокислотных последовательностях, полученной с использованием мРНК из различных тканей яванского макака (например, Zyagen Laboratories; таблица 2 ниже). Все синтезированные фрагменты ДНК клонировали в соответствующие экспрессирующие векторы, например, вектор на основе hEF1-HTLV (pFUSE-mIgG2A-Fc2) с С-концевыми метками, способствующими очистке.

Таблица 2

Название	Описание	Регистрационный номер	SEQ ID NO
CKIT человека D1-5	<u>CKIT человека укороченный вариант 2, остатки 26-520-TAG</u> QPSVSPGEPSPPSIHGKSDLIVRV GDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDET ENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNK HGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYS LKG CQ GKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSV KRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKF ILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKREN SQT KLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSAN VTTTLEVV DKGFINIFPMINTTVFV NDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIY MNRTFTDKWEDYPKSESNIRYVS ELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVN AAIAFN VYVNTKPEILTYDRLVNGM LQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRC SASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQ SSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKT SAYFNFAFKEQIHPHTLFTPRSHHH HHH	NM_001093772	(SEQ ID NO.154)
CKIT человека D1-3	<u>CKIT человека укороченный вариант 1, остатки 26-311-TAG</u> QPSVSPGEPSPPSIHGKSDLIVRV GDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDET ENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNK HGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYS LKG CQ GKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSV KRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKF ILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKREN SQT KLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSAN VTTTLEVV DKGGRSHHHHHH	NM_000222	(SEQ ID NO.155)
CKIT человека D4-5	<u>CKIT человека укороченный вариант 1, остатки 311-524-TAG</u> GFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIV EYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWE	NM_000222	(SEQ ID NO.156)

	DYPKSENE SNIRYVSELHLTRLKGT EGGTYTFLVSN SDVNAAIAFN VYVN TKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPE PTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQ TLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKH NGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKG NNKEQIHPHTLFTPRSHNNHHH		
СКІТ яванского макака D1-5	<u>СКІТ яванского макака, остатки 25-520-TAG</u>	Нет данных.	(см. ниже)
СКІТ мыши D1-5	<u>СКІТ мыши укороченный вариант 1, остатки 26- 527-TAG</u> sqpsaspgepsppsihpaqselive agdtlsltcidpdfvrwtfktyfne mvenkknewiqekaeatrtgtytcs nsngltssiyvfvr dpaklflvglp lfgkedsdalvrcpltdpqvsny sl iecdgkslptdltfvnpkagitik nvkrayhr lcvrcaaqr dgtwlhsd kftlkvraaikaipvsvpetshll kkgdtftvvctikdvstsvnsmwlk mnpqpqhiaqvkhnswhrgdfnyer qetltissarvddsgvfmcyanntf gsanvtttlkvvekgfinispvkn t tvfvtdgenvdlvveyeaypkpehq qwiymnrtsankgkdyvksdnksni ryvnqlrltrlkgteggtytflvsn sdasasvtfnvyvntkpeiltydrl ingmlqcvaegfpeptidwyfctga eqrcttpvspdvqvqnsvspfgk lvvqssidssvfrhngtveckasnd vgkssaffnfafkeqiahtlftpl evlfqgprsprgptikpcppckcpa pnllggpsvfifppkikdvlmisls pivtcvvvdvseddpdvqiswfvnn vevhtaqtqthredynstlr vvsal piqhqdwm sgkefkckvnnkdlpap iertiskpkgsvrapqvyvlppee emtkkqv tltcmvtdfmpediyvew tnngktelnykntepvl dsdgsyfm ysklrveknwvernsysc svvheg lhnhttk sfsrtpgk	NM_001122733	(SEQ ID NO.157)
СКІТ крысы D1- 5	<u>СКІТ крысы, остатки 25- 526-TAG</u> SQPSASPGEPSPPSIQPAQSELIVE AGDTIRLTCTDPAFVKWTFEILDVR	NM_022264	(SEQ ID NO.158)

	IENKQSEWIREKAEATHGTGKYTCVS GSGLRSSIYVFVRDPAVLFLVGLPL FGKEDNDALVRCPLTDPQVSNYSLI ECDGKSLPTDLKFVPNPKAGITIKN VKRAYHRLCIRCAAQREGKWMRSDK FTLKVRAAIKAIPVVSVPETSHLLK EGDTFTVICTIKDVSTSVDSMWIKL NPQPQSKAQVKRNSWHQGFNYERQ ETLTISSARVNDSGVFMCYANNTFG SANVTTLTKVVEKGFINFVKNTT VFTVDGENVDLVVEFEAYPKPEHQQ WIYMNRTPTNRGEDYVKSDNQSNIR YVNELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNS DVSASVTFDVYVNTKPEILTYDRLM NGRLQCVAAGFPEPTIDWYFCTGAE QRCTVPVPPVDVQIQNASVSPFGKL VVQSSIDSSVFRHNGTVECKASNAV GKSSAFFNFQAFKGNSEKIQPHTLF TPRSLEVLFGPGSPPLKECPPCAA PDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS PMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNN VEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALPSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEAE EMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDW TSNGRTEQNYKNTATVLDSGYSYFM YSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEG LHNHLTTKTISRSLGK		

Последовательности белка cKIT яванского макака

Конструкция	Аминокислотная последовательность в однобуквенном коде, подчеркнут сигнальный пептид	SEQ ID NO
cKIT яванского макака D1-5	MYRMQLLSICIALSLALVTNSQPSVSPGEPS PPSIHPAKSELIVRVGNEIRLLCIDPGFVK WTFEILDETNNENKQNEWITEKAEATNTGKY TCTNKHGLSSSIYVFVRDPAKLFLVDRSLY GKEDNDTLVRCPLTDPEVTSYSLKGCQGKP LPKDLRFVPDPKAGITIKSVKRAYHRLCLH CSADQEGKSVLSDKFILKVRPAFKAVPVVS VSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYST WKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTTL EVVDKGFNIFPMINTTVFVNDGENVDLIV EYEAFFPKPEHQWIIYMNRTFTDKWEDYPKS ENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVS NSDVNASIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGM LQCVAAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCASVL PVDVQTLNASGPPFGKLVVQSSIDSSAFKH NGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQ IHPHTLFTPRSHNNNNH	(SEQ ID NO.159)

Экспрессия рекомбинантных белков cKIT

Желаемые рекомбинантные белки cKIT экспрессировали в полученных из HEK293 клеточных линиях (293FS), ранее адаптированных к суспензионной культуре и выращиваемых в бессывороточной среде FreeStyle-293 (Gibco, кат. № 12338018). Маломасштабную и крупномасштабную продукцию белка осуществляли посредством транзиторной трансфекции и во множестве встряхиваемых колб (Nalgene), до 1 л каждая, с 293Fectin (Life Technologies, кат. № 12347019) в качестве носителя плазмиды. Тотальную ДНК и 293Fectin использовали в соотношении 1:1,5 (масс./об.). Соотношение ДНК и культуры составляло 1 мг/л. Супернатанты культур клеток собирали через 3-4 дней после трансфекции, центрифугировали и стерилизовали фильтрацией перед очисткой.

Пример 5: Очистка белка ECD cKIT человека, яванского макака, мыши и крысы и субдоменов cKIT 1-3 и 4-5

Очистка меченого белка

Рекомбинантные Fc-меченые белки внеклеточного домена cKIT (например, ECD cKIT человека-Fc, cKIT человека (субдомены ECD 1-3, 4-5)-Fc, cKIT яванского макака-mFc, cKIT крысы-mFc, cKIT мыши-mFc) выделяли из супернатанта культур клеток. Очищенный супернатант пропускали через колонку с протеин А-сефарозой, уравновешенную PBS. После промывки до базового уровня связавшийся материал элюировали буфером для элюирования с низким pH Pierce Immunopure или 100 мМ глицина (pH 2,7) и незамедлительно нейтрализовали 1/8 элюирующего объема 1 М Трис, pH 9. Объединенный белок, при необходимости, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra емкостью 15 мл с порогамы номинальной молекулярной массы 10 кДа или 30 кДа. Затем совокупности очищали посредством SEC с использованием колонки Superdex 200 26/60 для удаления агрегатов. Затем очищенный белок охарактеризовывали с помощью SDS-PAGE и SEC-MALLS (рассеяние лазерного излучения с кратными углами). Концентрацию определяли по поглощению при 280 нм с использованием теоретических коэффициентов поглощения, вычисляемых с учетом последовательности с помощью Vector NTI.

Пример 6: Связывание Ab против cKIT с субдоменами ECD cKIT

Для облегчения определения участков связывания Ab против cKIT ECD cKIT человека подразделяли на субдомены 1-3 (лиганд-связывающий домен) и субдомены 4-5 (домен димеризации). Для определения того, какие субдомены связывались, использовали "сэндвич"-формат анализа ELISA. 1 мкг/мл ECD, разбавленных в 1-кратном фосфатно-солевом буфере, соответствующими субдоменам 1-3 cKIT, субдоменам cKIT 4-5 или полноразмерному ECD cKIT, покрывали 96-луночные планшеты Immulon 4-HBX (Thermo Scientific кат. № 3855, Rockford, IL) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали три раза промывочным буфером (1-кратным фосфатно-солевым буфером (PBS) с 0,01% Tween-20 (Bio-Rad 101 - 0781)). Планшеты блокировали 280 мкл/лунку 3% бычьего сывороточного альбумина, разбавленного в 1-кратном PBS, в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза промывочным буфером. Антитела получали в концентрации

2 мкг/мл в промывочном буфере с 5-кратными разведениями для 8 точек и добавляли на планшеты для ELISA в объеме 100 мкл/лунку в трех параллелях. Планшеты инкубировали на орбитальном шейкере при 200 об./мин. в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты для анализа промывали три раза промывочным буфером. Вторичное антитело IgG козы против человека, специфичное к F(ab')₂-фрагменту, (H+L) (Jackson ImmunoResearch кат. № 109-036-088, West Grove, PA) получали в соотношении 1:10000 в промывочном буфере и добавляли на планшеты для ELISA в объеме 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали с вторичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре, встряхивая при 200 об./мин. на орбитальном шейкере. Планшеты для анализа промывали три раза промывочным буфером. Для получения сигнала ELISA в планшеты добавляли 100 мкл/лунку субстрата Sure blue® TMB (KPL кат. № 52-00-03, Gaithersburg, MD) и позволяли им инкубироваться в течение 10 мин при комнатной температуре. Для остановки реакции в каждую лунку добавляли 50 мкл 1 Н соляной кислоты. Поглощение измеряли при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Molecular Devices SpectraMax M5. Для определения связывающего ответа каждого антитела усредняли измерения оптической плотности, получали значения стандартного отклонения и строили графики с использованием Excel. Связывающие домены каждого отдельного антитела против cKIT приведены в таблице 5 ниже.

Пример 7: Измерения аффинности Ab против cKIT

Аффинность антител против видовых ортологов cKIT, а также против cKIT определяли с использованием технологии SPR с использованием устройства Biacore® 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и сенсорных чипов CM5.

В кратком изложении, HBS-P (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20), дополненный 2% блокирующим буфером Odyssey® (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE), использовали в качестве подвижного буфера во всех экспериментах. Уровень иммобилизации и взаимодействия аналитов измеряли в единицах ответа (RU). Осуществляли пробные эксперименты для тестирования и подтверждения выполнимости

иммобилизации антитела против Fc человека (кат. № BR100839, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и захвата тестируемых антител.

Для кинетических измерений осуществляли эксперименты, в которых антитела фиксировали на поверхности сенсорного чипа с помощью иммобилизованного антитела против Fc человека и определяли способность белков cKIT свободно связываться в растворе. В кратком изложении, 25 мкг/мл антитела против Fc человека при pH 5 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством присоединения через аминокгруппу при скорости потока 5 мкл/мин на всех двух проточных кюветах для достижения 10500 RU. Затем 0,1–1 г/мл тестируемых антител инъецировали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 1 минуты. Как правило, поддерживали фиксированные уровни антител ниже 200 RU. Затем, 3,125–50 нМ внеклеточных доменов (ECD) рецептора cKIT разбавляли в 2-кратной серии и инъецировали при скорости потока 40 мкл/мин в течение 3 мин в референсной и тестовой проточных кюветах. Таблица тестируемых ECD приведена ниже. Следовала диссоциация связывание в течение 10 мин. После каждого цикла инъекций поверхность чипа восстанавливали с использованием 3 M MgCl₂ при скорости потока 10 мкл/мин в течение 30 сек. Все эксперименты осуществляли при 25 °C и данные об ответах подвергали глобальной аппроксимации с простой моделью взаимодействия 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2® версии 2.0b (BioLogic Software) для получения показателей скорости прямой реакции (k_a), скорости обратной реакции (k_d) и аффинности (K_D).

Таблица 4

Изотип и источник ECD

Изотип ECD	Метка	Источник
Человек	C-концевая 6x His	NVS
Яванский макак	C-концевая 6x His	NVS
Мышь	C-концевая 6x His	Sino Biological Inc (кат. №: 50530-M08H)
Крыса	C-концевая mFc	NVS

В таблице 5 приведены связывание доменов и аффинность. Как

показано в таблице, все антитела 9p3, NEG024, NEG027, NEG085, NEG086, NEG087 и 20376 реагируют с cKIT человека на наномолярном уровне и имеют схожие аффинности с антителами, тестируемыми против ECD яванского макака. Однако только 20376 перекрестно реагировало с ECD мыши. Ни одно из тестируемых антител не реагировало перекрестно с cKIT крысы.

Таблица 5

Ab	Связывание доменов	Аффинность к cKIT человека (нМ)	Аффинность к cKIT яванского макака (нМ)	Аффинность к cKIT мыши (нМ)	Аффинность к cKIT крысы (нМ)
9P3	d1-3	20	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG024	d1-3	1,31	1,15	не реагирует	не реагирует
NEG026	d1-3	не определено	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG027	d1-3	1,34	не определено	не реагирует	не реагирует
NEG085	d1-3	8,4	6,14	не реагирует	не реагирует
NEG086	d1-3	1,44	1,34	не реагирует	не реагирует
NEG087	d1-3	1,13	1,39	не реагирует	не реагирует
20376	d1-3	9,1	4,8	2,5	не реагирует

Пример 8: Получение ADC

Получение конъюгатов DM1 одноэтапным способом

Отдельные антитела против cKIT подвергали диафильтрации в реакционный буфер (15 мМ фосфата калия, 2 мМ ЭДТА, pH 7,6)

посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF#1) перед началом реакции конъюгации. Затем, антитело против cKIT (приблизительно 5,0 мг/мл) смешивали с DM1 (5,6-кратный молярный избыток относительно количества антитела) и затем с SMCC (приблизительно 5,0-кратный избыток относительно количества антитела). Реакцию осуществляли при 20°C в 15 mM буфере фосфата калия (pH 7,6), содержащем 2 mM ЭДТА и 10% DMA, в течение приблизительно 16 часов. Реакцию гасили добавлением 1 M уксусной кислоты для доведения pH до 5,0. После доведения pH реакционную смесь фильтровали через многослойный (0,45/0,22 мкм) PVDF фильтр, очищали и подвергали диафильтрации в 20 mM сукцинатный буфер (pH 5,0), содержащий 8,22% сахарозу с использованием тангенциальной поточной фильтрации (TFF#2). Пример инструментальных параметров для тангенциальной поточной фильтрации приведен в таблице 6 ниже.

Таблица 6

Инструментальные параметры для тангенциальной поточной
фильтрации

Параметр TFF	TFF#1 заданное значение	TFF#2 заданное значение
Объемная концентрация (C _b - г/л)	20	20
TMP (унт/дюйм ²)	12-18	12-18
Скорость подачи (LMH)	324	324
Нагрузка мембраны (г/м ²)	80-150	80-150
Диаобъемы	10	14
Буфер для диафильтрации	15 mM фосфат калия, 2 mM EDTA, pH 7,6	20 mM сукцинат, 8,22% сахароза, pH 5,0
Температура (°C)	RT (20-25)	RT (20-25)

Конъюгаты, полученные описываемым выше способом, анализировали с помощью: УФ-спектроскопии для определения нагрузки цитотоксическим средством (соотношение майтанзиноида и

антитела, MAR); SEC-ВЭЖХ для определения мономеров конъюгата; и обращенно-фазовой ВЭЖХ или ВЭЖХ с экранированной гидрофобной фазой (Hiser) для определения процентной доли свободного майтанзиноида.

Получение конъюгатов DM1 способом *in situ*

Антитела против cKIT также можно конъюгировать способом *in situ* следующим образом. Антитела против cKIT конъюгировали с DM1 с использованием сульфосукцинимидил-4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилатного (сульфо-SMCC) линкера. Получали стоковые растворы DM1 и сульфо-SMCC гетеробифункционального линкера в DMA. Смешивали сульфо-SMCC и DM1-тиол для проведения реакции в течение 10 минут при 25°C в DMA, содержащем 40% об./об. водного 50 мМ сукцинатного буфера, 2 мМ ЭДТА, pH 5,0, при соотношении DM1 и линкера 1,3:1 молярного эквивалента и конечной концентрации DM1 1,95 мМ. Затем осуществляли реакцию антитела с аликвотой реакционной смеси для получения соотношения молярных эквивалентов SMCC и Ab приблизительно 6,5:1 в конечных условиях конъюгации 2,5 мг/мл Ab в 50 мМ EPPS, pH 8,0 и 10% DMA (об./об.). Через приблизительно 18 часов при 25°C реакционную смесь для конъюгации очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной 10 мМ сукцинатом, 250 мМ глицином, 0,5% сахарозой, 0,01 % Tween 20, pH 5,5.

Любой из способов применим в конъюгации антител. В таблице ниже приведен пример ADC против cKIT.

Таблица 7

Свойства DM1-конъюгированных антител

Ad	MAR	Мономер %	Выход %	Свободное лекарственное средство %
9P3	3,6	99		Не определено
NEG024	4	98	70	0,7
NEG026	4	98	71	1,2
NEG027	4	98	68	1,2

NEG085	3,5	99	88	0,7
NEG086	3,5	99	83	1,5
NEG087	3,6	99	90	1,1
20376	3,8	99	84	Не определено

Получение ADC с линкером SPDB

Антитела против cKIT, например, антитело 9P3 (8 мг/мл), модифицировали с использованием N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB, 5,0-, 5,5- и 4,9-кратный молярный избыток, соответственно) в течение 120 минут при 25°C в 50 мМ буфере фосфата калия (pH 7,5), содержащем 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, и 5% DMA. Модифицированное Ab без очистки затем конъюгировали с DM4 (1,7-кратный молярный избыток относительно несвязавшегося линкера) в конечной концентрации модифицированного антитела 4 мг/мл в 50 мМ буфере фосфата калия (pH 7,5), содержащем 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА и 5% DMA, в течение 18 часов при 25°C. Реакционную смесь для конъюгации очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной и элюированной 10 мМ сукцинатом, 250 мМ глицином, 0,5% сахарозой, 0,01% Tween 20, pH 5,5.

Получение ADC с линкером CX1-1

Антитела против cKIT, например, антитело 9P3 (5,0 мг/мл), смешивали с DM1 (7,15-кратный молярный избыток относительно количества антитела) и затем с CX1-1 (5,5-кратный избыток относительно количества антитела). Реакцию осуществляли при 25°C в 60 мМ буфере EPPS [4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновой кислоты] (pH 8,5), содержащем 2 мМ ЭДТА и 5% DMA, в течение приблизительно 16 часов. Затем реакционную смесь очищали с использованием колонки SEPHADEX™ G25, уравновешенной и элюированной в 10 мМ сукцинат, 250 мМ глицин, 0,5% сахарозу, 0,01 % Tween 20, pH 5,5.

Пример, в котором сравнивают эффективности *in vitro* антитела-MCC-DM1, антитела-SPDB-DM4 и антитела-CX1-1-DM1, представлен на фигуре 2.

Пример 9: Аффинность ADC относительно родительских антител

Аффинность антител против cKIT после конъюгации с SMCC-DM1 определяли с помощью технологии Biacore с использованием устройства Biacore® T100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) и сенсорных чипов CM5 с использованием методологии, схожей с описываемой в примере 7 выше.

Для оцениваемых антител получали схожие оценочные показатели аффинности для связывания с cKIT человека в случае SMCC-DM1-конъюгированных антител относительно родительских неконъюгированных антител, что позволяет предполагать, что конъюгация не влияет значительно на связывание антитела (таблица 8).

Таблица 8

Аффинности неконъюгированных и MCC-DM1-
конъюгированных антител

	ECD cKIT человека (нМ)	
	Неконъюгированное	MCC-DM1
NEG	1,3	11
NEG	4,2	5,2
NEG	1,4	1,8
20376	9,1	11,2

Пример 10: Активность 9P3-MCC-DM1, 9P3-SPDB-DM4 и 9P3-CX1-1-DM1 на панели клеточных линий

После конъюгации с MCC-DM1 линкером-полезной нагрузкой определяли способность лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию линий клеток AML, SCLC, GIST и меланомы. Линия клеток GIST-T1 любезно предоставлена Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan. Линии клеток GIST430 и GIST882 любезно предоставлены Dr. Jonathan Fletcher, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA.

В случае мелкоклеточного рака легких (SCLC) использовали клеточные линии NCI-H526 и NCI-H1048. NCI-H526 высоко экспрессирует cKIT, и ее получали из ATCC (CRL-5811, ATCC Manassas, VA). NCI-H1048 экспрессирует cKIT на более низком уровне, и ее также получали из ATCC (CRL-5853). CMK-11-5 является линией AML, экспрессирующей высокие уровни cKIT ((JCRB

кат. № IF050430, Japan), см. также Nagano et al., Int. J. Hematol. 1992; 56:67-78)). UKE-1 также является линией клеток AML и экспрессирует низкие количества cKIT. Клеточная линия UKE-1 любезно предоставлена Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany. Kasumi 1 получали из ATCC (CRL-2724). Kasumi-6 получали из ATCC (CRL-2775). MDA-MB-453 получали из ATCC (HTB-131). Линии NCI-H889 и NCI-H1930 приобретали в ATCC (CRL-5817 и CRL-5906, соответственно). Клетки Hel92.1.7 получали из Sigma-Aldrich (кат. № 92111706-1VL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Клетки M-07e и SKNO1 приобретали в DSMZ, ACC-104 и ACC-690, соответственно (DSMZ, Braunschweig, DE) Клеточную линию OCI-M1 также получали из DSMZ (ACC-529).

В кратком изложении, клетки культивировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C с 5% CO₂ в среде для культивирования по рекомендациям производителя. В день анализа клетки два раза промывали PBS (Cellgro, Corning, Tewksbury MA (кат. № 21-031-CV)) перед обработкой 0,1% трипсином-ЭДТА (внутренние технические службы) в течение 5 мин и ресуспендировали в рекомендуемой среде для культивирования. Затем клетки подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3603, Corning, Tewksbury, MA) при плотностях 2000-10000 клеток/лунку в 100 мкл среды для культивирования клеток. Получали дублирующий планшет для измерения в день 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. Также получали лунки только со средой в качестве отрицательных контролей. После этой инкубации 100 мкл/лунку реагента Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Madison, WI) добавляли в планшеты дня 0, которые затем осторожно встряхивали в течение 2 мин, инкубировали в течение 10 мин, и измеряли полученные интенсивности люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer Wallac Microbeta Trilux® (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые ADC серийно разводили до 3-кратного стокового раствора в соответствующей среде для культивирования клеток и

добавляли 50 мкл 3-кратно разведенных ADC (конечная анализируемая концентрация 0,0002–68 нМ эквивалентов DM1) перед инкубацией в инкубатор для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 дней. После этого периода инкубации определяли относительную жизнеспособность клеток посредством добавления реагента Celltiter Glo®, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% ингибирования = $(\text{ADC обработанные} - \text{необработанные}) / (\text{необработанные} - \text{день 0}) * 100$). Данные о % ингибирования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения GI₅₀.

Как показано на фигуре 1, ADC против cKIT тестировали в анализе пролиферации с использованием панели линий клеток GIST (GIST T-1, GIST882, GIST430), SCLC (NCI-H526, NCI-H1048) и AML (Kasumi-6, Kasumi-1). Значения IC₅₀ и максимального уничтожения приведены в таблице. MDA-MB453 (линия злокачественных клеток молочной железы) не экспрессирует cKIT. IgG-MCC-DM1 является изотипическим контролем. Как показано на фигуре 1, все ADC против cKIT наномолярные-субнаномолярные IC₅₀ в семи используемых линиях. Это свидетельствует о том, что ADC против cKIT имеют широкий спектр показаний к применению, и их можно использовать в любом случае, когда опухоль экспрессирует соответствующе уровни cKIT.

Также оценивали способность антитела против cKIT (9P3), конъюгированного через линкер-полезную нагрузку SPDB-DM4 и CX1-1-DM1, как показано на фигуре 2. Эти исследования, осуществленные, как описано выше, показали, что оцениваемые ADC против cKIT также являлись мощным ингибитором клеточной пролиферации при использовании SPDB-DM4 или CX1-1-DM1, что позволяет предполагать, что их способность успешно доставлять токсин для уничтожения клеток не ограничена MCC-DM1. На фигуре 1 и фигуре 2 представлены ADC против cKIT, являющиеся эффективными в наномолярном-субнаномолярном диапазоне.

Кроме того, фигура 3 представляет собой график GI₅₀ ADC

против cKIT относительно cKIT уровня рецептора и показаний (AML, GIST, меланома и SCLC). Как показано на фигуре 3, ADC против cKIT эффективны для всех представленных показаний.

Пример 11: Активность ADC cKIT-MCC-DM1 in vitro в отношении клеточных линий GIST, SCLC и AML

После конъюгации с MCC-DM1 линкером-полезной нагрузкой определяли способность лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию линий клеток AML, SCLC и GIST. Список клеток, используемых в этих экспериментах, по поставщику см. В примере 10 выше.

В кратком изложении, клетки культивировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в среде для культивирования по рекомендациям производителя. В день анализа клетки два раза промывали PBS (Cellgro, кат. № 21-031-CV, Corning Tewksbury, MA) перед обработкой 0,1% трипсином-ЭДТА (внутренние технические службы) в течение 5 мин и ресуспендировали в рекомендуемой среде для культивирования. Затем клетки подсчитывали и высевали в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3603, Corning, Tewksbury, MA) при плотности 5000 клеток/лунку для клеток AML и SCLC и 10000 клеток/лунку для клеток GIST в 100 мкл среды для культивирования клеток. Получали планшет для параллельного измерения в день 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. После этой инкубации в планшеты дня 0 добавляли 100 мкл/лунку реагента Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Promega, Madison, WI), затем осторожно встряхивали их в течение 2 мин, инкубировали в течение 10 мин, и измеряли полученную интенсивность люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer Wallac Microbeta® Trilux (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые ADC серийно разводили до 3-кратного стокового раствора в соответствующей среде для культивирования клеток и добавляли 50 мкл 3-кратно серийно разведенных ADC (конечная концентрация для анализа 0,0002-68 нМ эквивалентов DM1) перед инкубацией в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и

5% CO₂ в течение от 5 до 8 дней. После этого периода инкубации, определяли относительную жизнеспособность клеток с помощью добавления реагента Celltiter Glo®, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% максимального воздействия (A_{max}) = (необработанные – обработанные наибольшей концентрацией ADC) * 100).

Данные % ингибирования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения GI₅₀. Эти данные представлены на фигурах 4-9. Как показано на графиках, конъюгат IgG-MCC-DM1 используют в качестве контроля. Все из тестируемых ADC имеют более высокую активность, чем контрольное антитело. Как показано на кривых на фигурах 4-9, ADC против cKIT, например, антитела NEG085, NEG024 и 20376, являлись очень эффективными в снижении клеточной пролиферации и, таким образом, будут эффективными в лечении GIST, AML и SCLC.

Пример 12: Количественный анализ плотности поверхностного рецептора cKIT на клеточных линиях с помощью FACS (сортировки клеток с активацией флуоресценцией)

В качестве стандартов использовали частицы Quantum Simply Cellular Beads (Bangs Laboratories, Inc. кат. № 815, Fishers, IN). Емкость связывания антител частицами стандарта находится в диапазоне от 0 до приблизительно 310000. Частицы или пятьсот тысяч клеток центрифугировали и промывали два раза 100 мкл/образец буфера для FACS (PBS, 0,2% BSA, 0,1% NaAz). После каждого этапа промывки частицы или клетки центрифугировали и осторожно центрифугировали. После промывок добавляли буфер для FACS и в соответствующие лунки добавляли 10 мкг/мл APC-антитело мыши против CD117 человека (BD Pharmigen кат. №550412, BD Biosciences, San Jose, CA) или 10 мкг/мл изотипического контроля APC-IgG к мыши (BD Pharmigen кат. №554681) до конечного объема 100 мкл/образце.

Затем суспензии клетки-антитело инкубировали на льду в течение 1 часа. После инкубации клетки центрифугировали и два раза промывали 100 мкл буфера для FACS. После каждого этапа

промывки частицы или клетки центрифугировали и осторожно ресуспендировали.

Нежизнеспособные клетки удаляли ресуспендированием в 100 мкл/образец буфера для FACS, содержащего 7-AAD (BD Pharmigen кат. №559925). Образцы инкубировали на льду в течение 10 минут и анализировали с помощью BD FACS Canto II ® (BD Biosciences, San Jose, CA). Геометрическое среднее сигнала на образец определяли с использованием программного обеспечения Flow Jo® и плотности антигена определяли, как описано в руководстве Quantum Simply Cellular manual. Анализы чувствительности клеточной к ADC *in vitro* и плотности рецептора в клеточной линии осуществляли с помощью TIBCO Spotfire 4.0.

Эта плотность рецептора показана в виде Y-оси фигуры 3. Анализ плотности рецептора применим в этом аспекте в качестве исходного биомаркера для стратификации пациентов. Например, на фигуре 3 высокая плотность рецептора коррелирует с эффективностью GI50 ADC против cKIT, показанной в виде X-оси. Анализ плотности рецептора применим в клинических условиях для определения того, каким пациентам необходимо вводить терапевтическое средство ADC против cKIT.

Пример 13: Картирование эпитопов cKIT для антитела 9P3 с помощью масс-спектрометрии с дейтериевым обменом (HDx-MS)

При масс-спектрометрия с дейтериевым обменом (HDx-MS) измеряют захват дейтерия амидным остовом белка. Эти измерения чувствительны к доступности растворителя амида и изменениям сети водородных связей амидов остова. HDx-MS часто используют для сравнения белков в двух разных состояниях, таких как аro- и лиганд-связанное, и она сопряжена с быстрым расщеплением пепсином. В таких экспериментах можно локализовывать области, как правило от 10 до 15 аминокислот, демонстрирующие дифференциальный захват дейтерия для двух разных состояний. Защищенные напрямую участвуют в связывании лиганда или связывание антитела с лигандом влияет на них аллостерически.

В этих экспериментах захват дейтерия внеклеточным доменом cKIT (SEQ ID NO: 160, см. ниже) измеряли в отсутствие и присутствие терапевтического mAb, 9P3. Области в cKIT,

демонстрирующие снижение захвата дейтерия после связывания антитела, вероятно, включены в эпитоп; однако, благодаря природе измерения также можно детектировать изменения, удаленные относительно участка прямого связывания (аллостерические эффекты). Как правило, области, имеющие наибольшую степень защиты, участвуют в прямом связывании, хотя это не всегда может быть так. Для разграничений событий прямого связывания и аллостерических эффектов необходимы ортогональные измерения (например, рентгеноструктурная кристаллография, аланиновый мутагенез).

Таблица 9

Конструкция внеклеточного домена cKIT

SEQ ID NO: 160
ДЛИНА: 503 аминокислоты
TYPE: Protein
ОРГАНИЗМ: Человек
QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNNKQNEWITE KAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTN YSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVR PAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHG DFNYERQATLTISSARVNDSGVFCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFNIFPMINTTVFV NDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSESNIRYVSELHLTRLKGT EGGTYTFLVSNDSVNAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPG TEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFN FAFKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH

Эксперименты по картированию эпитопа cKIT осуществляют на платформе Waters Synapt® G2 HDx-MS, включающей роботизированную систему LEAP®, систему nanoACQUITY® UPLC и масс-спектрометр Synapt® G2. В этом способе контрольные эксперименты в трех параллелях осуществляют следующим образом. 300 пмоль (1,4 мг/мл) антигена cKIT разводят в 110 мкл 95% дейтерированном буфере PBS (pH 7,4) и инкубируют при комнатной температуре на настольном ротаторе в течение 25 минут (%D=85,5%). Дейтериевый обмен тушат разбавлением 1:1 холодным буфером для тушения (6 М мочевины и 1М ТСЕР, pH=2,5) на льду в течение 5 мин. После

тушения пробирку переносят на систему LEAP (термобокс устанавливают на 2°C) и подвергнутый тушению образец инъецируют с помощью системы LEAP в систему UPLC для анализа. Система UPLC включает колонку с иммобилизованным пепсином $2,1\text{ мм} \times 30\text{ мм}$ (Life Technologies 2-3131-00), поддерживаемую при 12°C . Для разделения используют 8-минутный градиент от 2 до 35% ацетонитрила и колонку Waters UPLC CSH C18 $1,0 \times 100\text{ мм}$. Затем, осуществляют эксперименты в трех параллелях с использованием антитела. 300 пмоль антитела 9P3 иммобилизуют на частицах агарозы с протеином G (Thermo Scientific кат. №22851) с использованием стандартных способов. В кратком изложении, антитело центрифугируют для удаления буфера для хранения. Затем 200 мкл буфера PBS ($\text{pH } 7,4$) и 300 пмоль cKIT добавляют к иммобилизованному Ab и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации комплекс центрифугируют и промывают 200 мкл буфера PBS и снова центрифугируют. Для дейтериевого обмена 200 мкл дейтерированного PBS добавляют к комплексу антиген-антитело для инкубации при комнатной температуре в течение 25 минут ($\%D=85,5\%$). Затем удаляют дейтериевый буфер и незамедлительно добавляют 125 мкл ледяной буфер для тушения. После тушения в течение 5 минут колонку центрифугируют и элюат переносят в заранее охлажденный сосуд для ВЭЖХ. Образец анализируют с использованием той же встроенной установки для расщепления пепсином/LC-MS, что и в контрольном эксперименте.

Результаты этих измерений представлены на фигуре 10 и фигуре 11. На фигуре 10 показаны скорректированные относительно фона различия между контролем и образцом, связавшимся с антителом 9P3, разделенные на стандартную ошибку измерения. На этом графике более отрицательное значение свидетельствует о более высокой степени защиты в указанной области после связывания антитела 9P3 с антигеном cKIT. После связывания 9P3 с cKIT авторы настоящего изобретения наблюдали наиболее значимые степени защиты в следующих двух областях cKIT: VFVRDPAKLFL ((область 1, 109-119 (SEQ ID NO: 161)) и

HCSVDQEGKSVLSE ((область 2, 185-198 (SEQ ID NO: 162))). Область 1 содержит остатки 109-119 и является частью доменов D1 и D2. Область 2 содержит остатки 185-198 и является частью домена D2. На фигуре 11 авторы настоящего изобретения картировали две наиболее защищенные области (см. фигуру 10) на кристаллической структуре внеклеточного домена cKIT (PDB ID 2e9w). Кроме того, авторы настоящего изобретения также метили участки связывания SCF на cKIT как участки I, II, и III с использованием значений, указанных в литературе (Yuzawa et al., Cell 2007; 130: 323-334). На фигуре 11 представлены два ключевых результата. Во-первых, области 1 и 2 расположены очень близко в кристаллической структуре, даже при том, что они находятся далеко друг от друга в пространстве первичной последовательности. Это наблюдение позволяет предполагать, что обе области потенциально могут являться частью эпитопа и, в таком случае, эпитоп для 9P3 является прерывистым. Во-вторых, области 1 и 2 удалены от участков связывания SCF, представленных в литературе. Это является важным наблюдением, т.к. позволяет предполагать, что антитело 9P3 не препятствует напрямую связыванию лиганда. Фактически, антитело может стерически препятствовать связыванию лиганда и/или димеризации рецептора после связывания лиганда. В отдельных конкурентных анализах с использованием ELISA и FACS авторы настоящего изобретения наблюдали частичное блокирование связывания SCF с cKIT с помощью 9P3, таким образом, вероятно, имеет место частичное стерическое препятствие. В заключение, данные HDx-MS свидетельствуют о том, что эпитоп для антитела 9P3 состоит из прерывистого эпитопа, удаленного от участков связывания SCF. Ожидают, что NEG024, NEG085, NEG086, NEG027 и NEG087 будут иметь тот же механизм действия.

Пример 14: Способность ADC против cKIT действовать в качестве агонистов оценивали с использованием клеточной линии Mo7e, экспрессирующей cKIT дикого типа, и клеточной линии GIST T-1, экспрессирующей мутантный cKIT

Для оценки потенциальных агонистических свойств ADC против

cKIT 2×10^6 клеток GIST T-1 (любезно предоставленных Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan) или Mo7e (DSMZ, ACC-104) подвергали сывороточному голоданию в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ (DMEM для GIST T-1 и RPMI для Mo7e, дополненная 0,1% FBS) в 6-луночном планшете (NUNC кат. № 14067). Клетки обрабатывали 10 нг/мл rh-SCF (R&D, кат. № 255-SC, R&D, Berkeley, CA), 5 мкг/мл NEG085-MCC-DM1, NEG024-MCC-DM1 и 20376-MCC-DM1 в течение 15 минут при 37°C. Одну лунку обозначали как необработанную (UT). Клетки собирали в 1 мл PBS. Клеточные осадки лизировали на льду в течение 60 мин в 30 мкл лизирующего буфера: 20 мМ Трис-HCl; pH 7,5, 137 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 15% глицерина, ингибиторы протеазы и фосфатазы. Затем лизаты центрифугировали в течение 40 мин при 12000 об./мин. при 4°C. 20 мкг каждого образца кипятили в течение 10 мин при 75°C и загружали на 12-луночный гель NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies, NP0322BOX, Carlsbad, CA). После переноса белка на мембраны для блоттинга, их блокировали в TBST-5% молоке при комнатной температуре в течение 1 часа и затем обрабатывали первичными антителами в течение ночи при 4°C. На следующий день блоты промывали в TBST (4×5 мин). Блоты инкубировали с вторичным антителом (HRP-конъюгированным антителом козы против кролика, 1:30000, Santa Cruz) в течение 1 часа при комнатной температуре. Блоты промывали в TBST (4×5 мин) и проявляли.

Первичными антителами, используемыми для вестерн-блоттинга, являлись α-cKIT, Tyr703 (Cell Signaling Technology кат. № 3073, Beverly, MA), α-cKIT Tyr721 (NOVUS, кат. № NBP1-51412, Novus, Littleton, CO), AKT Ser473 (Cell Signaling Technology кат. № 9271), AKT (Cell Signaling Technology кат. № 4691), ERK Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology кат. № 9101), ERK (Cell Signaling Technology кат. № 9102) и GAPDH (Cell Signaling Technology кат. №3683).

Как показано на фигуре 12, антитела cKIT против NEG085, NEG024 и 20376 могут опосредовать фосфорилирование cKIT в отсутствие лиганда (SCF). Однако, нижележащие пути передачи сигнала не подвергаются воздействию, т.к. сигнал не передается

на фосфо-ERK или фосфо-AKT.

Пример 15: Опосредованная Ab против cKIT интернализация поверхностного cKIT на клетках GIST-T1, измеряемая с помощью проточной цитометрии

Кинетику опосредованной антителом против cKIT интернализации оценивали с помощью обработки монослоя клеток антителом с использованием способа температурного сдвига и считывания данных проточной цитометрии. Клетки GIST-T1 (любезно предоставленные Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan) высевали при $2,5 \times 10^5$ клеток/лунку в пять обработанных 12-луночных планшетов для культивирования ткани (BD Falcon 353043). Клетки инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день удаляли среду и заменяли ее 450 мкл свежей среды. Антитела против cKIT NEG085, 20376 и изотипический контроль получали в 10-кратной концентрации 10 мкг/мл в соответствующей среде для культивирования клеток и добавляли 50 мкл тестируемого антитела против cKIT или изотипического контроля на лунку с конечной концентрацией 10 мкг/мл. Все клетки инкубировали в течение 1 часа на льду, затем два раза промывали 1 мл 1-кратного фосфатно-солевого буфера (PBS) и ресуспендировали в 500 мкл среды для культивирования клеток. Планшеты №2-5 переносили в 37°C и собирали в моменты времени 30 мин, 2 часа, 4 часа и 24 часа при 37°C и 5% CO₂. В планшет №1 добавляли 100 мкл буфера для диссоциации клеток (Gibco кат. №13150-016, Life Technologies, Carlsbad, CA) (контроль связывания при 4°C) и инкубировали при 37°C до открепления клеток. Клетки нейтрализовали 100 мкл среды и переносили в обработанный 96-луночный планшет для культивирования ткани с V-образным дном (Costar 3894). Клетки центрифугировали и два раза промывали буфером для FACS (1-кратный фосфатно-солевой буфер, 2% эмбриональная телячья сыворотка, 0,1% азид натрия). Получали вторичное Ab козы против IgG человека, конъюгированное с фикоэритрином (Invitrogen H10104, Life Technologies, Carlsbad, CA), в соотношении от 1 до 100 в буфере для FACS.

К клеткам добавляли вторичное антитело при 100 мкл/лунку и инкубировали с клетками на льду в течение 45 мин. В конце периода инкубации клетки центрифугировали и три раза промывали буфером для FACS. Клетки фиксировали 100 мкл/лунку 1% параформальдегида и хранили при 4°C в темноте. Повторяли этапы диссоциации клеток, инкубации с вторичным антителом и фиксации для клеток, инкубированных при 37°C, в различные моменты времени. На следующий день все образцы анализировали с использованием оборудования BD FACSCanto II® с использованием системы HTS (BD Biosciences, San Jose, CA). Образцы анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo для получения значений геометрического среднего флуоресценции для канала фикоэритрина. Фигура 13А представляет собой график % исходного связывания поверхности клеток относительно геометрического среднего-РЕ связывания при 4°C/геометрического среднего-РЕ момента времени при 37°C×100. Как показано на фигуре 13А, оба антитела NEG085 и 20376 связывались с cKIT на поверхности клеток и быстро интернализировались в клетку. Это свидетельствует о том, что описываемые ADC против cKIT будут быстро интернализироваться, таким образом, эффективно доставляя токсин в клетку.

В другом эксперименте по интернализации оценивали влияние NEG085 на уровни рецептора cKIT на клетки костного мозга человека. Нормальные CD34+ клетки костного мозга человека (All Cells, кат. №ABM022F, Emeryville, CA) размораживали и промывали 10 мл среды StemPro®-34 SFM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA). Клетки ресуспендировали в 1,25 мл среды StemPro-34 SFM при 4×10^5 клеток/мл и поровну разделяли по двум пробиркам. Одну пробирку не обрабатывали, а другую обрабатывали 10 мкг/мл NEG085, и обе инкубировали при 37°C, 5% CO₂. 100 мкл клеточной суспензии собирали в каждый момент времени (0, 15, 30, 60, 120, и 240 мин) из каждой пробирки и помещали в холодную пробирку для сбора для прекращения интернализации. Клетки промывали 3 мл ледяного буфера для окрашивания FBS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания FBS. В каждую

пробирку добавляли 5 мл 104D2-BV421 (антитела мыши против IgG1 к человеку, Biolegend, San Diego CA) и инкубировали на льду в течение 1 часа. После еще одной промывки буфером для окрашивания FBS измеряли общее количество рецепторов cKIT с помощью проточной цитометрии, оценивая среднюю интенсивность флуоресценции BV421 с помощью FACS Canto II® (BD Biosciences, San Jose, CA).

Как показано на фигуре 13B, cKIT быстро интернализуется после связывания NEG085, при этом основной объем интернализации происходит быстро (15 минут), а затем количество cKIT на поверхности продолжает неуклонно снижаться до конечной точки 4 часов.

Пример 16: Оценка способности NEG085-MCC-DM1 модулировать деградацию cKIT в клеточной линии, экспрессирующей cKIT дикого типа (NCI-H526), или клеточной линии, экспрессирующей мутантный cKIT (GIST-T1)

Накануне ночью 5×10^6 клеток GIST-T1 (любезно предоставленных Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan) или NCI-H526 (ATCC CRL-5811) высевали в среды для выращивания (DMEM, 10% FBS для GIST T-1 и RPMI, 10% FBS для NCI-H526) при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки обрабатывали 100 мМ циклогексимида (CHX) (кат. № 090M4009, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) в среде без метионина (GIBCO: DMEM, 21013-024; RPMI, A14517-01, Life Technologies, Carlsbad, CA). Клетки обрабатывали 5 мкг/мл ADC (NEG085-MCC-DM1), 10 нг/мл rh-SCF (R&D, 255-SC) или и ADC, и rh-SCF в течение 1, 4 или 6 часов при 37°C и 5% CO₂. Клетки собирали через 1 час, 4 часа и 6 часов после обработки в 1 мл PBS. Клеточные осадки лизировали на льду в течение 60 мин в 50 мкл лизирующего буфера (20 мМ Трис-HCl; pH7,5, 137 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 15% глицерина, ингибиторы протеазы и фосфатазы). Затем лизаты центрифугировали в течение 40 мин при 12000 об./мин. при 4°C. Пять мкг каждого образца кипятили в течение 10 мин при 75°C и загружали на 15-луночный гель NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (NP0323BOX Life Technologies, Carlsbad, CA). После переноса белка на мембраны для блоттинга, их блокировали в

TBST-5% молоке при комнатной температуре в течение 1 часа и затем обрабатывали антителом против cKIT (Cell Signaling Technology кат. № 3074, Beverly, MA) в течение ночи при 4°C. На следующий день блоты промывали в TBST (4×5 мин). Блот инкубировали с вторичным антителом (антитело козы против кролика, конъюгированное с HRP 1:30,000, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) в течение 1 часа при комнатной температуре. Блот промывали в TBST (4×5 мин) и проявляли. Первичными антителами, используемыми для вестерн-блоттинга, являлись антитело против cKIT (Cell Signaling Technology кат. № 3074) и GAPDH (Cell Signaling Technology кат. № 3683). На фигурах 14 А/В показана динамика деградации рецептора cKIT, опосредуемая NEG085-MCC-DM1. Деградация являлась быстрой, при этом ее уровни становились низкими/неопределяемыми через 6 часов. Необходимо отметить, что деградация рецептора cKIT происходила быстрее, чем у SCF, при наличии NEG085-MCC-DM1 в клетках GIST T1, экспрессирующих мутантный рецептор cKIT (панель 14А). Кроме того, NEG085-MCC-DM1 не блокирует связывание рецептора cKIT с SCF, т.к. добавление NEG085-MCC-DM1 и SCF обеспечивает более быструю деградацию, как показано на фигуре 14В. Если бы NEG085-MCC-DM1 являлся блокатором лиганда, то не наблюдали бы различий между NEG085-MCC-DM1 и NEG085-MCC-DM1 с SCF.

Пример 17: Неконъюгированное NEG085 и 20376 не ингибирует пролиферацию SCF-зависимой клеточной линии Mo7e.

Для оценки потенциальных антагонистических свойств неконъюгированных антител и способности лекарственных конъюгатов антител (ADC) ингибировать пролиферацию cKIT-экспрессирующей клеточной линии, Mo7e (DSMZ, кат. № ACC-104, Braunschweig, DE) выращивали в присутствии или отсутствии лиганда cKIT, фактора стволовых клеток (SCF), для выживания. Клетки Mo7e выращивали с 10 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека ГМ-КСФ (R&D Systems кат. № 215-GM, Minneapolis, MN) или 10 нг/мл фактора стволовых клеток человека SCF (R&D Systems кат. № 255-

SC) перед высеванием в 96-луночные планшеты (Costar кат. № 3904, Corning, Tewksbury, MA) при плотности 5000 клеток/лунку в 100 мкл среды для разведения. Получали планшет для параллели для измерения дня 0 и все планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. После этой инкубации добавляли дополнительные 50 мкл среды для разведения, а затем 90 мкл/лунку реагента Celltiter Glo® (Promega кат. № G7573, Madison, WI) в каждую лунку планшета, обозначенного как "день 0". Планшеты для анализа осторожно встряхивали в течение 20 мин и измеряли полученную интенсивность люминесценции с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Perkin Elmer 1450 Microbeta TriLux® (Perkin Elmer, Waltham, MA). Тестируемые неконъюгированные Ab и ADC получали в 3-кратной концентрации; 30 мкг/мл в соответствующей среде для культивирования клеток и 5-кратно серийно разводили с получением 8 точек. Также получали лунки только со средой, служащие в качестве отрицательных контролей. Добавляли 50 мкл 3-кратно серийно разведенных антител или ADC (конечная концентрация для анализа 0,0009–68 нМ) перед инкубацией в инкубаторе для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 дней. После этого периода инкубации определяли относительную жизнеспособность клеток посредством добавления реагента Celltiter Glo, как описано выше. Эффект ADC в отношении клеточной пролиферации вычисляли с использованием среднего для двух параллелей следующим образом: (% ингибирования = (обработанные ADC или Ab) / (необработанные) * 100). Данные % ингибирования аппроксимировали к 4-параметрическому логистическому уравнению и определяли значения IC₅₀.

Как показано на фигуре 15 и фигуре 16, неконъюгированные антитела против cKIT не ингибировали клеточную пролиферацию. Как показано на фигуре 15, NEG085-MCC-DM1 сравнивают с неконъюгированным NEG085, NEG024 и 20376. Как четко показано на графике, NEG085-MCC-DM1 ингибирует пролиферацию клеток Mo7e при низкой концентрации, в то время как неконъюгированные антитела не обладают этим эффектом. Контроль IgG-MCC-DM1 обладает

большим антипролиферативным эффектом, чем неконъюгированное NEG085, NEG024 или 20376.

Также на фигуре 16 показано, когда в эксперименте используют ГМ-КСФ, а не SCF, для устранения эффекта интернализации в отношении рецептора cKIT, которым обладает лиганд SCF. Результат, представленный на фигуре 16, соответствует тому, что, как показано на фигуре 15, неконъюгированное антитело NEG085 не оказывает отрицательного воздействия на клеточную пролиферацию, аналогично неконъюгированному контрольному IgG. В целом, результаты, представленные на фигурах 15 и 16, свидетельствуют о том, что снижение клеточной пролиферации является результатом конъюгации антител против cKIT с токсином.

Пример 18: Оценка активности ADCC in vitro

Способность неконъюгированных антител против cKIT (NEG085, 20376) опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность определяли в отношении клеток Uke-1 (клеток-мишеней; любезно предоставленных Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany) при совместной инкубации с клетками NK3.3 (клетками-киллерами или эффекторными клетками; любезно предоставленными Jacky Kornbluth из Saint Louis University). В кратком изложении, клетки Uke-1 окрашивали ацетоксиметиловым сложным эфиром кальцеина (кальцеин-AM; Sigma-Aldrich кат. № 17783-5MG, St. Louis, MO), два раза промывали, отбирали пипеткой в 96-луночный планшет для микротитрования (96-луночный, с U-образным дном, из прозрачного пластика; Corning Costar, кат. № 650 160, Tewksbury, MA) в концентрации 5000 клеток на лунку и преинкубировали в течение 10 мин с серийными разведениями указанных выше антител и белков (от 50,000 до 0,003 мкг на мл) перед добавлением эффекторных клеток NK3.3 на 1 час при соотношении эффектора с мишенью 20 к 1. Для вычисления антитело-специфического лизиса клеток-мишеней осуществляли параллельную инкубацию клеток-мишеней только без антитела или эффекторных клеток, служащих в качестве базового уровня и отрицательного контроля, в то время как положительный контроль или максимальный лизис или 100% специфического лизиса

определяли посредством лизиса клеток-мишеней только с 1% раствором Triton-X 100. В качестве дополнительного положительного контроля использовали MabCampath® (Sanofi, Paris, FR), распознающее CD52 на клетках Uke-1. После совместной инкубации мишени и эффекторных клеток планшет для микротитрования центрифугировали и переносили аликвоту супернатанта в другой планшет для микротитрования (96-луночный, плоскодонный, черный с прозрачным дном; (Corning Costar, кат. № 3904, Tewksbury, MA) и определяли концентрацию свободного кальцеина в растворе с использованием счетчика флуоресценции (счетчика множества меток Victor 3®, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Результаты представлены на фигуре 17. Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) является механизмом опосредованного клетками иммунитета, посредством которого эффекторная клетка лизует клетку-мишень, с которой связаны специфические антитела. В этом эксперименте MabCampath®, а также антитела против cKIT 20376 и NEG085 являются неконъюгированными антителами IgG1 человека. Как показано на фигуре 17, только антитело MabCampath опосредовало уничтожение клеток-мишеней посредством ADCC. 20376 и NEG085 являлись неспособными индуцировать ADCC даже в более высоких концентрациях. В связи с этим, любое уничтожение клеток, наблюдаемое при использовании ADC, например, NEG085-MCC-DM1, не является результатом механизма ADCC.

Пример 19: Способность NEG085 и 20376 вызывать апоптоз тучных клеток исследовали с использованием первичных тучных клеток человека.

Культивировали первичные тучные клетки человека из периферической крови человека способами, описываемыми в Saito et al., Nature Protocols 2006; 1 (4):2178-2183. Тучные клетки, находящиеся в жидкой культуре минимум в течение одной недели, инкубировали с увеличивающимися концентрациями (0,05-100 нМ) Ab против cKIT человека, NEG085 и 20376, или изотипическим контрольным IgG, в присутствии 1,6 нМ rhSCF (Genscript, кат. №

Z00400, Piscataway, NJ) в течение 48 часов при 37°C перед добавлением реагента Caspase-Glo® 3/7 (Promega, кат. № G8093, Madison, WI) для измерения апоптоза. После 30 мин инкубации при RT регистрировали люминесценцию с помощью спектрофотометра для чтения планшетов BioTek Synergy (BioTek, Winooski, VT).

Т.к. cKIT экспрессируется на тучных клетках, любые терапевтические антитела против cKIT не должны вызывать истощение тучных клеток. На фигуре 18 показан анализ апоптоза с использованием первичных тучных клеток человека после обработки Ab против cKIT человека или изотипическим контрольным Ab в присутствии 1,6 нМ rhSCF. Первичные тучные клетки человека инкубировали с увеличивающимися концентрациями антител против cKIT NEG085 и 20376 или изотипического контрольного IgG. Как показано на фигуре 18, неконъюгированные антитела NEG085 и 20376 не приводили к апоптозу первичных тучных клеток человека *ex vivo*.

Пример 20: Способность NEG085 и 20376 опосредовать дегрануляцию тучных клеток определяли с использованием первичных тучных клеток человека.

Культивировали первичные тучные клетки человека из периферической крови человека способами, описываемыми Saito et al., (выше). Тучные клетки, находящиеся в жидкой культуре минимум в течение одной недели, предварительно обрабатывали 5% Ag-специфичным IgE JW8 (партия для внутреннего пользования ACE 27283), 95% неспецифическим моноклональным IgE человека (Abbotec, кат. № 12030635, San Deigo, CA) и 10 нг/мл rhIL-4 (R&D Systems кат. № 204-IL, Minneapolis, MN) в течение 5 дней при 37°C. Затем клетки инкубировали с увеличивающимися концентрациями (0,05-100 нМ) изотипического контрольного IgG, Ab против cKIT человека, 20376 и NEG085, Ab против IgE, LE27, или антигена NIP(5)BSA в присутствии Fc-специфического Ab козы против IgG человека (H+L) (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-008-JIR, West Grove, PA) в течение 90 мин при 37°C. Затем клетки центрифугировали и переносили супернатанты в 96-луночные черные планшеты перед добавлением субстрата β-гексозаминидазы.

После 90 мин инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением трис-основания (Sigma, кат. № T1503-500G, pH 12, St. Louis, MO) и регистрировали интенсивность флуоресценции с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Envision®.

Как и в предыдущем эксперименте в примере 19, важно оценивать любое отрицательное воздействие антител против cKIT на тучные клетки. Если в предыдущем эксперименте исследовали апоптоз тучных клеток, то эти эксперименты направлены на дегрануляцию тучных клеток. Как показано на фигуре 19, положительные контроли NIP(5) и LE27 демонстрировали высокие уровни дегрануляции тучных клеток. В отличие от этого, антитела против cKIT NEG085 и 20376 не индуцировали дегрануляцию первичных тучных клеток человека *ex vivo*.

Пример 21: Точная модуляция фармакодинамического маркера *in vivo* с помощью ADC против cKIT

Проводили исследования для оценки способности ADC против cKIT NEG027-MCC-DM1 модулировать фармакодинамические маркеры *in vivo*, включающие анализ колоколизации антитела NEG027 с фармакодинамическим (PD) событием митотического блока в ксенотрансплантате опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Целью этих исследований являлась оценка степени и длительности ареста клеточного цикла G2/M.

Наличие ADC косвенно определяли с помощью детекции антитела IgG человека (представляющего собой NEG027 у мыши) в опухоли с использованием иммуногистохимического подхода. Аффинно очищенное антитело кролика против IgG человека (H+L) получали из Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 309-005-082, West Grove, PA). Антитело реагировало с целой молекулой IgG человека и легкими цепями других иммуноглобулинов человека с минимальной перекрестной реактивностью с белками сыворотки мыши. В кратком изложении, способ ИHC включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 32 минут при

комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315, Ventana, Tucson, AZ) в течение 32 минут.

Накопление рННЗ-положительных ядер, оцениваемое с помощью иммуногистохимии, использовали в качестве маркера ареста G2/M. Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим фосфопептидом, соответствующим остаткам, окружающим Ser10 гистона H3 человека (рННЗ), получали из Cell Signaling Technology (Danvers, MA, кат. № 9701). В кратком изложении, способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное антитело разбавляли до 1:50 и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 минут.

Для оценки индуцированных ADC против cKIT изменений PD маркера в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1 самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток в суспензии, содержащей 50% Matrigel™ (BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Мышам случайным образом предписывали введение однократной i.v. дозы NEG027-MCC-DM1 (2,5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2,5 мг/кг) или трис-забуференного физиологического раствора (TBS; 5 мл/кг) при достижении опухолью объема от 300 до 500 мм³ (n=3/группу). С помощью иммуноокрашивания на IgG человека определяли локализацию NEG027, и она коррелировала с областями большей плотности иммуноокрашивания рННЗ (типичные изображения представлены на фигуре 20), подтверждая колоколлизацию антитела с фармакодинамическим эффектом. В соответствии с ожидаемым механизмом действия полезной нагрузки майтанзиноида, NEG027-

MCC-DM1 вызывал значительное, зависящее от времени повышение процентной доли клеток, положительных по рННЗ, с пиками через 33 и 48 часов после введения дозы относительно неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 или обработанного PBS контроля с возвращением сигнала к базовому уровню приблизительно через неделю (типичные изображения представлены на фигуре 21, график представлен на фигуре 22). Также оценивали зависящие от времени изменения в расщепленной каспазе 3. В этих исследованиях поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминоконцевым остаткам, смежным с (Asp 175) в каспазе-3 человека, получали из EMD Millipore (кат. №PC679). Способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное антитело разбавляли до 20 мкг/мл и инкубировали в течение 32 минут при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 минут.

Аналогично рННЗ, также наблюдали зависящие от времени изменения в расщепленной каспазе 3 (типичные изображения представлены на фигуре 21, график представлен на фигуре 22). Эти данные свидетельствуют о том, что ADC против cKIT NEG027-MCC-DM1 способно вызывать сильные клеточные PD эффекты *in vivo*, соответствующие механизму действия полезной нагрузки майтанзиноида.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухоли GIST T1 представлена для визуализации профиля окрашивания в этой модели ксенотрансплантата (фигура 21). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической с-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскировки антигена Ventana Cell Conditioning #1. Первичное

антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем, осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 минут.

Пример 22: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) у мышей

Противоопухолевую активность ADC против cKIT оценивали на нескольких моделях ксенотрансплантатов опухолей. Дозозависимую противоопухолевую активность и фармакокинетику (PK) ADC против cKIT человека, перекрестно не реагирующего с cKIT мыши, NEG027-MCC-DM1 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл.

Мышей включали в исследование через 10 дней после имплантации при среднем объеме опухоли 207 мм³. После случайного включения в одну из пяти групп (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS, наполнителя для ADC (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2,5 мг/кг) или NEG027-MCC-DM1 (0,625, 1,25 или 2,5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю. Контроль IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 2,5 мг/кг. NEG027-MCC-DM1 в дозе 0,625 демонстрировал статистически значимую эффективность по сравнению с группой введения TBS, однако, дозы 1,25 и 2,5 мг/кг вызывали даже большую эффективность, индуцируя схожую остановку роста объема опухоли при измерениях штангенциркулем, хотя при гистологической оценке не выявляли наличие опухолевых клеток. Вместо смеси соединительной ткани, жировая ткань и сегменты периферических нервов и поперечнополосатых мышц являлись основными тканевыми компонентами на этих срезах. Это подтверждает гистологическое

регрессирование опухоли (фигуры 23-26).

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1 час, 24 часа и 4, 7, 11 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM, соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряли общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляли детекцию с HRP-конъюгированным антителом против IgG человека перед считыванием на соответствующем спектрофотометре для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1, с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с помощью HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. PK пропорциональна дозе с приблизительным временем полужизни в сыворотке семь дней (фигуры 23-24).

Т.к. однократная доза NEG027-MCC-DM1 0,625 мг/кг вызывала лишь задержку роста опухоли GIST T1, таким образом, предоставляя динамический диапазон для оценки различающихся активностей ADC, этот уровень дозы выбирали для оценки эффективности набора близкородственных ADC, также полученных из исходного ADC 9P3-MCC-DM1 мыши. Самкам мыши SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки в суспензии, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 10 дней после имплантации при среднем объеме опухоли 195 мм³. После случайного распределения по группам (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (8 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG085-MCC-DM1 (0,625мг/кг), NEG086-MCC-DM1 (0,625мг/кг), NEG087-MCC-DM1

(0,625мг/кг), NEG024-MCC-DM1 (0,625мг/кг) или NEG026-MCC-DM1 (0,625мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 27-29). Контрольное IgG1-MCC-DM1, даже в высокой дозе 10 мг/кг, являлось неактивным. ADC против cKIT, вводимые в дозе 0,625 мг/кг, статистически не отличались друг от друга. В группах, которым вводили NEG085-MCC-DM1 и NEG024-MCC-DM1, наблюдали наименьшие объемы опухолей в самом узком диапазоне.

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1 час, 24 часа и 3, 7, 10, 14 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM, соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряют общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляли детекцию с HRP-конъюгированным антителом против IgG человека перед считыванием на соответствующем спектрофотометре для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1, с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с помощью HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. Эти ADC демонстрировали схожие уровни воздействия на сыворотку (фигура 30).

Пример 23: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении мелкоклеточного рака легких у мышей

Противоопухолевую активность набора ADC оценивали в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H1048 с умеренным иммуноокрашиванием на cKIT, при котором наблюдали большую гетерогенность по сравнению с ксенотрансплантатами опухоли GIST T1 (фигура 21-фигура 30). NEG085-MCC-DM1 сравнивали с набором ADC против cKIT, являющихся сильными антагонистами передачи сигнала cKIT, ни один из которых не связывается с cKIT мыши. Самкам мышей SCID-beige подкожно

имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование 15 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 120 мм^3 . Всем исследуемым группам вводили однократную внутривенную дозу 2 мг/кг. После случайного распределения по группам ($n=8/\text{группу}$) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (2 мг/кг), NEG024-MCC-DM1, NEG085-MCC-DM1 и NEG086-MCC-DM1. Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 31, 32). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. NEG085-MCC-DM1 имел тенденцию в сторону эффективности при низком $\Delta T/\Delta C$ 9%, но статистически не отличался от наполнителя в этой дозе 2 мг/кг. NEG024-MCC-DM1 и NEG026-MCC-DM1 являлись значимо эффективными.

Противоопухолевую эффективность ADC против cKIT также оценивали на модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H1048, оценивали дозозависимую противоопухолевую активность NEG085-MCC-DM1. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 11 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно $150\text{--}200 \text{ мм}^3$. После случайного распределения по группам ($n=8/\text{группу}$) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (2,5, 5 и 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 33, 34). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным, как и доза 2,5 мг/кг NEG085-MCC-DM1. Однако, дозы 5 и 10 мг/кг являлись значимо эффективными.

Противоопухолевую активность двух ADC против cKIT оценивали во второй модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких с более высокими уровнями cKIT, аналогичными ксенотрансплантатам опухоли GIST T1 (типичные фотографии

представлены на фигуре 21, и графики представлены на фигуре 35). Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 6×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей включали в исследование через 6 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 150 мм^3 . После случайного распределения по группам ($n=9/\text{группу}$) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (8 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG024-MCC-DM1 (2, 5, 5 и 10 мг/кг) и перекрестно реагирующего с c-Kit мыши ADC 20376-MCC-DM1 (10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 35 и фигура 36). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. 20376-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг исходно приводил к регрессированию опухоли, однако после исходного регрессирования наблюдали рецидив опухоли. Наблюдали значительную дозозависимую эффективность трех доз NEG024-MCC-DM1 с непрерывным длительным регрессированием при дозе 10 мг/кг, при этом опухоли начинали повторно расти через 60 дней, что позволяет предполагать, что в случае 20376-MCC-DM1 может потребоваться больше однократной дозы, вводимой в этом исследовании. Воздействие на сыворотку дозы 10 мг/кг 20376-MCC-DM1 и NEG024-MCC-DM1 являлось приблизительно эквивалентным.

Пример 24: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении острого миелогенного лейкоза у мышей

Дозозависимую противоопухолевую активность ADC против cKIT мышиного 9P3-MCC-DM1 и 9P3-SPDB-DM4 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли острого миелогенного лейкоза Kasumi-1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самкам мышей SCID-beige подкожно в правый бок трансплантировали 2-3 фрагмента фрагментированных тканей опухоли Kasumi-1 размером 1 мм^3 с Matrigel™ (BD Biosciences). Мышей с опухолями Kasumi-1 включали в исследование через 21 день после имплантации со средним объемом опухоли 150 мм^3 . После случайного распределения в одну из восьми групп ($n=8/\text{группу}$) мышам вводили однократную

i.v. дозу PBS (200 мкл), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (10 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) и 9P3-SPDB-DM4 (1 или 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли три раза в неделю (фигура 37). Контрольный IgG1-SPDB-DM4 не являлся значимо активным в дозе 10 мг/кг. Наблюдали регрессирование роста опухоли при использовании 9P3-SPDB-DM4 в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг.

Таблица 10

Эффективность Kasumi-1

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли	Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (ΔТ/ΔС) (%)	Процентная доля потери массы тела (%)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
PBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	6,36	8/8
IgG-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	98	3,06	8/8
9P3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	11	-0,62	8/8
9P3-SPDB-DM4	1 мг/кг	однократная i.v. доза	65	-0,05	8/8
9P3-SPDB-DM4	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-83	-1,72	8/8

Пример 25: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении мастоцитоза у мышей

Противоопухолевую активность ADC против cKIT мышинового 9P3-

MCC-DM1 и 9P3-SPDB-DM4 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли HMC-1.2, экспрессирующей мутантный cKIT. Клеточная линия HMC-1.2 любезно предоставлена Dr. Joseph Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, MN. Самкам бестимусных мышей Foxn-1 подкожно имплантировали 3, 5 и 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в средах DMEM без FBS. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 100 мкл.

Мышей, несущих опухоли HMC-1.2, включали в это исследование через 33 дня после имплантации со средним объемом опухоли 100 мм³. После случайного распределения в одну из трех групп (n=4/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу PBS (200 мкл), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли три раза в неделю (фигура 38). Регрессирование опухоли наблюдали для 9P3-SPDB-DM4 и 9P3-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг.

Таблица 11

Исследование HMC-1

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли	Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ($\Delta T/\Delta C$) (%)	Процентная доля потери массы тела (%)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
PBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	13,49	4/4
9P3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	6	7,71	4/4

9P3-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-40	3,25	4/4

Пример 26: Эффективность *in vivo* перекрестно реагирующего с cKIT мыши ADC против cKIT 20376-MCC-DM1

Дозозависимую противоопухолевую активность и фармакокинетику (PK) ADC против cKIT человека, перекрестно реагирующего с cKIT мыши, 20376-MCC-DM1 оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 10 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 200 мм³. После случайного распределения в одну из пяти групп (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), NEG085-MCC-DM1 (0,625 мг/кг) или 20376-MCC-DM1 (0,625, 2,5, 5 или 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигуры 39-41). Контрольный IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 10 мг/кг. 20376-MCC-DM1 также являлся неэффективным, в то время как NEG085-MCC-DM1 в дозе 0,625 демонстрировал низкую эффективность, хотя также статистически не значимую. 20376-MCC-DM1 в дозах 2,5, 5 и 10 мг/кг являлся значимо эффективным.

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1 час, 24 часа и 4, 7, 11 и 21 день после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM, соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряют общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывали антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляли детекцию с использованием HRP-конъюгированного антитела против IgG человека перед считыванием с помощью соответствующего спектрофотометра для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с 1

молекулой DM1 с помощью колориметрического ELISA. В этом формате планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с использованием HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. При использовании ADC 20376-MCC-DM1, перекрестно реагирующего с cKIT мыши, PK не являлась пропорциональной дозе по причине того, что связывание ADC с cKIT мыши в нормальных тканях влияло на воздействие (опосредуемое тканями распределение лекарственного средства), и, таким образом, наблюдают четкое различие концентраций 20376-MCC-DM1 и ADC NEG085-MCC-DM1, не реагирующего перекрестно с cKIT мыши, в сыворотке (фигура 40). Этим объясняют различие в эффективности между двумя ADC в низкой дозе 0,625 мг/кг. При более высоких дозах тканей эффект опосредуемого тканями распределения лекарственного средства является менее выраженным, и становится очевидной эффективность в модели ксенотрансплантата опухоли GIST T1 у мышей.

Пример 28: Эффективность ADC против cKIT с линкером/полезной нагрузкой SPDB-DM4 in vivo в отношении гастроинтестинальных стромальных опухолей

Дозозависимую противоопухолевую активность ADC 9P3 мыши (из которого получали NEG024 и NEG085) с MCC-DM1 (нерасщепляемым) и SPDB-DM4 (расщепляемым) линкерами/полезными нагрузками сравнивали в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 18 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 170 мм³. После случайного распределения по группам (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неконъюгированного антитела мыши 9P3 (10 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (10 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (5 и 10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (2,5 и 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигуры 42, 43). Ни контрольные неспецифические ADC IgG1, ни неконъюгированное 9P3 не являлись эффективными. Все ADC 9P3

являлись эффективными при тестируемых уровнях доз; однако в группе, которой вводили 2,5 мг/кг 9P3-SPDB-DM4, они являлись немного менее эффективными, чем в других группах.

Дозозависимую противоопухолевую активность ADC 9P3 мыши (из которых получали NEG024 и NEG085) с MCC-DM1 (нерасщепляемым) и SPDB-DM4 (расщепляемым) линкерами/полезными нагрузками сравнивали во второй модели ксенотрансплантата гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST430, экспрессирующей мутантный cKIT. Самок мышей SCID-beige включали в исследование через 11 дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 200 мм³. После случайного распределения по группам (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу TBS (5 мл/кг), неконъюгированного антитела мыши 9P3 (10 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-SPDB-DM4 (5 мг/кг), 9P3-MCC-DM1 (10 мг/кг) или 9P3-SPDB-DM4 (5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигуры 44, 45). Ни один из контрольных неспецифических IgG1 ADC не являлся эффективным. Однако, оба ADC 9P3 являлись схоже эффективными при тестируемых уровнях доз.

Пример 29: Состав

Лекарственной формой для клинического исследования (CSF) ADC является лиофилизатом в сосуде, содержащем 50 мг MCC-DM1 против cKIT, 16,2 мг сукцината натрия, 410,8 мг сахарозы и 1 мг полисорбат 20 (без учета перенаполнения 10% для обеспечения исключения указанного содержимого). После восстановления лиофилизата с помощью 5 мл воды для инъекций получают раствор, содержащий 10 мг/мл MCC-DM1 против cKIT, 20 mM сукцинат натрия, 240 mM сахарозу и 0,02% полисорбата 20 при pH 5,0.

Для последующего внутривенного введения полученный раствор, как правило, будут дополнительно разбавлять раствором носителя для получения готового к использованию раствора ADC для инфузий.

В случае CSF выбирали концентрацию ADC 10 мг/мл с учетом предварительного тестирования стабильности. Выбирали

концентрацию сахарозы 240 мМ для получения изотонического состава, для поддержания аморфной структуры уплотненного осадка лиофилизата и для обеспечения стабилизации белка.

Важные аналитические способы определения стабильности для выбора наиболее стабильного состава включали, помимо прочего, эксклюзионную хроматографию для определения уровней агрегации, тестирование невидимых невооруженным взглядом частиц вещества, определение свободного токсина и тестирование активности.

Предварительное исследование показало, что полисорбат 20 в концентрации 0,02% обеспечивает достаточную стабилизацию против механического напряжения. Исследования стабильности жидкой и лиофилизированной форм в условиях реального времени и условиях ускоренного исследования стабильности (25°C и 40°C) показали, что состав с сукцинатом, pH 5,0, обеспечивает лучшую общую стабильность при хранении. Особенно важным в этом составе то, что можно достигать лучшего баланса среди всех тестируемых составов между агрегацией и высвобождением свободного токсина. Через три месяца при 40°C не определяли значимого повышения продуктов деградации.

Пример 30: Точная модуляция фармакодинамического маркера in vivo с помощью ADC против cKIT

Осуществляли исследования для оценки способности ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 модулировать фармакодинамические маркеры *in vivo*, включающие исследование колокализации антитела NEG085 с фармакодинамическим (PD) событием митотического блока в ксенотрансплантате опухоли GIST T1, экспрессирующей мутантный cKIT. Целью этих исследований являлась оценка степени и длительности ареста клеточного цикла G2/M.

Накопление фосфо-гистон H3 (pHH3)-положительных ядер, оцениваемое с помощью иммуногистохимии, использовали в качестве маркера ареста G2/M. Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим фосфопептидом, соответствующим остаткам, окружающим Ser10 гистона H3 человека (pHH3) получали из Cell Signaling Technology (Danvers, MA, кат. № 9701). В кратком изложении,

способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли 1:50 и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с биотинилированным вторичным антителом козы против кролика Jackson ImmunoResearch Laboratories (кат. № 111-065-144, West Grove, PA) в течение 32 минут.

Для оценки индуцируемых ADC против cKIT изменений PD маркера в модели подкожного ксенотрансплантата опухоли GIST T1, самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток в суспензии, содержащей 50% Matrigel™ (BD Biosciences) в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл. Мышей случайным образом распределяли для введения однократной i.v. дозы NEG085-MCC-DM1 (5 мг/кг), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или трис-буфера (10 mM Трис-HCl, 80 mM NaCl, 3,5% сахарозы, 0,01% Tween 20, pH 7,5) при достижении опухолями объема от 200 до 300 мм³ (n=3/группу).

В соответствии с ожидаемым механизмом действия полезной нагрузки майтанзиноида NEG085-MCC-DM1 приводил к значительному, зависящему от времени повышению процентной доли клеток, положительных по pHN3, и, таким образом, аресту клеточного цикла. Позитивность по pHN3 достигала пика через 1-2 дня после введения дозы относительно неспецифического изотипического IgG1-MCC-DM1 или обработанного Трис-буфером контроля с падением сигнала через четыре дня после обработки (типичные изображения представлены на фигуре 46, и график представлен на фигуре 47).

Пример 31: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) у мышей

Противоопухолевую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на двух моделях ксенотрансплантатов опухолей GIST. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в

сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухолях GIST T1 и GIST430 представлены для визуализации профиля окрашивания в этих моделях ксенотрансплантатов (фигура 48А и 49А, соответственно). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической С-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 минут.

Для исследования эффективности с использованием GIST T1 мышей включали в исследование через 18 дней после имплантации со средним объемом опухоли ~118-234 мм³. После случайного распределения в одну из пяти групп (n=9/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу Трис-буфера (наполнитель для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (1,25, 2,5 или 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 48В и фигура 48С). Контрольный IgG1-MCC-DM1 не являлся значимо активным в дозе 5 мг/кг. Мышам, которым вводили NEG085-MCC-DM1 в дозах 1,25, 2,5 и 5 мг/кг, имели опухоли, демонстрирующие процент среднего изменения объема опухоли по сравнению с контролем, которому вводили Трис-буфер, (ΔТ/ΔС) 63, 11 и 12%, соответственно, и совокупность этих данных представлена в таблице 12. Введение NEG085-MCC-DM1 являлось хорошо переносимым на всех уровнях доз.

Таблица 12

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши в день 38

Лекарственное средство	Доза	Схема	"Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ($\Delta T/\Delta C$) (%)	Среднее изменение объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$)	Среднее изменение массы тела ($\% \pm \text{SEM}$)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	1132 $\pm$ 331	4,8 $\pm$ 2,3	9/9
IgG-SMCC-DM1 изотипический контроль	5 мг/кг	однократная i.v. доза	75	849 $\pm$ 281	5,5 $\pm$ 1,6	9/9
NEG085-MCC-DM1	1,25 мг/кг	однократная i.v. доза	63	712 $\pm$ 225	2,1 $\pm$ 2,2	9/9
NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	11	128 $\pm$ 85	-0,7 $\pm$ 1,0	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	12	140 $\pm$ 63	1,6 $\pm$ 1,2	9/9

Для исследования эффективности с использованием GIST 430 мышей включали в исследование через 12 дней после имплантации со средним объемом опухоли 125-200 мм³. После случайного распределения по группам (n=8/группу) мышам вводили однократную i.v. дозу Трис-буфера (наполнителя для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (10 мг/кг), неконъюгированного антитела NEG085 или NEG085-MCC-DM1 (2,5, 5 или 10 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 49В и фигура 49С). Контрольный IgG1-MCC-DM1 и неконъюгированное NEG085 являлись неактивными в дозе 10 мг/кг. NEG085-MCC-DM1 в дозе 2,5 и 5 мг/кг не являлось значимо активным ($\Delta T/\Delta C$ 78% и 56%, соответственно), как и сравниваемый иматиниб ($\Delta T/\Delta C$ 47%), исходно вводимый в дозе 100 мг/кг, со снижением дозы до 80 мг/кг по причине плохой переносимости на уровне дозы 100 мг/кг у мышей SCID-beige. Доза 10 мг/кг являлась значимо эффективной ($\Delta T/\Delta C$ 19%), как графически изображено на фигуре 49В и представлено в таблице 13. Введение NEG085-MCC-DM1 являлось хорошо переносимым на всех уровнях доз.

Таблица 13

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST430 мыши в день 28

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем ($\Delta T/\Delta C$) (%)	Среднее изменение объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$)	Среднее изменение массы тела ($\% \pm \text{SEM}$)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель контроль	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	864 $\pm$ 103	-0,3 $\pm$ 1,3	8/8
IgG-MCC-DM1 изотипический контроль	10 мг/кг	однократная i.v. доза	124	1070 $\pm$ 98	1,9 $\pm$ 0,8	8/8
Неконъюгированное NEG085	10 мг/кг	однократная i.v. доза	88	760 $\pm$ 119	3,9 $\pm$ 1,7	8/8
NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	78	674 $\pm$ 83	4,8 $\pm$ 0,6	8/8
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	56	485 $\pm$ 70	5,5 $\pm$ 1,8	8/8
NEG085-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	19	167 $\pm$ 42	1,5 $\pm$ 1,8	8/8

Иматиниб	100 мг/кг	Twice daily PO	47	408±65	1,5±0,7	6/8

Пример 32: Эффективность ADC против cKIT *in vivo* в отношении мелкоклеточного рака легких у мышей

Противоопухолевую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких NCI-H526. Самкам мышей SCID-beige подкожно имплантировали 10×10^6 клеток, содержащих 50% Matrigel™ (BD Biosciences), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Типичная фотография иммуноокрашивания по cKIT на опухоли NCI-H526 представлена для визуализации профиля окрашивания в этой модели ксенотрансплантата (фигура 50A). Поликлональное антитело кролика, продуцируемое иммунизированными животными, с синтетическим пептидом, соответствующим аминокислотам 963-976 в цитоплазматической С-концевой части cKIT, получали из Dako (кат. № A4502). В кратком изложении, способ ИНС включал нагревание и подвергание стандартному воздействию реагента для демаскирования антигена Ventana Cell Conditioning #1 (Ventana, Tucson, AZ). Первичное антитело разбавляли до рабочей концентрации 14 мкг/мл и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем осуществляли инкубацию с предварительно разбавленным HRP-конъюгированным антителом против кролика Ventana UltraMap (кат. № 760-4315) в течение 16 минут.

Мышей включали в исследование через шесть дней после имплантации со средним объемом опухоли приблизительно 180 мм^3 . После случайного распределения по группам ($n=9/\text{группу}$) мышам вводили однократную *i.v.* дозу Трис-буфера (наполнителя для ADC), неспецифического изотипического контроля IgG1-MCC-DM1 (5 мг/кг) или NEG085-MCC-DM1 (1,25, 2,5 и 5 мг/кг). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 50B и фигура 50C). Контрольный IgG1-MCC-DM1 являлся неактивным. NEG085-MCC-DM1 в дозе 1,25 мг/кг исходно индуцировал прекращение роста объема опухоли с последующим повторным ростом опухоли. Введение 2,5 и 5 мг/кг являлось значимо эффективным, вызывая регрессирование опухоли (регрессирование 74% и 96,

соответственно), и это показано на фигуре 50В и представлено в таблице 14. При введении этих доз наблюдали повторный рост опухолей приблизительно через 3 недели после введения однократной дозы. Все введения NEG085-MCC-DM1 являлись хорошо переносимыми.

Таблица 14

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 мыши в день 28

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (Т/С) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ±SEM)	Среднее изменение массы тела (%±SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	–	1165±159	4,9±0,9	9/9
IgG1-MCC-DM1 изотипический контроль	5 мг/кг	однократная i.v. доза	109	–	1274±282	6,4±1,3	9/9
NEG085-MCC-DM1	1,25 мг/кг	однократная i.v. доза	8	–	99±57	-0,2±0,8	8/9 1 мышь с большой опухолью исключали из исследования в день 16"

NEG085-MCC-DM1	2,5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-73,96	-139±25	-1,6±1,1	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-95,76	-174±10	3,8±1,5	9/9

В этом исследовании также собирали сыворотку через 1 час, 24 часа и 5, 1, 9, 14, 21 и 28 дней после введения дозы для измерения концентрации антитела/ADC с течением времени с использованием ELISA с антителом против IgG1 человека и ELISA с антителом против DM, соответственно. Для оценки параметров PK сыворотку собирали с помощью ретроорбитального забора крови и анализировали с помощью ELISA. При анализе общей PK антитела измеряли общую концентрацию антитела с/без DM1 с помощью колориметрического ELISA. Планшеты покрывают антителом против IgG человека (Fc-специфичным) и осуществляют детекцию с использованием HRP-конъюгированного антитела против IgG человека перед считыванием с помощью соответствующего спектрофотометра для считывания планшетов. При анализе PK конъюгата измеряют антитело, связавшееся по меньшей мере с одной (1) молекулой DM1 с помощью колориметрического ELISA. В этом формате, планшеты покрывают антителом против майтанзина и определяют его с помощью HRP-конъюгированного антитела против IgG человека. В этом исследовании с использованием дозозависимая эффективность NEG085-MCC-DM1 коррелировала с дозозависимым воздействием общего антитела и ADC на сыворотку, измеряемым с помощью ELISA с антителом против общего антитела и антителом против майтанзина (фигура 51A и фигура 51B, соответственно).

Пример 33: Эффективность ADC против cKIT in vivo в отношении острого миелогенного лейкоза у мышей

Противоопухолевую активность ADC против cKIT NEG085-MCC-DM1 оценивали на модели системного первичного ксенотрансплантата AML (острого миелогенного лейкоза) HAMLX5343, разработанной в Novartis. Самкам мышей NSG системно имплантировали (с помощью инъекции в хвостовую вену) 5×10^6 клеток в фосфатно-солевом буфере. Общий объем инъекции, содержащей клетки, составлял 200 мкл.

Мышей включали в исследование через 43 дней после имплантации со средней лейкоэмической нагрузкой приблизительно 14,8% CD45-положительных мононуклеарных клеток периферической

крови (PBMC). После случайного распределения по группам (n=6/группу) мышей оставляли без введения или вводили им ARA-C (цитарабин) интраперитонеально ежедневно в течение 6 дней или NEG085-MCC-DM1 (10 мг/кг) внутривенно один раз каждые две недели. Лейкемическую нагрузку измеряли с помощью проточной цитометрии. Еженедельно у всех исследуемых животных собирали кровь через хвостовую вену. Лизировали эритроциты и оставшиеся PMBC окрашивали с использованием антитела против hCD45 (eBioscience, San Diego CA, кат. № P/N 17-9459-42). Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра FACS Canto (BD Biosciences) (фигура 52A). Массу тела измеряли два раза в неделю (фигура 52B). ARA-C, хоть и эффективный у трех животных, являлся высокотоксичным, вызывая потерю массы тела >20% у других трех животных. Введение NEG085-MCC-DM1 в дозе 10 мг/кг приводило к замедлению прогрессирования опухоли, включая краткое регрессирование после второй дозы (фигура 52A). Введение NEG085-MCC-DM1 являлось значимо эффективным по сравнению с необработанным контролем, как показано на фигуре 52 и в таблице 15. Введение NEG085-MCC-DM1 хорошо переносилось (фигура 52B).

Таблица 15

NEG085-MCC-DM1 в модели системного первичного ксенотрансплантата AML HAMLX5343 в день 71

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (Т/С) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (% CD45-положительных PBMC±SEM)	Среднее изменение массы тела (со дня 67, %±SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Необработанный	0 мг/кг	N/A	100	–	77,3±1,7	1,7±1,8	6/6
ARA-C (цитарабин)	50 мг/кг	Ежедневно в течение 6 дней, интраперитонеально	–	–52.5%	–6,6±2,1	2,3±2,3	3/6 (3 мыши не переносили введение, и их исключали из исследования после 6 дней введения)

NEG085-MCC-DM1	10 мг/кг	Каждые 2 недели, внутривенно	48,3	-	37,4±5,4	1,8±1,6	6/6

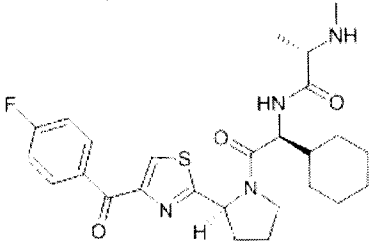
Пример 34. NEG085-MCC-DM1 в комбинированном лечении

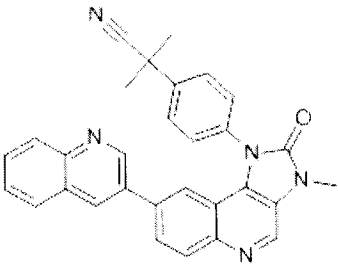
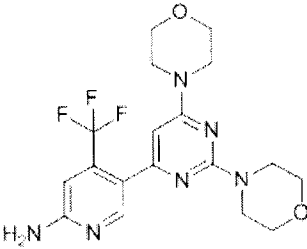
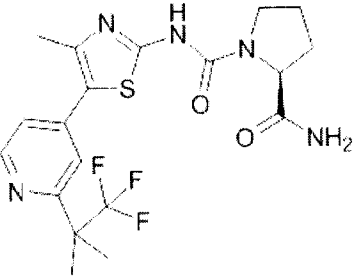
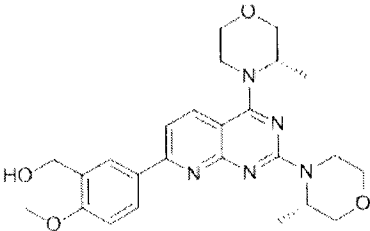
NEG085-MCC-DM1 тестировали в комбинации с низкомолекулярными ингибиторами с использованием различных доз-матриц. Вычисляли относительное ингибирование жизнеспособности клетки для каждой комбинации доз. Используя программное обеспечение Chalice (Zaliscus, Cambridge MA) или приложение ComboExplorer (Novartis, Basel CH), сравнивали ответ на комбинацию с отдельными средствами с учетом широко используемой модели Loewe для аддитивности дозы лекарственного средства по отношению к самому себе (Lehar et al. Nat. Biotechnol. (2009) 27: 659-666; Zimmermann et al., Drug Discov. Today (2007) 12: 34-42). Избыточное ингибирование по сравнению с аддитивностью можно построить в виде полной схемы доза-матрица для визуализации концентраций лекарственного средства, когда имеет место синергия. Синергичные комбинации приводят к появлению областей избыточного ингибирования в дозе-матрице. В таблице 16 представлены данные для нескольких NEG085-MCC-DM1/комбинаций. "Аддитивность" наблюдали, когда комбинация приводила к тому же ингибиторному ответу в отношении жизнеспособности клеток при сравнении с ответом при использовании отдельного средства. Указывали "синергию", когда ингибирование жизнеспособности клеток являлось большим, чем ответ отдельного средства, сравниваемого с ним самим. Альтернативно, "аддитивность" указывали при величине по шкале Loewe менее 5 и "синергию" указывали при величине по шкале Loewe более 5.

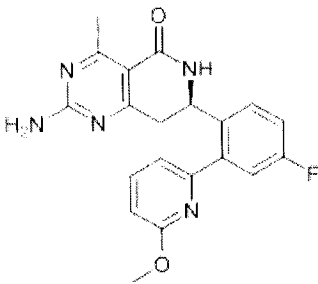
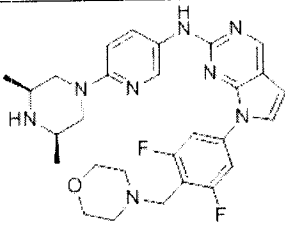
Жизнеспособность клеток определяли, измеряя содержание АТФ в клетках с использованием люминесцентного анализа CellTiter Glo (Promega, Madison, WI). За один день до добавления лекарственного средства 250-500 клеток GIST из 2 разных клеточных линий помещали в 384-луночные планшеты (Greiner, Monroe, NC) в 20 мкл среды для выращивания. Клетки GIST430 содержат двойную мутацию в cKIT, делающую их частично резистентными к Glivec® (Imatinib). Клетки GIST882 имеют одиночную мутацию в cKIT и являются чувствительными к Glivec® (Imatinib). Затем клетки инкубировали в течение 120 часов с различными концентрациями EG085-MCC-DM1 в качестве отдельного

средства, соединениями отдельного средства или комбинациями NEG085-MCC-DM1/соединение перед добавлением реагента CellTiter Glo в каждую лунку и регистрацией люминесценции с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Envision (Perkin Elmer, Waltham MA). Значения люминесценции использовали для вычисления ингибирования жизнеспособности клеток относительно обработанных DMSO клеток (0% ингибирования).

Таблица 16

Мишени соединений	NEG085-MCC-DM1 в комбинации с:	Структура	Линия клеток GIST430	Линия клеток GIST882
RTK <i>i</i>	Glivec®	Иматиниб	Синергия	Аддитивность
RTK <i>i</i>	Sutent®	Сунитиниб	Аддитивность	Аддитивность
IAP <i>i</i>	NVP-LCL161		Синергия	Синергия

семейство PI3K	NVP-BEZ235		Аддитивность	Синергия
все PI3Ki	NVP-BKM120		Аддитивность	Синергия
PI3K	NVP-BYL719		Синергия	Синергия
mTORi (cat.)	NVP-CCG168		Аддитивность	Аддитивность
mTORi (allo.)	Afinitor®	Эверолимус	Синергия	Синергия

				
HSP90 α	NVP-HSP990		Аддитивность	Аддитивность
				
JAK2	NVP-BVB808		Аддитивность	Аддитивность

В заключение, антитела против cKIT, представленные в настоящем описании, имеют синергическое действие при использовании в комбинации с другими молекулами, что приводит к большему количеству вариантов лечения. Например, NEG085-MCC-DM1 можно вводить совместно с ингибитором IAP (например, NVP-LCL161) в качестве терапии для достижения синергического действия.

Пример 35. Картирование эпитопов NEG985

Ограниченный протеолиз *in situ*

Получали белок домена 1 (D1)-домена 3 (D3) внеклеточного домена (ECD) cKIT человека (регистрационный номер NM_000222) с остатками Q26-G331 (N130S, N145S - эти изменения приводят к недостаточности гликозилирования для экспрессии белка в негликозилированной форме). Смешивали ECD D1-D3 cKIT человека и Fab NEG08S в равных молярных отношениях и подвергали этапу конечной гель-фильтрации, уравновешенной 20 mM Трис-HCl, pH 7,5 и 100 mM NaCl, и концентрировали до 20 мг/мл. Трипсин добавляли к образцу для кристаллизации белкового комплекса для получения разведения 1:100 масс./масс. Смесь протеаза/образец инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут перед началом эксперимента по кристаллизации.

Кристаллизация

Дифрагирующие кристаллы комплекса ECD cKIT//Fab NEG085 получали непосредственно из Protein Complex Suite F5 (0,1M NaCl, 0,1M Трис, pH 8,0, 8% PEG 20k; Qiagen) при 4°C и после незначительной оптимизации своими силами получали кристаллы, дифрагирующие до 5 Å. Кристаллы, используемые для сбора данных, выращивали при 4°C, уравнивая равные объемы белка (20 мг/мл) и резервуарного раствора (0,1M NaCl, 0,1M Трис, pH 8,0, 10% PEG 20k) способом диффузии паров в сидячей капле. Перед сбором данных кристаллы подвергали криопротекции в резервуарном растворе, содержащем 30% глицерин, и мгновенно охлаждали в жидком азоте.

Сбор данных

Данные собирали с помощью отдельного кристалла, до 100K с использованием детектора ADSC QUANTUM 315 detector (ADSC, Poway CA) и синхротронного излучения ($\lambda=1,0000$ Å) с каналом пучка 5.0.2 Advanced Light Source. Кристаллы ECD cKIT/Fab NEG085 дифрагировали до разрешения 3,1 Å и принадлежали к группе симметрии C2 с параметрами базисной клетки $a=213,76$ Å, $b=117,48$ Å, $c=171,92$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=118,47^\circ$, $\gamma=90^\circ$. Кристалл содержит четыре копии комплекса ECD cKIT/Fab NEG085 в асимметричной клетке с вычисленным содержанием растворителя of 66%. Данные обрабатывали с использованием autoPROC (Global Phasing Ltd, Cambridge UK).

Определение и уточнение структуры

Структуру комплекса ECD cKIT/Fab NEG085 разрешали при разрешении 3,1 Å посредством молекулярного замещения с помощью PHASER (McCoy et al., J. Appl. Crystallogr. 2007; 40(4): 658–74) с использованием опубликованной кристаллической структуры ECD cKIT (номер PDB ID: 2EC8) (Yuzawa et al., Cell 2007; 130 (2):323–34) и Fab против $\alpha 1\beta 1$ интегрин I (номер PDB ID: 1MHP) (Karpusas et al., J. Mol. Biol. 2003; 327 (5):1031–41) в качестве исходных моделей. Петли CDR Fab-фрагмента NEG085 реконструировали вручную в COOT (Emsley and Cowtan, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2004; 60 (12): 2126–32) с использованием составной карты исключения имитации отжига,

реализуемой в Phenix (Adams et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2010; 66(2): 213-21). Последующие раунды построения и уточнения с помощью программы Phenix.refine осуществляли до конвергенции.

Результаты: Структуры D1-D2 cKIT человека в комплексе с Fab-фрагментом NEG085

Совместная структура D1-D3 cKIT/Fab NEG085 демонстрирует, что NEG085 распознает и связывается с внеклеточным мембранным дистальным доменом cKIT посредством специфического взаимодействия с большим количеством остатков, содержащихся в доменах 1, 2 и линкерными остатками между ними. Таким образом, эпитоп cKIT, распознаваемый NEG085, можно определять как:

Остатки домена 1 cKIT: R49, V50

Остатки домена 2 cKIT: Q152, G153, H185 и петля Q190-E198

Линкер между доменом 1 и 2: D113-L117

NEG085 связывается с D1-D2 cKIT с использованием всех CDR (H1-H3 и L1-L3) (фигура 53). Фигура 53 является представлением 3,1-Å кристаллической структуры комплекса D1-D2 cKit/Fab NEG085, на котором показаны тяжелые цепи Fab (показаны темно-серым), легкие цепи Fab (показаны белым) и домены D1-D2 cKit (показаны светло-серым). Эпитопы и паратопы показаны черным. Поверхность NEG085/cKIT погружает всего ~ 1890 Å² доступной для растворителя области поверхности (1211 Å² и 679 Å² из H-цепи и L-цепи, соответственно). Эпитоп центрирован в области линкера D1-D2 cKIT D113-L117 (SEQ ID NO: 163) и петли Q190-E198 (SEQ ID NO: 164), эти остатки выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием в таблице 2, SEQ ID NO: 155. Необходимо отметить, что эти эпитопы являются прерывистыми в первичной последовательности, но расположены очень близко друг к другу в кристаллической структуры. Эти эпитопные взаимодействия дополнены периферическими взаимодействиями с R49, V50, Q152, G153 и H185 (фигура 53). Межмолекулярные взаимодействия между D1-D2 cKIT и Fab NEG085 исследовали с использованием PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel and Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372(3):774-97). Эти данные представлены в таблице 17.

Наложение cKIT в комплексе димерного cKIT/передачи сигнала SCF (Yuzawa et al. Cell 2007; 130 (2);323-34) и комплекса cKIT/NEG085 демонстрирует, что NEG085 и SCF, вероятно, не конкурируют друг с другом за связывание с cKIT. NEG085 связывается с эпитопом, отличающимся от связывающих эпитопов, ответственных за связывание с SCF. Таким образом, связывание NEG085 с cKIT не будет напрямую конкурировать с ассоциацией с SCF.

Таблица 17

L-цепь NEG085		Kit D1-D2		Расстояние (Å)
Водородные связи и солевые мостики				
Ser31	OG	Arg49	NH2	3,6
Tyr32	OH	Gln190	NE2	2,5
Arg53	NH2	Asp113	OD1	3,2
Gly91	O	Lys193	NZ	2,9
Arg92	NH1	Glu191	OE2	3,0
Arg92	NH1	Glu191	OE1	3,1
Arg92	O	Lys193	NZ	3,1
Leu94	N	Lys193	NZ	3,5
Trp95		Lys193		Cation-pi
ван-дер-ваальсовы взаимодействия				
Tyr50		Pro114		
Tyr53		Val50, Pro114		
Arg93		Lys193		
H-цепь NEG085		Kit D1-D2		Расстояние (Å)
Водородные связи и солевые мостики				
Tyr33	OH	Ser194	N	3,1
Tyr33	OH	Ser194	O	2,4
Asn52	ND2	Ser194	OG	3,2
Tyr59	OH	Gly192	O	3,2
Tyr59	OH	Ser194	N	3,1
Tyr101	OH	Glu198	OE2	2,6
Gly103	O	Leu117	N	3,4

Gly103	N	Leu196	O	3,0
Thr105	N	Pro114	O	2,9
Trp107	NE1	Gln190	OE1	3,1
Trp107	NE1	Lys193		Cation-pi
ван-дер-ваальсовы взаимодействия				
Tyr53		Leu196		
Pro54		Gln152, Gly153		
Ser57		Ser194		
Tyr59		Lys193		
Tyr102		His185, Leu196, Ser197, Lys199		
Thr104		Pro114		
Thr105		Pro114, Gln190		
Tyr106		Pro114, Ala115		
Trp107		Ser194, Val195		

Остатки VH и VL Fab NEG085 нумеруют в зависимости от линейной аминокислотной последовательности. Остатки cKIT нумеруют на основе регистрационного номера NM_000222. Межмолекулярные взаимодействия исследовали с использованием PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel and Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372(3):774-97).

Следует понимать, что примеры и аспекты, представленные в настоящем описании, предназначены исключительно для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения с их учетом будут очевидны специалистам в этой области и предназначены для включения в сущность и область настоящей заявки и объем формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ABRAMS, TINYA
COHEN, STEVEN BRUCE
FANTON, CHRISTIE
HUBER, THOMAS
MILLER, KATHY
SCHLEYER, SIEW
TISSOT-DAGUETTE, KATRIN ULRIKE
FINNER, CATRIN

<120> ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ

<130> PAT055643-US-PSP

<140> 61/793,641

<141> 2013-03-15

<160> 164

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5084

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

gatcccatcg cagctaccgc gatgagaggc gctcgcggcg cctgggattt tctctgcgtt	60
ctgctcctac tgcttcgcgt ccagacaggc tcttctcaac catctgtgag tccaggggaa	120
ccgtctccac catccatcca tccaggaaaa tcagacttaa tagtccgcgt gggcgacgag	180
attaggctgt tatgcactga tccgggcttt gtcaaattga cttttgagat cctggatgaa	240
acgaatgaga ataagcagaa tgaatggatc acggaaaagg cagaagccac caacaccggc	300
aaatacacgt gcaccaacaa acacggctta agcaattcca tttatgtgtt tgttagagat	360
cctgccaagc ttttccttgt tgaccgctcc ttgtatggga aagaagacaa cgacacgctg	420
gtccgctgtc ctctcacaga ccagaaagtg accaattatt ccctcaaggg gtgccagggg	480
aagcctcttc ccaaggactt gaggtttatt cctgacccca aggcgggcat catgatcaaa	540
agtgtgaaac gcgcctacca tcggctctgt ctgcattggt ctgtggacca ggagggcaag	600
tcagtgtgtg cggaaaaatt catcctgaaa gtgaggccag ctttcaaagc tgtgcctgtt	660
gtgtctgtgt ccaaagcaag ctatcttctt aggaagggg aagaattcac agtgacgtgc	720
acaataaaaag atgtgtctag ttctgtgtac tcaacgtgga aaagagaaaa cagtcagact	780
aaactacagg agaaatataa tagctggcat cacggtgact tcaattatga acgtcaggca	840
acgttgacta tcagttcagc gagagttaat gattctggag tgttcatgtg ttatgccaat	900
aatacttttg gatcagcaaa tgtcacaaca accttggaag tagtagataa aggattcatt	960
aatatcttcc ccatgataaa cactacagta tttgtaaacg atggagaaaa tgtagatttg	1020
attgttgaat atgaagcatt ccccaaacct gaacaccagc agtggatcta tatgaacaga	1080

accttcactg ataaatggga agattatccc aagtctgaga atgaaagtaa tatcagatac	1140
gtaagtgaac ttcattctaac gagattaaaa ggcaccgaag gaggcactta cacattccta	1200
gtgtccaatt ctgacgtcaa tgctgccata gcattttaatg tttatgtgaa taaaaacca	1260
gaaatcctga cttacgacag gctcgtgaat ggcattgctcc aatgtgtggc agcaggattc	1320
ccagagccca caatagattg gtatTTTTgt ccaggaactg agcagagatg ctctgcttct	1380
gtactgccag tggatgtgca gacactaaac tcatctgggc caccgtttgg aaagctagt	1440
gttcagagtt ctatagattc tagtgcattc aagcacaatg gcacggttga atgtaaggct	1500
tacaacgatg tgggcaagac ttctgcctat tttactttg catttaaagg taacaacaaa	1560
gagcaaatcc atccccacac cctgttcact ctttctgctga ttggtttcgt aatcgtagct	1620
ggcatgatgt gcattattgt gatgattctg acctacaaat atttacagaa acccatgtat	1680
gaagtacagt ggaaggttgt tgaggagata aatggaaaca attatgttta catagacca	1740
acacaacttc cttatgatca caaatgggag tttccagaa acaggctgag ttttgggaaa	1800
accctgggtg ctggagcttt cggaagggtt gttgaggcaa ctgcttatgg cttaattaag	1860
tcagatgcgg ccatgactgt cgctgtaaag atgctcaagc cgagtgccca tttgacagaa	1920
cggaagccc tcatgtctga actcaaagtc ctgagttacc ttggtaatca catgaatatt	1980
gtgaatctac ttggagcctg caccattgga gggccaccc ttggtcattac agaattattg	2040
tgctatggtg atcttttgaa ttttttgaga agaaaacgtg attcatttat ttgttcaaag	2100
caggaagatc atgcagaagc tgcactttat aagaatcttc tgcattcaaa ggagtcttcc	2160
tgacgcgata gtactaatga gtacatggac atgaaacctg gagtttctta tgttgtccca	2220
accaaggccg acaaaaggag atctgtgaga ataggctcat acatagaaag agatgtgact	2280
cccgccatca tggaggatga cgagttggcc ctgacttag aagacttgct gagcttttct	2340
taccaggtgg caaagggcat ggctttcttc gcctccaaga attgtattca cagagacttg	2400
gcagccagaa atatctctct tactcatggt cggatcaca agatttgtga ttttgggtcta	2460
gccagagaca tcaagaatga ttctaattat gtggttaaag gaaacgctcg actacctgtg	2520
aagtggatgg cacctgaaag ctttttcaac tgtgtatata cgtttgaaag tgacgtctgg	2580
tcctatggga tttttctttg ggagctgttc tctttaggaa gcagccccta tcctggaatg	2640
ccggtcgatt ctaagttcta caagatgatc aaggaaggct tccggatgct cagccctgaa	2700
cacgcacctg ctgaaatgta tgacataatg aagacttgct gggatgcaga tcccctaaaa	2760
agaccaacat tcaagcaaat tgttcagcta attgagaagc agatttcaga gagcaccaat	2820
catatttact ccaacttagc aaactgcagc cccaaccgac agaagcccgt ggtagaccat	2880
tctgtgcgga tcaattctgt cggcagcacc gcttcctctt ccagcctct gcttgtgcac	2940
gacgatgtct gagcagaatc agtgtttggg tcaccctcc aggaatgatc tcttcttttg	3000

gcttccatga	tgggtattttt	cttttctttc	aacttgcato	caactccagg	atagtgggca	3060
ccccactgca	atcctgtctt	tctgagcaca	ctttagtggc	cgatgatttt	tgtcatcagc	3120
caccatccta	ttgcaaaggt	tccaactgta	tatatccca	atagcaacgt	agcttctacc	3180
atgaacagaa	aacattctga	tttgaaaaa	gagagggagg	tatggactgg	gggccagagt	3240
cctttccaag	gcttctccaa	ttctgcccc	aaatatgggt	gatagtttac	ctgaataaat	3300
ggtagtaatc	acagttggcc	ttcagaacca	tccatagtag	tatgatgata	caagattaga	3360
agctgaaaac	ctaagtcctt	tatgtggaaa	acagaacatc	attagaacaa	aggacagagt	3420
atgaacacct	gggcttaaga	aatctagtat	ttcatgctgg	gaatgagaca	taggccatga	3480
aaaaaatgat	ccccagtggt	gaacaaaaga	tgctcttctg	tggaccactg	catgagcttt	3540
tatactaccg	acctggtttt	taaatagagt	ttgctattag	agcattgaat	tggagagaag	3600
gcctccctag	ccagcacttg	tatatacgca	tctataaatt	gtccgtgttc	atacatttga	3660
ggggaaaaca	ccataagggt	tcgtttctgt	atacaaccct	ggcattatgt	ccactgtgta	3720
tagaagtaga	ttaagagcca	tataagtttg	aaggaaacag	ttaataccat	tttttaagga	3780
aacaatataa	ccacaaagca	cagtttgaac	aaaatctcct	cttttagctg	atgaacttat	3840
tctgtagatt	ctgtggaaca	agcctatcag	cttcagaatg	gcattgtact	caatggattt	3900
gatgctgttt	gacaaagtta	ctgattcact	gcatggctcc	cacaggagtg	ggaaaacact	3960
gccatcttag	tttggttctt	tatgtagcag	gaaataaagt	ataggtttag	cctccttcgc	4020
aggcatgtcc	tggacaccgg	gccagtatct	atatatgtgt	atgtacgttt	gtatgtgtgt	4080
agacaaatat	ttggaggggt	atttttgccc	tgagtccaag	agggtccttt	agtacctgaa	4140
aagtaacttg	gctttcatta	ttagtactgc	tcttgtttct	tttcacatag	ctgtctagag	4200
tagcttacca	gaagcttcca	tagtggtgca	gaggaagtgg	aaggcatcag	tccctatgta	4260
tttgcagttc	acctgcactt	aaggcactct	gttatctaga	ctcatcttac	tgtacctgtt	4320
ccttagacct	tccataatgc	tactgtctca	ctgaaacatt	taaattttac	ccttttagact	4380
gtagcctgga	tattattctt	gtagtttacc	tctttaaaaa	caaaacaaaa	caaaacaaaa	4440
aactcccctt	cctcactgcc	caatataaaa	ggcaaagtgt	tacatggcag	agtttgtgtg	4500
ttgtcttgaa	agattcaggt	atgttgccct	tatggtttcc	cccttctaca	tttcttagac	4560
tacattttaga	gaactgtggc	cgttatctgg	aagtaaccat	ttgcactgga	gttctatgct	4620
ctcgcacctt	tccaaagtta	acagattttg	gggttggtgt	gtcacccaag	agattgttgt	4680
ttgccatact	ttgtctgaaa	aattcctttg	tgtttctatt	gacttcaatg	atagtaagaa	4740
aagtggttgt	tagttataga	tgtctaggta	cttcaggggc	acttcattga	gagttttgtc	4800
ttgccatact	ttgtctgaaa	aattcctttg	tgtttctatt	gacttcaatg	atagtaagaa	4860
aagtggttgt	tagttataga	tgtctaggta	cttcaggggc	acttcattga	gagttttgtc	4920

aatgtctttt gaatattccc aagcccatga gtccttgaaa atatttttta tatatacagt	4980
aactttatgt gtaaatacat aagcggcgta agtttaaagg atgttggtgt tccacgtgtt	5040
ttattcctgt atgttggtcca attgttgaca gttctgaaga attc	5084

<210> 2
 <211> 976
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Arg Gly Ala Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Cys Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly
 20 25 30

Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val
 35 40 45

Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val
 50 55 60

Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn
 65 70 75 80

Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr
 85 90 95

Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg
 100 105 110

Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu
 115 120 125

Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu
 145 150 155 160

Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly Ile Met Ile Lys Ser Val Lys
 165 170 175

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

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

Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg
210 215 220

Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser
225 230 235 240

Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln
245 250 255

Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln
260 265 270

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe
275 280 285

Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr
290 295 300

Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn
305 310 315 320

Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu
325 330 335

Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn
340 345 350

Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu
355 360 365

Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly
370 375 380

Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn
385 390 395 400

Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu
405 410 415

Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly
420 425 430

Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln
435 440 445

Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser
450 455 460

Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser
465 470 475 480

Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp
485 490 495

Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn
500 505 510

Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly
515 520 525

Phe Val Ile Val Ala Gly Met Met Cys Ile Ile Val Met Ile Leu Thr
530 535 540

Tyr Lys Tyr Leu Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val
545 550 555 560

Glu Glu Ile Asn Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu
565 570 575

Pro Tyr Asp His Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly
580 585 590

Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala
595 600 605

Tyr Gly Leu Ile Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met
610 615 620

Leu Lys Pro Ser Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu
625 630 635 640

Leu Lys Val Leu Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu
645 650 655

Leu Gly Ala Cys Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr
660 665 670

Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser
675 680 685

Phe Ile Cys Ser Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys
690 695 700

Asn Leu Leu His Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu
705 710 715 720

Tyr	Met	Asp	Met	Lys	Pro	Gly	Val	Ser	Tyr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Ala	
				725					730					735		
Asp	Lys	Arg	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Arg	Asp	Val	
			740					745					750			
Thr	Pro	Ala	Ile	Met	Glu	Asp	Asp	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp	
		755					760					765				
Leu	Leu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Gln	Val	Ala	Lys	Gly	Met	Ala	Phe	Leu	Ala	
	770					775					780					
Ser	Lys	Asn	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Leu	
785					790					795					800	
Thr	His	Gly	Arg	Ile	Thr	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	
				805					810						815	
Ile	Lys	Asn	Asp	Ser	Asn	Tyr	Val	Val	Lys	Gly	Asn	Ala	Arg	Leu	Pro	
			820					825						830		
Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Phe	Asn	Cys	Val	Tyr	Thr	Phe	
		835					840					845				
Glu	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Phe	Leu	Trp	Glu	Leu	Phe	Ser	
	850					855					860					
Leu	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Met	Pro	Val	Asp	Ser	Lys	Phe	Tyr	
865					870					875					880	
Lys	Met	Ile	Lys	Glu	Gly	Phe	Arg	Met	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Ala	Pro	
				885					890						895	
Ala	Glu	Met	Tyr	Asp	Ile	Met	Lys	Thr	Cys	Trp	Asp	Ala	Asp	Pro	Leu	
			900					905					910			
Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Ile	Val	Gln	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ile	
		915					920					925				
Ser	Glu	Ser	Thr	Asn	His	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Asn	Cys	Ser	Pro	
	930					935					940					
Asn	Arg	Gln	Lys	Pro	Val	Val	Asp	His	Ser	Val	Arg	Ile	Asn	Ser	Val	
945					950					955					960	
Gly	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Leu	Leu	Val	His	Asp	Asp	Val	
				965					970					975		

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 3
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 4
Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 5
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 7

Asn Tyr Asp Gly Ser Ser
1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 8

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 9

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

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

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

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 10

<211> 105

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 10

Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
1				5					10					15	

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

Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
		35					40					45			

Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
50						55					60				

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

Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				85					90					95	

Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
			100					105

<210> 11

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 11

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		

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

Ala	Asn	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 12
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 13
 Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 14

Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser

1

5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 15

Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1

5

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 16

Tyr Thr Ser

1

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 17

Gly Lys Lys Leu Trp

1

5

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 18

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
85 90 95

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

<210> 19

<211> 330

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 20

<211> 213
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 20

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 Ser 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 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 213
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 22
 Asp Tyr Tyr Met Ala
 1 5

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 23
 Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 24
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 25
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 26

<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 26

Asn Gln Ile Ala Gly Ser
1 5

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 27

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 28

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

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<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 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195

200

205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys

<210> 30
 <211> 1356
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 30

gaagtgcaat tgggtgaaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
agctgtgccc ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaacaaaa tcgccggcag cacctactac	180
ctggacagcg tgagaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg cccagcgtg tccccctgg ccccgagcag caagagcacc	420
agcggcggca cagccgcctt gggctgctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccccct gcccgcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
tacaacagca cctacagggg ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acacctgcc cccctcccg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctacccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccagaga acaactacaa gaccaccccc	1200
ccagtgtctg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

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

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 32
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 33
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 34
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 35
Tyr Thr Ser
1

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 36
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 37
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39

<211> 639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 39
gagatcgtga tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60
ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180
agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300
accaaggtgg aaatcaagcg tacgggtggcc gctcccagcg tgttcattctt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtgggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 40
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 41
Asn Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид

<400> 42

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 44

Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 45

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 46

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 47

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

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

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

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

Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315	320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	325	330	335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	340	345	350	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	355	360	365	

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 48

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 48

gaagtgcaat tgggtgaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaaccaa acaccggcag cacctactac	180
gtggacagcg tgcaaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc	420
agcggcggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca cttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccctt gccagcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttcct gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900

tacaacagca cctacagggg ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc	1200
ccagtgtctg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 49

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

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 50

Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser
1				5		

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 51

Gln	Gln	Gly	Lys	Lys	Leu	Trp	Ser
1				5			

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

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

<400> 52
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 53
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 53
Tyr Thr Ser
1

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 54
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 55
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 56
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 56
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 57
<211> 639
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 57
gagatcgtga tgaccsagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60
ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180
agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300
accaaggtgg aaatcaagcg tacgggtggc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaagggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 58
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 59

Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 60

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 61

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 62

Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид

<400> 63

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 64

<211> 122

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<400> 64

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

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20

25

30

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

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

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

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

275

280

285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 66

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<400> 66

gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccc ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccagt atcaacaaaa acaccggcag cacctactac 180

ctggacagcg tgcgaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc	420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagt	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccccct gccagcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttcct gttccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc	1200
ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 67

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

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 68

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 69

Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 70

Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 71

Tyr Thr Ser
1

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 72

Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 73

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

<210> 74

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 74

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 75
 <211> 639
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<400> 75
 gagatcgtga tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60
 ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
 ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180
 agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300
 accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcattct cccccccagc 360
 gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
 agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 76
Gly Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 77
Asn Ile Asn Tyr Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 78
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 79
Gly Phe Ala Phe Ser Gly Tyr
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 80
Asn Tyr Pro Gly Ser Ser
1 5

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 81
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 82
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 82
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 Ala Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 83

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 Ala Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	325	330	335
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	340	345	350
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	355	360	365
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	370	375	380
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	385	390	395
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	405	410	415
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	420	425	430
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	435	440	445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 84

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 84

gaagtgsaat tgggtgaaag cggcgaggac ctggtgcagc ctggcggtc tctgagactg	60
agctgtgccg ccagcggctt cgccttcagc ggctactaca tggcctgggt ccgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaac atcaactacc ccggcagcag cacctactac	180
ctggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccgagcag caagagcacc	420
agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccctt gccagcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
tacaacagca cctacagggg ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acacctgcc cccctcccg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctacccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc	1200
ccagtgtctg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 85

<211> 11

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 85
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 86
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 87
Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 88
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 89
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 89

Tyr Thr Ser
1

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 90

Gly Arg Arg Leu Trp
1 5

<210> 91

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 91

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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

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

<210> 92

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 92

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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93

<211> 639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 93
gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga sagagtgacc 60
atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgagagcgcg cgtgccccagc 180
agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcag ggccgcccgc tgtggtcctt cggcggaggc 300
accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcacatt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtgggtgtgc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgcc 639

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 94
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 95
Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 96
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 97
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 98
Asn Gln Ile Ala Gly Ser
1 5

<210> 99
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 99
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 100
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 100
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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<400> 101

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

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

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

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100					105					110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245						250				255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275					280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val

355

360

365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 102

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<400> 102

gaagtgcaat tgggtgaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
agctgtgccc ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaaccaa tgcgcggcag cacctactac	180
gtggacagcg tgcaaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc	420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccccct gccagcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttcct gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagtgc	840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
tacaacagca cctacagggg ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaagagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactaca gaccaccccc	1200
ccagtgtctg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 103

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1	5	10

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 104

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser

1	5

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 105

Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser

1	5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 106
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 107
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 107
Tyr Thr Ser
1

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 108
Gly Arg Arg Leu Trp
1 5

<210> 109
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 109
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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

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

<210> 110

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<400> 110

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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111
<211> 639
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 111
gatatccaga tgaccsagag cccsagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60
atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggccgcccgc tgtggtcctt cggcggaggc 300
accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 112
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 113

<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 113

Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 114

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

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

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 115

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 116

Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 117

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 118

<211> 122

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 118

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

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 119

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

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 120

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 120

gaagtgcaat tgggtgaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccagt atcaacaaa acaccggcag cacctactac 180

ctggacagcg tgcgaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat	300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc	360
agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc	420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag	540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	660
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccccct gccagcccc agagctgctg	720
ggcggaccct ccgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcagg	780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggaccaga ggtgaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
tacaacagca cctacagggg ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc	1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtgt acacctgcc cccctcccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc	1200
ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc	1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaag	1356

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 121

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1

5

10

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 122
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 123
Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 124
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 125
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 125
Tyr Thr Ser
1

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 126
Gly Arg Arg Leu Trp
1 5

<210> 127
<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 127

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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

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

<210> 128

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 128

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 Ser 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 Gln 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 Arg Arg Leu Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 129

<211> 639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 129

gatatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg cgtgccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggccgcccgc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 130
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 131
Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 132
<211> 23
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 132
Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro
20

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид

<400> 133

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 134

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 134

Ile Pro Met Ser Gly Arg
1 5

<210> 135

<211> 23

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 135

Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro
20

<210> 136

<211> 132

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 136

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser
100 105 110

Tyr Phe Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 137

<211> 462

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид

<400> 137

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser
100 105 110

Tyr Phe Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

130						135						140					
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu		
145					150					155					160		
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
				165					170					175			
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
			180					185					190				
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
		195					200					205					
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
	210					215					220						
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
225					230					235					240		
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
				245					250					255			
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
			260					265					270				
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
		275					280					285					
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
	290					295					300						
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
305					310					315					320		
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
				325					330					335			
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
			340					345					350				
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
		355					360					365					
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
	370					375					380						
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		

385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 138

<211> 1386

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 138

caggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc	60
agctgtaaag ctagtggggg caccttctct agctacgcta ttagctgggt cagacaggcc	120
ccaggtcaag gcttgagtg gatggcgga attatcccta tgagcggtag aactacctac	180
gctcagaaat ttcagggtag agtgactatc accgccgacg agtctactag caccgcctat	240
atggaactga gttctctgag gtcagaggac accgccgtct actactgcgc tagagactac	300
ggccccgagg cccccgacta cgggtcaatca actagctact tctgggtacta cgccttcgac	360
ccttggggtc aaggcaccct ggtcaccgtg tcttcagcta gcactaaggg cccaagtgtg	420
tttcccctgg cccccagcag caagtctact tccggcgga ctgctgccct gggttgcctg	480
gtgaaggact acttccccga gcccgtagaca gtgtcctgga actctggggc tctgaacttc	540
ggcgtgcaca ctttccccgc cgtgctgcag agcagcgcc tgtacagcct gagcagcgtg	600
gtgacagtgc cctccagctc tctgggaacc cagacctata tctgcaacgt gaaccacaag	660
cccagcaaca ccaagggtga caagagagtg gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc	720
tgccccccct gccagctcc agaactgctg ggagggcctt ccgtgttcct gttccccccc	780
aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac	840
gtgtcccacg aggaccaga ggtgaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac	900
aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg	960
ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaagaat acaagtgcaa agtctccaac	1020
aaggccctgc cagccccaat cgaaaagaca atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag	1080

ccccaggtgt acaccctgcc cccagccgg gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg	1140
acctgtcttg tgaagggctt ctaccccagc gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc	1200
cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc ccagtgtctgg acagcgacgg cagcttcttc	1260
ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc	1320
agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccaga agtccctgag cctgagcccc	1380
ggcaag	1386

<210> 139
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 139
 Ser Gly Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe Val His
 1 5 10

<210> 140
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 140
 Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 141
 Ser Ser Trp Asp Gln Asp Thr Val Val
 1 5

<210> 142
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 142
Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe
1 5

<210> 143
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 143
Asp Asp Asn
1

<210> 144
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 144
Trp Asp Gln Asp Thr Val
1 5

<210> 145
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 145
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe Val
20 25 30

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

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 146
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

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

<400> 146
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe Val
 20 25 30

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

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
 115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
 130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
 180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 147
<211> 636
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 147
gatatcgagc tgactcagcc ccctagcgtc agcgtcagcc ctggtcaaac cgcctctatc 60
acctgtagcg gcgataatat ccctagctac ttcgtgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120
caagcccccg tgctgggtgat ctacgacgat aacgatagac ctagcggaat ccccgagcgg 180
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta ttagcggcac tcaggccgag 240
gacgaggccg actactactg ctctagctgg gatcaggaca ccgtggtggt cggcggaggc 300
actaagctga ccgtgctggg tcaacctaa gctgccccca gcgtgaccct gttccccccc 360
agcagcgagg agctgcaggc caacaaggcc accctgggtg gcctgatcag cgacttctac 420
ccaggcgccg tgaccgtggc ctggaaggcc gacagcagcc ccgtgaaggc cggcgtggag 480
accaccacc ccagcaagca gagcaacaac aagtagcccg ccagcagcta cctgagcctg 540
acccccgagc agtggaagag ccacaggtcc tacagctgcc aggtgaccga cgagggcagc 600
accgtgaaa agaccgtggc cccaaccgag tgcagc 636

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 148
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5 10

<210> 149
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид

<400> 149

Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 150

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 150

Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 151

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 151

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

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 152

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 153

Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 154

<211> 503
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154

Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
20 25 30

Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
50 55 60

Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro
100 105 110

Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly
115 120 125

Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His
145 150 155 160

Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile
165 170 175

Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser
180 185 190

Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys
195 200 205

Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu
210 215 220

Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly
225 230 235 240

Asp	Phe	Asn	Tyr	Glu	Arg	Gln	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	245	250	255
Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Val	Phe	Met	Cys	Tyr	Ala	Asn	Asn	Thr	Phe	Gly	260	265	270
Ser	Ala	Asn	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Gly	Phe	Ile	275	280	285
Asn	Ile	Phe	Pro	Met	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Asn	Asp	Gly	Glu	290	295	300
Asn	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Pro	Lys	Pro	Glu	His	305	310	315
Gln	Gln	Trp	Ile	Tyr	Met	Asn	Arg	Thr	Phe	Thr	Asp	Lys	Trp	Glu	Asp	325	330	335
Tyr	Pro	Lys	Ser	Glu	Asn	Glu	Ser	Asn	Ile	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	340	345	350
His	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Phe	Leu	355	360	365
Val	Ser	Asn	Ser	Asp	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Ala	Phe	Asn	Val	Tyr	Val	370	375	380
Asn	Thr	Lys	Pro	Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr	Asp	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Met	385	390	395
Leu	Gln	Cys	Val	Ala	Ala	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	Thr	Ile	Asp	Trp	Tyr	405	410	415
Phe	Cys	Pro	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Cys	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Pro	Val	420	425	430
Asp	Val	Gln	Thr	Leu	Asn	Ser	Ser	Gly	Pro	Pro	Phe	Gly	Lys	Leu	Val	435	440	445
Val	Gln	Ser	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Ala	Phe	Lys	His	Asn	Gly	Thr	Val	450	455	460
Glu	Cys	Lys	Ala	Tyr	Asn	Asp	Val	Gly	Lys	Thr	Ser	Ala	Tyr	Phe	Asn	465	470	475
Phe	Ala	Phe	Lys	Glu	Gln	Ile	His	Pro	His	Thr	Leu	Phe	Thr	Pro	Arg	485	490	495

Ser His His His His His His
500

<210> 155
<211> 294
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155
Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
20 25 30

Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
50 55 60

Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro
100 105 110

Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly
115 120 125

Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His
145 150 155 160

Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile
165 170 175

Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser
180 185 190

Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys
195 200 205

Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu

210

215

220

Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly
 225 230 235 240

Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg
 245 250 255

Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly
 260 265 270

Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Arg Ser
 275 280 285

His His His His His His
 290

<210> 156

<211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val Asn
 1 5 10 15

Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro Lys
 20 25 30

Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp Lys
 35 40 45

Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr Val
 50 55 60

Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Phe Asn
 85 90 95

Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Val
 100 105 110

Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile
 115 120 125

Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser Val
 130 135 140

Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Pro Pro Phe Gly
145 150 155 160

Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His Asn
165 170 175

Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser Ala
180 185 190

Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn Lys Glu Gln Ile His Pro
195 200 205

His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser His His His His His His
210 215 220

<210> 157

<211> 741

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 157

Ser Gln Pro Ser Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His
1 5 10 15

Pro Ala Gln Ser Glu Leu Ile Val Glu Ala Gly Asp Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Thr Cys Ile Asp Pro Asp Phe Val Arg Trp Thr Phe Lys Thr Tyr Phe
35 40 45

Asn Glu Met Val Glu Asn Lys Lys Asn Glu Trp Ile Gln Glu Lys Ala
50 55 60

Glu Ala Thr Arg Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Asn Ser Asn Gly Leu
65 70 75 80

Thr Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu
85 90 95

Val Gly Leu Pro Leu Phe Gly Lys Glu Asp Ser Asp Ala Leu Val Arg
100 105 110

Cys Pro Leu Thr Asp Pro Gln Val Ser Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Cys
115 120 125

Asp Gly Lys Ser Leu Pro Thr Asp Leu Thr Phe Val Pro Asn Pro Lys
130 135 140

Ala Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys

145		150		155		160
Val Arg Cys Ala	Ala Gln Arg Asp Gly Thr Trp Leu His Ser Asp Lys	165		170		175
Phe Thr Leu Lys	Val Arg Ala Ala Ile Lys Ala Ile Pro Val Val Ser	180		185		190
Val Pro Glu Thr Ser His Leu Leu Lys Lys Gly Asp Thr Phe Thr Val		195		200		205
Val Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Thr Ser Val Asn Ser Met Trp Leu		210		215		220
Lys Met Asn Pro Gln Pro Gln His Ile Ala Gln Val Lys His Asn Ser		225		230		235
Trp His Arg Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Glu Thr Leu Thr Ile		245		250		255
Ser Ser Ala Arg Val Asp Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn		260		265		270
Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Lys Val Val Glu		275		280		285
Lys Gly Phe Ile Asn Ile Ser Pro Val Lys Asn Thr Thr Val Phe Val		290		295		300
Thr Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val Val Glu Tyr Glu Ala Tyr Pro		305		310		315
Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Ser Ala Asn		325		330		335
Lys Gly Lys Asp Tyr Val Lys Ser Asp Asn Lys Ser Asn Ile Arg Tyr		340		345		350
Val Asn Gln Leu Arg Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr		355		360		365
Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe		370		375		380
Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu		385		390		395
Ile Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Glu Gly Phe Pro Glu Pro Thr						

				405				410				415			
Ile	Asp	Trp	Tyr 420	Phe	Cys	Thr	Gly	Ala 425	Glu	Gln	Arg	Cys	Thr 430	Thr	Pro
Val	Ser	Pro 435	Val	Asp	Val	Gln	Val 440	Gln	Asn	Val	Ser	Val 445	Ser	Pro	Phe
Gly	Lys 450	Leu	Val	Val	Gln	Ser 455	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser 460	Val	Phe	Arg	His
Asn 465	Gly	Thr	Val	Glu	Cys 470	Lys	Ala	Ser	Asn	Asp 475	Val	Gly	Lys	Ser	Ser 480
Ala	Phe	Phe	Asn	Phe 485	Ala	Phe	Lys	Glu	Gln 490	Ile	Gln	Ala	His	Thr 495	Leu
Phe	Thr	Pro	Leu 500	Glu	Val	Leu	Phe	Gln 505	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro 510	Arg	Gly
Pro	Thr	Ile 515	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro 520	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala 525	Pro	Asn	Leu
Leu	Gly 530	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 535	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys 540	Ile	Lys	Asp	Val
Leu 545	Met	Ile	Ser	Leu	Ser 550	Pro	Ile	Val	Thr	Cys 555	Val	Val	Val	Asp	Val 560
Ser	Glu	Asp	Asp	Pro 565	Asp	Val	Gln	Ile	Ser 570	Trp	Phe	Val	Asn	Asn 575	Val
Glu	Val	His	Thr 580	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr 585	His	Arg	Glu	Asp	Tyr 590	Asn	Ser
Thr	Leu	Arg 595	Val	Val	Ser	Ala	Leu 600	Pro	Ile	Gln	His	Gln 605	Asp	Trp	Met
Ser	Gly 610	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys 615	Lys	Val	Asn	Asn	Lys 620	Asp	Leu	Pro	Ala
Pro 625	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile 630	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly 635	Ser	Val	Arg	Ala	Pro 640
Gln	Val	Tyr	Val	Leu 645	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu 650	Glu	Met	Thr	Lys	Lys 655	Gln
Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr

660

665

670

Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 675 680 685

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
 690 695 700

Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
 705 710 715 720

Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
 725 730 735

Arg Thr Pro Gly Lys
 740

<210> 158

<211> 741

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 158

Ser Gln Pro Ser Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile Gln
 1 5 10 15

Pro Ala Gln Ser Glu Leu Ile Val Glu Ala Gly Asp Thr Ile Arg Leu
 20 25 30

Thr Cys Thr Asp Pro Ala Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp
 35 40 45

Val Arg Ile Glu Asn Lys Gln Ser Glu Trp Ile Arg Glu Lys Ala Glu
 50 55 60

Ala Thr His Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Val Leu Phe Leu Val
 85 90 95

Gly Leu Pro Leu Phe Gly Lys Glu Asp Asn Asp Ala Leu Val Arg Cys
 100 105 110

Pro Leu Thr Asp Pro Gln Val Ser Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Cys Asp
 115 120 125

Gly Lys Ser Leu Pro Thr Asp Leu Lys Phe Val Pro Asn Pro Lys Ala
 130 135 140

Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Ile
145 150 155 160

Arg Cys Ala Ala Gln Arg Glu Gly Lys Trp Met Arg Ser Asp Lys Phe
165 170 175

Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile Lys Ala Ile Pro Val Val Ser Val
180 185 190

Pro Glu Thr Ser His Leu Leu Lys Glu Gly Asp Thr Phe Thr Val Ile
195 200 205

Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Thr Ser Val Asp Ser Met Trp Ile Lys
210 215 220

Leu Asn Pro Gln Pro Gln Ser Lys Ala Gln Val Lys Arg Asn Ser Trp
225 230 235 240

His Gln Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Glu Thr Leu Thr Ile Ser
245 250 255

Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn
260 265 270

Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Lys Val Val Glu Lys
275 280 285

Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Val Lys Asn Thr Thr Val Phe Val Thr
290 295 300

Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val Val Glu Phe Glu Ala Tyr Pro Lys
305 310 315 320

Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Pro Thr Asn Arg
325 330 335

Gly Glu Asp Tyr Val Lys Ser Asp Asn Gln Ser Asn Ile Arg Tyr Val
340 345 350

Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr
355 360 365

Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Ser Ala Ser Val Thr Phe Asp
370 375 380

Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Met
385 390 395 400

Asn Gly Arg Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile
405 410 415

Asp Trp Tyr Phe Cys Thr Gly Ala Glu Gln Arg Cys Thr Val Pro Val
420 425 430

Pro Pro Val Asp Val Gln Ile Gln Asn Ala Ser Val Ser Pro Phe Gly
435 440 445

Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Val Phe Arg His Asn
450 455 460

Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Ser Asn Ala Val Gly Lys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Phe Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Ser Lys Glu Gln Ile Gln Pro
485 490 495

His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
500 505 510

Gly Ser Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu
515 520 525

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
530 535 540

Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
545 550 555 560

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
565 570 575

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
580 585 590

Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
595 600 605

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser
610 615 620

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro
625 630 635 640

Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu
645 650 655

Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala
660 665 670

Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr
675 680 685

Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
690 695 700

Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser
705 710 715 720

Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser
725 730 735

Arg Ser Leu Gly Lys
740

<210> 159

<211> 527

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 159

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro
20 25 30

Ser Ile His Pro Ala Lys Ser Glu Leu Ile Val Arg Val Gly Asn Glu
35 40 45

Ile Arg Leu Leu Cys Ile Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu
50 55 60

Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu
65 70 75 80

Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His
85 90 95

Gly Leu Ser Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu
100 105 110

Phe Leu Val Asp Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu
115 120 125

Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Ser Tyr Ser Leu Lys

130

135

140

Gly Cys Gln Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Val Pro Asp
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Gly Ile Thr Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg
 165 170 175

Leu Cys Leu His Cys Ser Ala Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser
 180 185 190

Asp Lys Phe Ile Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val
 195 200 205

Val Ser Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe
 210 215 220

Thr Val Thr Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr
 225 230 235 240

Trp Lys Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser
 245 250 255

Trp His His Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile
 260 265 270

Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn
 275 280 285

Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp
 290 295 300

Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val
 305 310 315 320

Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro
 325 330 335

Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp
 340 345 350

Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr
 355 360 365

Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr
 370 375 380

Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ser Ile Ala Phe

385 390 395 400
 Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu
 405 410 415
 Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr
 420 425 430
 Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser
 435 440 445
 Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ala Ser Gly Pro Pro Phe
 450 455 460
 Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His
 465 470 475 480
 Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser
 485 490 495
 Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn Lys Glu Gln Ile His
 500 505 510
 Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser His His His His His His
 515 520 525

 <210> 160
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 160
 Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
 1 5 10 15

 Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
 20 25 30

 Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
 35 40 45

 Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
 50 55 60

 Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
 65 70 75 80

 Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
 85 90 95

Arg	Ser	Leu	Tyr	Gly	Lys	Glu	Asp	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Arg	Cys	Pro	100	105	110	
Leu	Thr	Asp	Pro	Glu	Val	Thr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Lys	Gly	Cys	Gln	Gly	115	120	125	
Lys	Pro	Leu	Pro	Lys	Asp	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Asp	Pro	Lys	Ala	Gly	130	135	140	
Ile	Met	Ile	Lys	Ser	Val	Lys	Arg	Ala	Tyr	His	Arg	Leu	Cys	Leu	His	145	150	155	160
Cys	Ser	Val	Asp	Gln	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Ser	Glu	Lys	Phe	Ile	165	170	175	
Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Ala	Phe	Lys	Ala	Val	Pro	Val	Val	Ser	Val	Ser	180	185	190	
Lys	Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Thr	Val	Thr	Cys	195	200	205	
Thr	Ile	Lys	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Ser	Thr	Trp	Lys	Arg	Glu	210	215	220	
Asn	Ser	Gln	Thr	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Asn	Ser	Trp	His	His	Gly	225	230	235	240
Asp	Phe	Asn	Tyr	Glu	Arg	Gln	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	245	250	255	
Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Val	Phe	Met	Cys	Tyr	Ala	Asn	Asn	Thr	Phe	Gly	260	265	270	
Ser	Ala	Asn	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Gly	Phe	Ile	275	280	285	
Asn	Ile	Phe	Pro	Met	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Asn	Asp	Gly	Glu	290	295	300	
Asn	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Pro	Lys	Pro	Glu	His	305	310	315	320
Gln	Gln	Trp	Ile	Tyr	Met	Asn	Arg	Thr	Phe	Thr	Asp	Lys	Trp	Glu	Asp	325	330	335	
Tyr	Pro	Lys	Ser	Glu	Asn	Glu	Ser	Asn	Ile	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	340	345	350	

His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu
355 360 365

Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val
370 375 380

Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met
385 390 395 400

Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr
405 410 415

Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val
420 425 430

Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val
435 440 445

Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val
450 455 460

Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn
465 470 475 480

Phe Ala Phe Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Arg
485 490 495

Ser His His His His His His
500

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 161
Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 162
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 162
His Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu
1 5 10

<210> 163
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 163
Asp Pro Ala Lys Leu
1 5

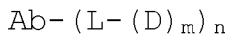
<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 164
Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu
1 5

99

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственный конъюгат антитела формулы



или его фармацевтически приемлемая соль; где

Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с эпитопом cKIT человека;

L является линкером;

D является остатком лекарственного средства;

m является целым числом от 1 до 8; и

n является целым числом от 1 до 10.

2. Лекарственный конъюгат антитела по п. 1, где указанное n является 3 или 4.

3. Лекарственный конъюгат антитела по п. 1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с внеклеточным доменом cKIT (SEQ ID NO: 160).

4. Лекарственный конъюгат антитела по п. 1 или 2, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155).

5. Лекарственный конъюгат антитела по п. 1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

6. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d)

LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 of SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 of SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

7. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующей CDR другого антитела против sKit, приведенного в таблице 1.

8. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицировали, подвергали делеции или заменяли.

9. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., сохраняющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности вариабельной области легкой цепи или вариабельной области тяжелой цепи.

10. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

11. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-10, где указанный линкер (L) выбран из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, заряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.

12. Лекарственный конъюгат антитела по п. 11, где линкер получают из перекрестносшивающего реагента, выбранного из группы, состоящей из N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноата (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноата (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфо-бутаноата (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилйодоацетата (SIA), N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоата (SIAB), малеинимид PEG NHS, N-сукцинимидил 4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазапептадекан-1-оата (CX1-1).

13. Лекарственный конъюгат антитела по п. 12, где указанный линкер получают из перекрестносшивающего реагента N-сукцинимидил-4-(малеинимидометил)циклогексанкарбоксилата (SMCC).

14. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-13, где указанный остаток лекарственного средства (D) выбран из группы, состоящей из ингибитора V-АТФазы, проапоптотического средства, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTOR, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибиторов реакций переноса фосфора в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающегося с малой бороздкой ДНК, и ингибитора DHFR.

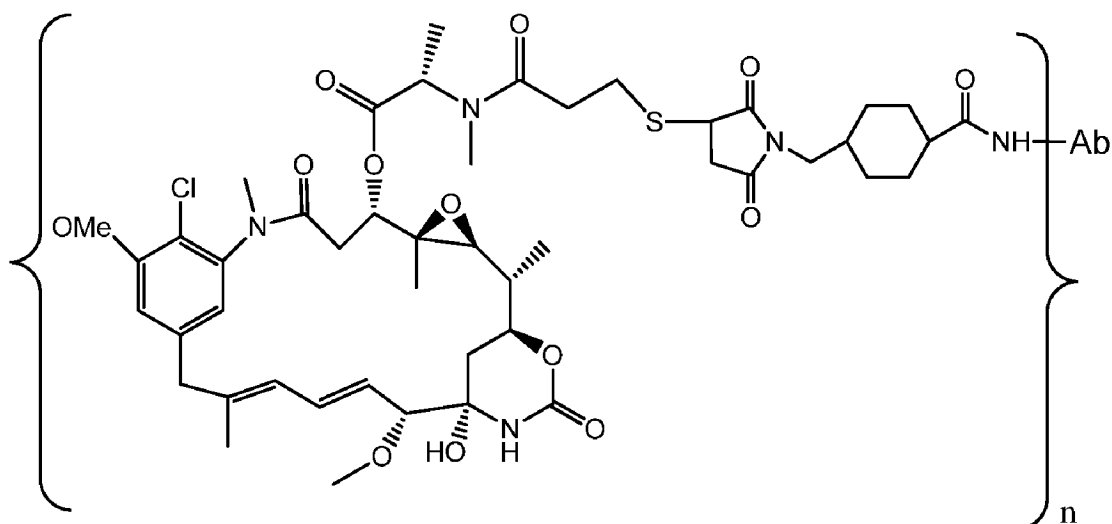
15. Лекарственный конъюгат антитела по п. 14, где остаток лекарственного средства является майтанзиноидом.

16. Лекарственный конъюгат антитела по п. 15, где майтанзиноид является N(2')-деацетил-N(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзином (DM1) или N(2')-деацетил-N2-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)-майтанзином (DM4).

17. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп. в комбинации с другим терапевтическим средством.

18. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп. в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

19. Лекарственный конъюгат антитела формулы



или его фармацевтически приемлемая соль; где;

Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с cKIT человека и по меньшей мере n-количеством первичных аминов; и n является целым числом от 1 до 10.

20. Лекарственный конъюгат антитела по п. 19, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом cKIT человека в доменах 1-3 (SEQ ID NO: 155).

21. Лекарственный конъюгат антитела по п. 19, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с cKIT человека в SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162.

22. Лекарственный конъюгат антитела по п. 19, где указанное Ab является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID

NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

23. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., в котором по меньшей мере одну аминокислоту в CDR заменяют соответствующим остатком из соответствующей CDR

другого антитела против cKIT из таблицы 1.

24. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., в котором одну или две аминокислоты в CDR модифицировали, подвергали делеции или заменяли.

25. Лекарственный конъюгат антитела по любому из предшествующих пп., сохраняющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности вариабельной области легкой цепи или вариабельной области тяжелой цепи.

26. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 19-25, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, сконструированным антителом человека, антителом человека, одноцепочечным антителом (scFv) или фрагментом антитела.

27. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 19-25, где указанное n является целым числом от 2 до 8.

28. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 19-25, где указанное n является целым числом от 3 до 4.

29. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 19-28 в комбинации с другим терапевтическим средством.

30. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 19-28 в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, где указанную композицию получают в виде лиофилизата.

33. Фармацевтическая композиция по п. 32, где указанный лиофилизат содержит лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-28, сукцинат натрия и полисорбат 20.

34. Способ лечения cKIT-положительного злокачественного новообразования у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту лекарственного конъюгата антитела по любому из пп. 1-28 или фармацевтической композиции по пп. 31-33.

35. Способ по п. 34, где указанное злокачественное

новообразование выбрано из группы, состоящей из гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST), мелкоклеточного рака легких (SCLC), острого миелолейкоза (AML), меланомы, тучноклеточного лейкоза (MCL), мастоцитоза, нейрофиброматоза, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака поджелудочной железы.

36. Способ по п. 35, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

37. Способ по п. 36, где лекарственный конъюгат антитела или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

38. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-28 для применения в качестве лекарственного средства.

39. Лекарственный конъюгат антитела по любому из пп. 1-28 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 31-33 для применения в лечении cKIT-положительного злокачественного новообразования.

40. Лекарственный конъюгат антитела по п. 39, вводимый в комбинации с другим терапевтическим средством.

41. Лекарственный конъюгат антитела по п. 40, вводимый в комбинации с терапевтическим средством, указанным в таблице 16.

42. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28.

43. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 42.

44. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 43.

45. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 44 и выделение антитела из культуры.

46. Способ получения лекарственного конъюгата антитела против cKIT, включающий:

(a) химическое соединение SMCC с остатком лекарственного средства DM-1;

(b) конъюгирование указанного линкера-лекарственного средства с антителом, выделенным из культуры клеток по п. 45; и

(c) очистку лекарственного конъюгата антитела.

47. Лекарственный конъюгат антитела, получаемый способом по п. 46, имеющий среднее соотношение майтазонида и антитела (MAR), измеряемое с помощью УФ-спектрофотометра, приблизительно 3,5.

48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (CDR - определяющую комплементарность область) SEQ ID NO: 76, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 77, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 78; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 85, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 86 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 87;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 22, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 23, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 24; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 31, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 32 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 33;

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 SEQ ID NO: 130, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 131, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 132; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 139, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 140 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 141;

(iv) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 58, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 59, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 60; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 67, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 68 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 69;

(v) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 40, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 41, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 49, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 50 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 51;

(vi) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 94, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 95, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 96; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 103, (d) LCDR2 SEQ ID NO: 104 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 105;

(vii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 112, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 113, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 114; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 121, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 122 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 123; или

(viii) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) HCDR1 SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1 SEQ ID NO: 12, (e) LCDR2 SEQ ID NO: 13 и (f) LCDR3 SEQ ID NO: 14.

49. Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 48, являющиеся мечеными.

50. Диагностический реагент по п. 49, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего средства и иона металла.

По доверенности

ФИГ.1

Активность ADC против c-Kit на панели клеточных линий

ADC	GIST T-1		GIST882		GIST430		NCI-H526		NCI-H1048		Kasumi-6		Kasumi-1		MDA-MB-453 (c-Kit-отрицат.)	
	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %	IC50 нМ	Amax %
IgG-MCC-DM1	13.622	82	>68	27	33.121	53	35.738	99	12.141	98	19.200	78	8.300	99	11.383	95
NEG024-MCC-DM1	0.021	72	0.721	66	0.038	53	0.074	99	0.737	98	5.262	78	8.493	99	22.772	92
NEG085-MCC-DM1	0.009	76	0.471	71	0.036	59	0.026	99	0.547	98	0.637	80	4.824	99	46.827	90
NEG086-MCC-DM1	0.013	74	0.430	69	0.056	54			0.828	98	0.522	80	4.223	99	16.922	91
NEG087-MCC-DM1	0.008	78	0.411	70	0.046	57			1.503	98	3.242	80	6.073	99	45.431	90
20376-MCC-DM1	0.051	69	1.000	69	0.038	54	0.074	99	1.340	97	1.505	79	1.329	100	2.690	95

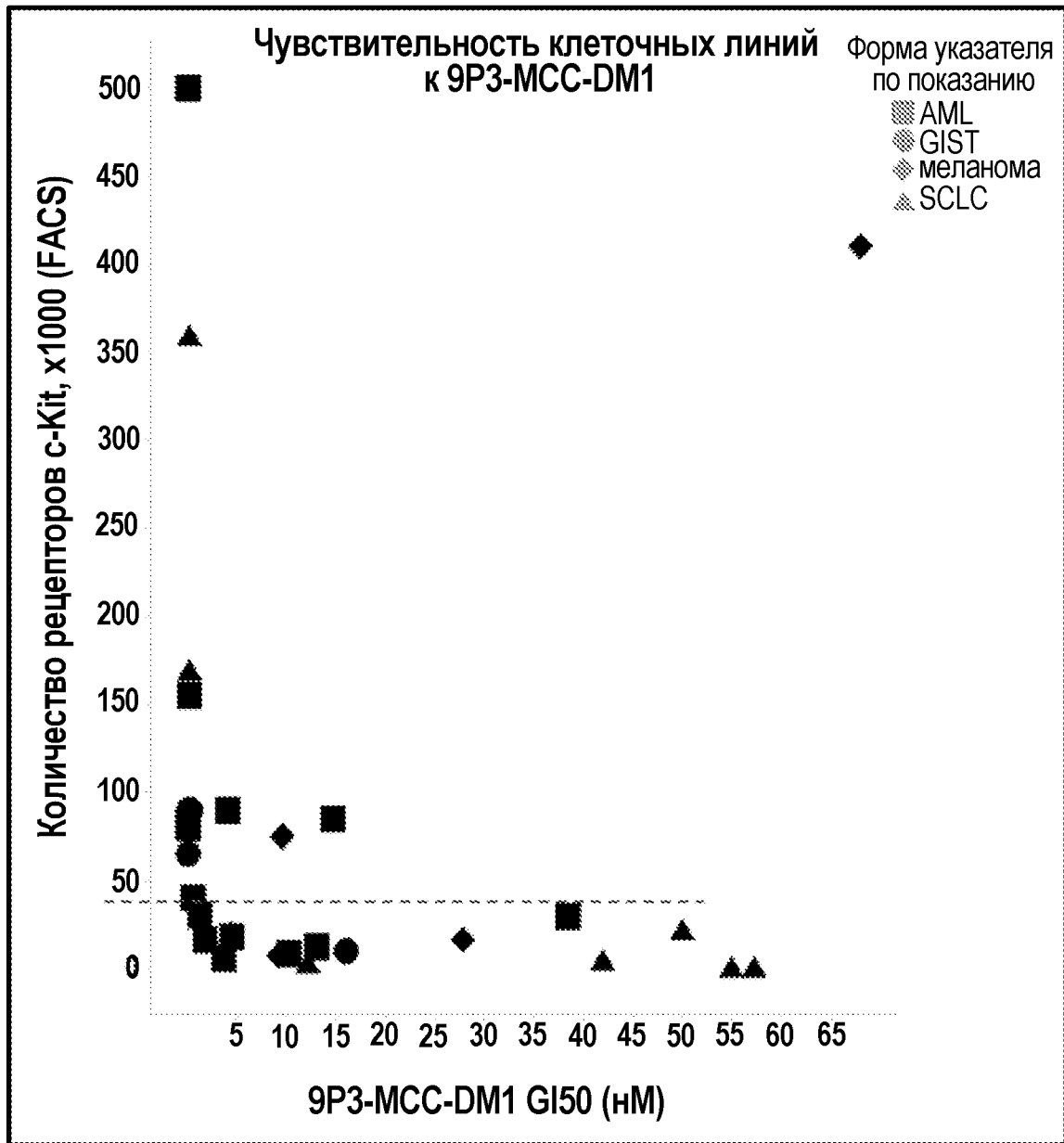
ФИГ.2

Сравнение различных линкеров/токсинов на множестве клеточных линий

Клеточная линия	Показание	9P3-MCC-DM1 GI50 (нМ)	9P3-MCC-DM1 Amax (%)	9P3-SPDB-DM4 GI50 (нМ)	9P3-SPDB-DM4 Amax (%)	9P3-CX1-1-DM1 GI50 (нМ)	9P3-CX1-1-DM1 Amax (%)	Статус cKit
CMK11-5	AML	0.05	91	0.07	92	не определено	не определено	WT
Hel92.1.7	AML	0.61	95	1.26	94	7.6	95	WT
Kasumi-1	AML	4	100	0.83	100	0.02	100	N822K/WT
Kasumi-6	AML	1.29	92	0.91	94	не определено	не определено	WT
M-O7e	AML	0.08	100	0.11	99	не определено	не определено	WT
OCI-M1	AML	0.11	99	0.13	100	не определено	не определено	WT
SKNO1	AML	3.6	99	1.6	99	5.2	100	N822K/N822K
UKE-1	AML	1.8	99	5.6	100	не определено	не определено	WT
GIST T1	GIST	0.02	75	0.045	75	не определено	не определено	Ex11del
GIST430	GIST	0.08	60	0.17	65	0.04	55	Ex11del, Ex13
NCI-H526	SCLC	0.05	98	0.17	98	не определено	не определено	WT
NCI-H889	SCLC	0.15	86	1.47	84	не определено	не определено	Amp
NCI-H1048	SCLC	4.3	99	2.77	100	1.45	100	WT
NCI-H1930	SCLC	0.09	87	0.3	88	не определено	не определено	Amp

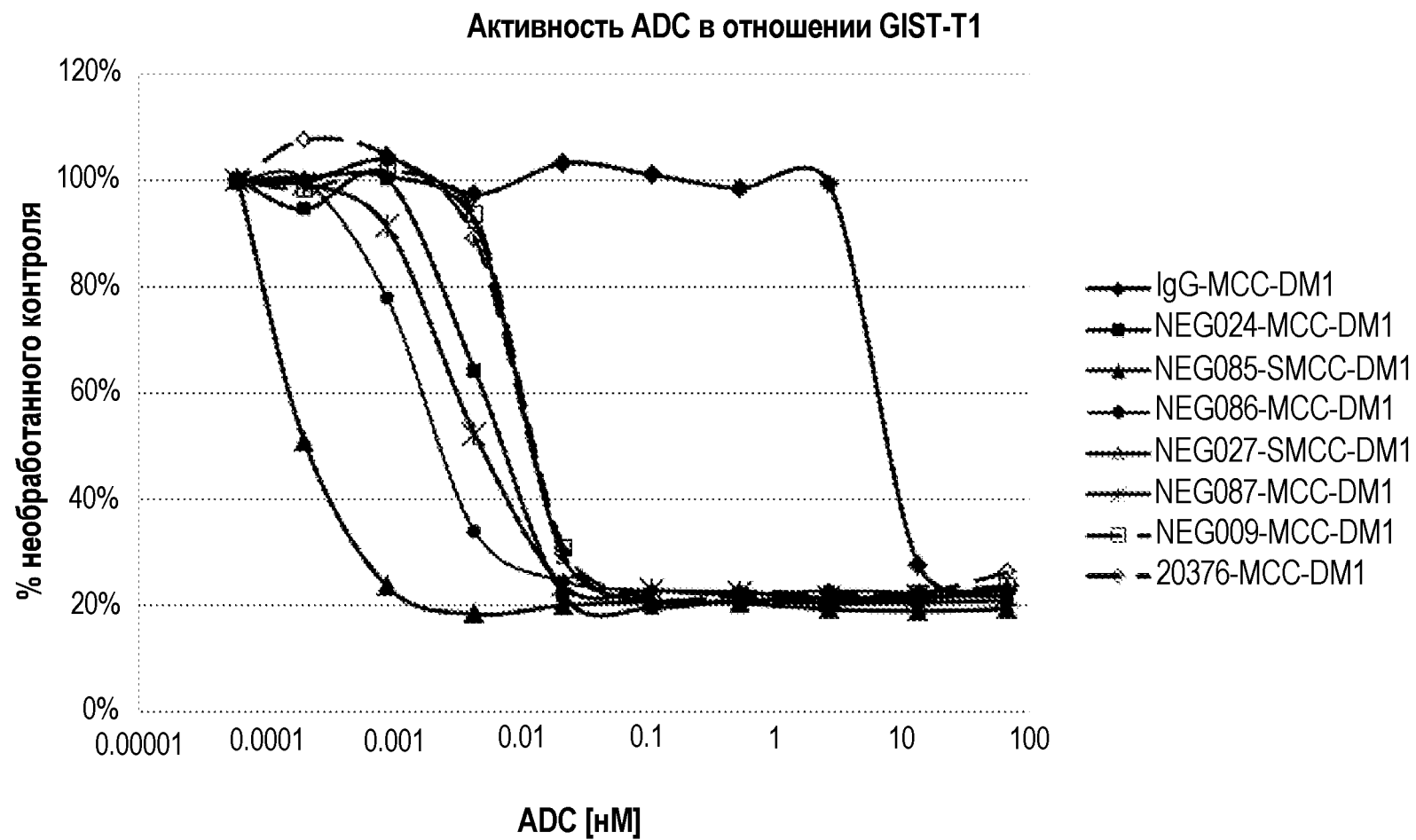
ФИГ.3

Чувствительность к ADC против c-Kit по показаниям



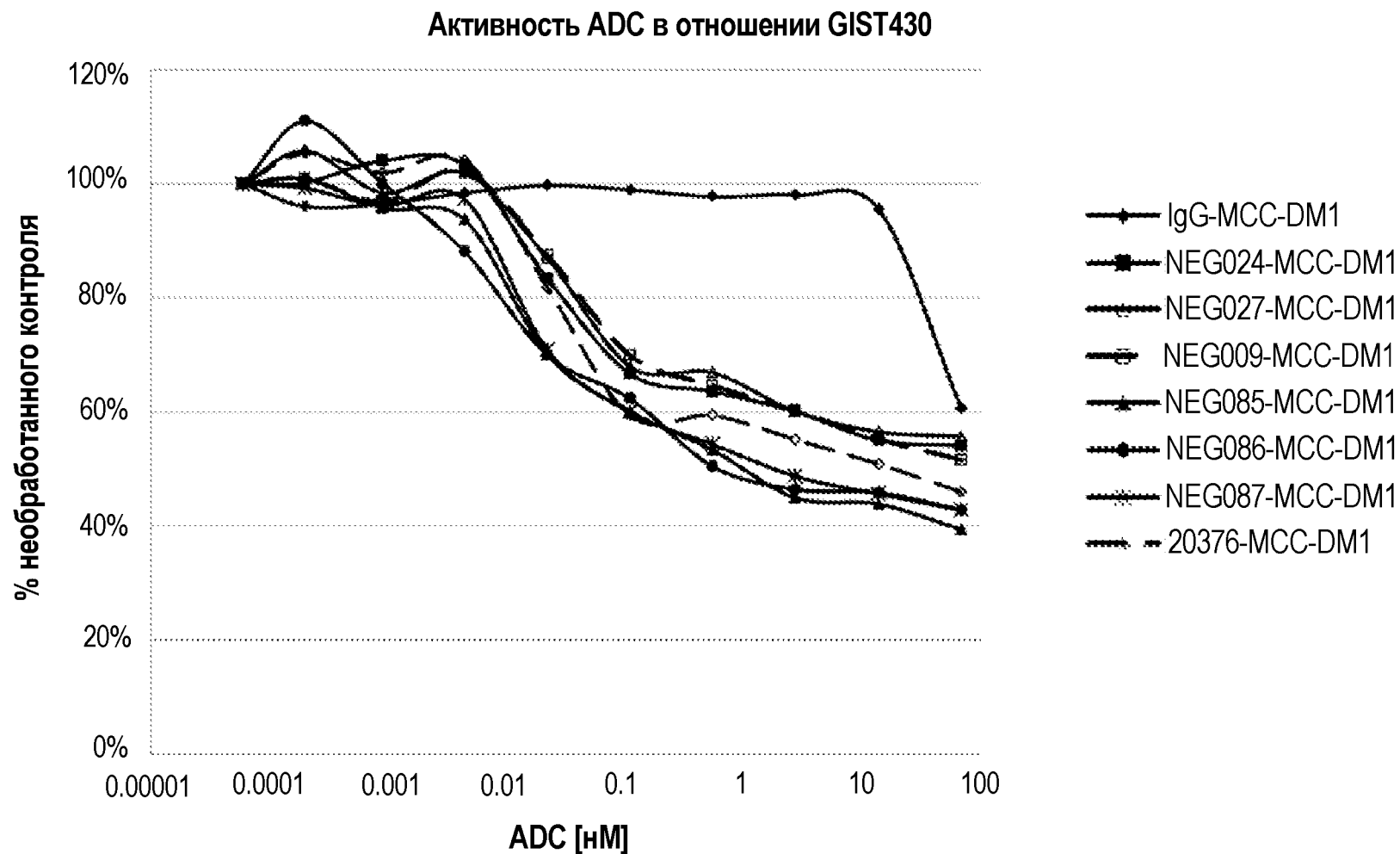
ФИГ.4

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток GIST T1



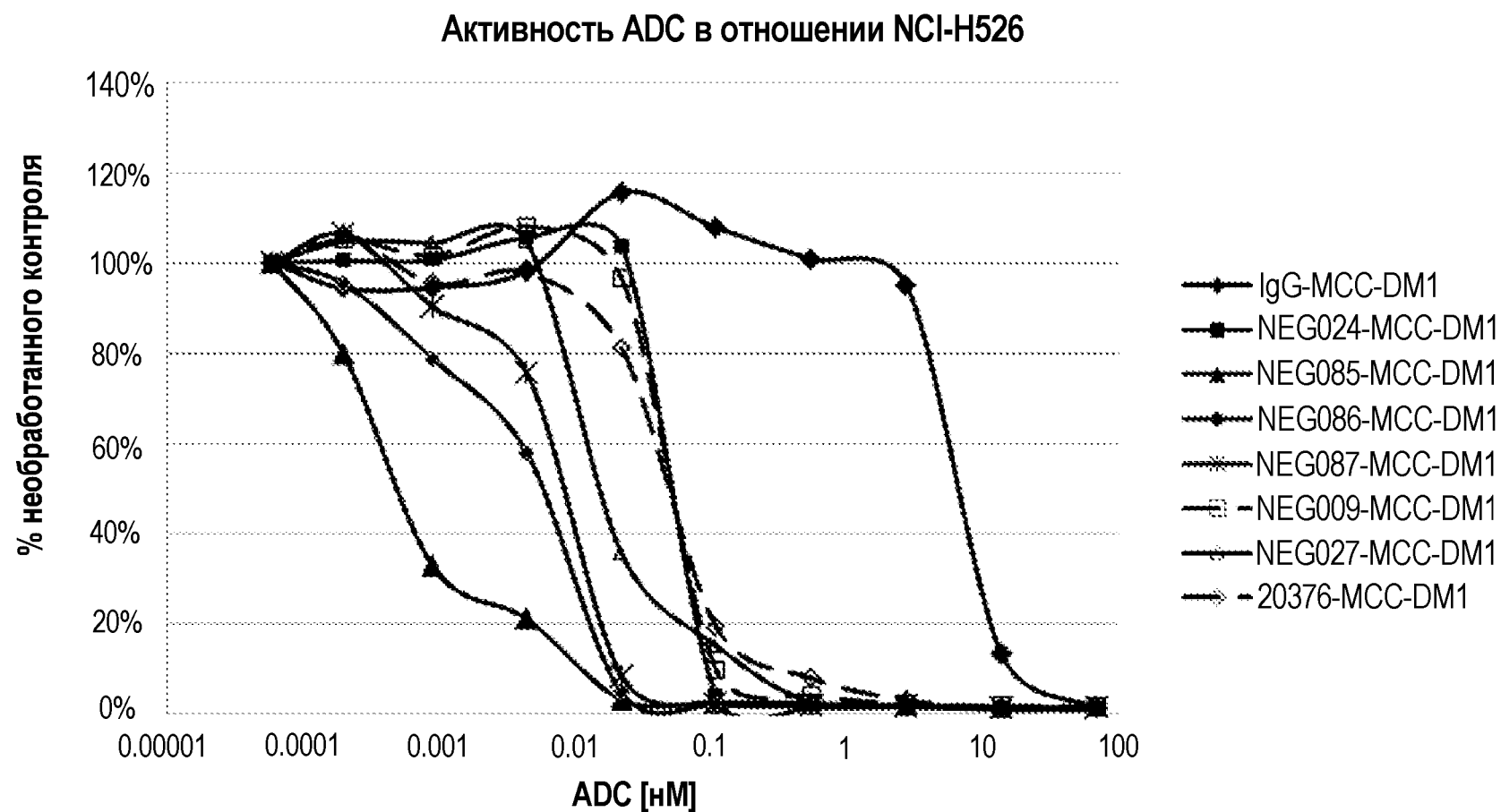
ФИГ.5

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток GIST 430



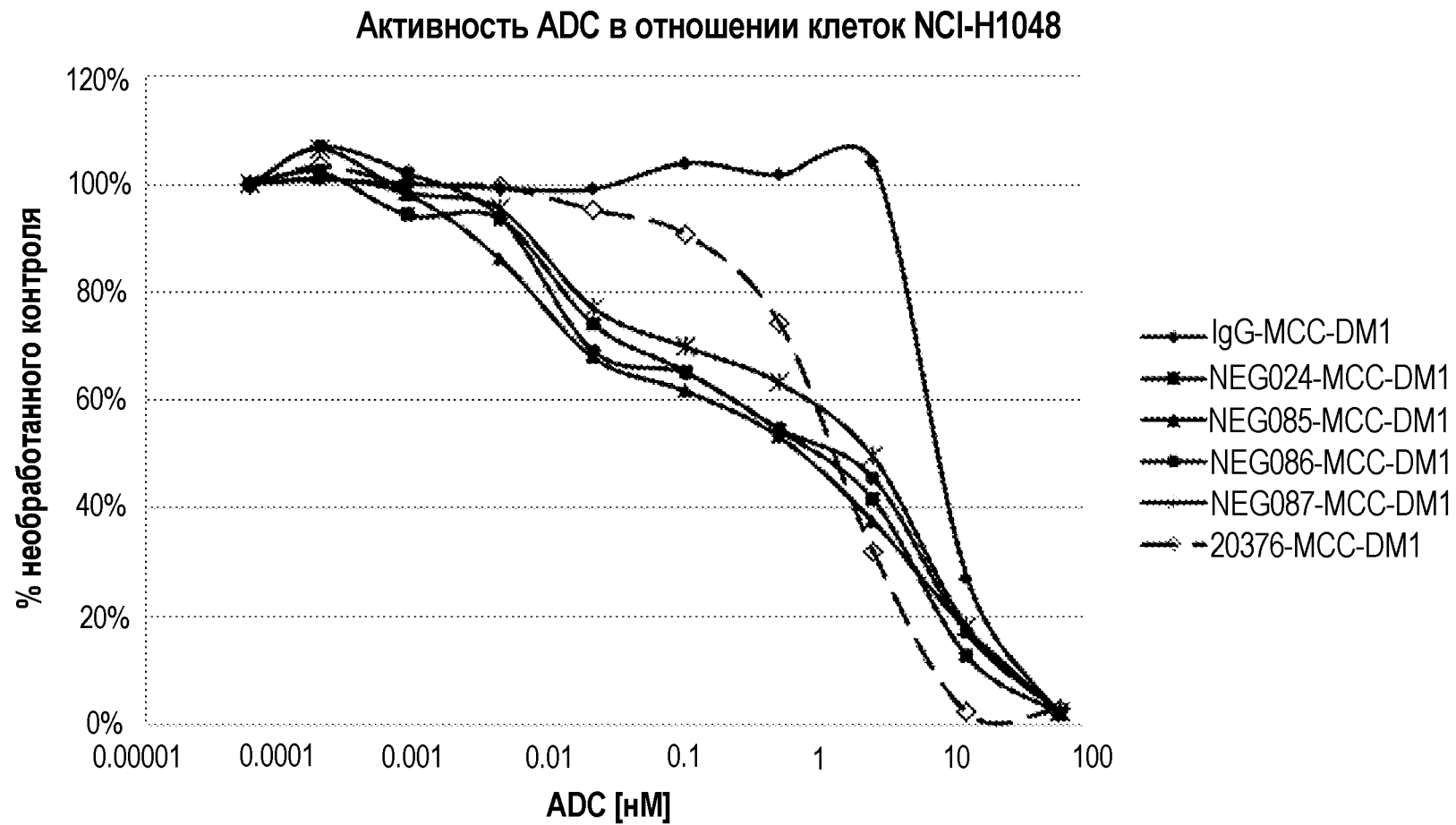
ФИГ.6

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток NCI-H526 (мелкоклеточного рака легких (SCLC))



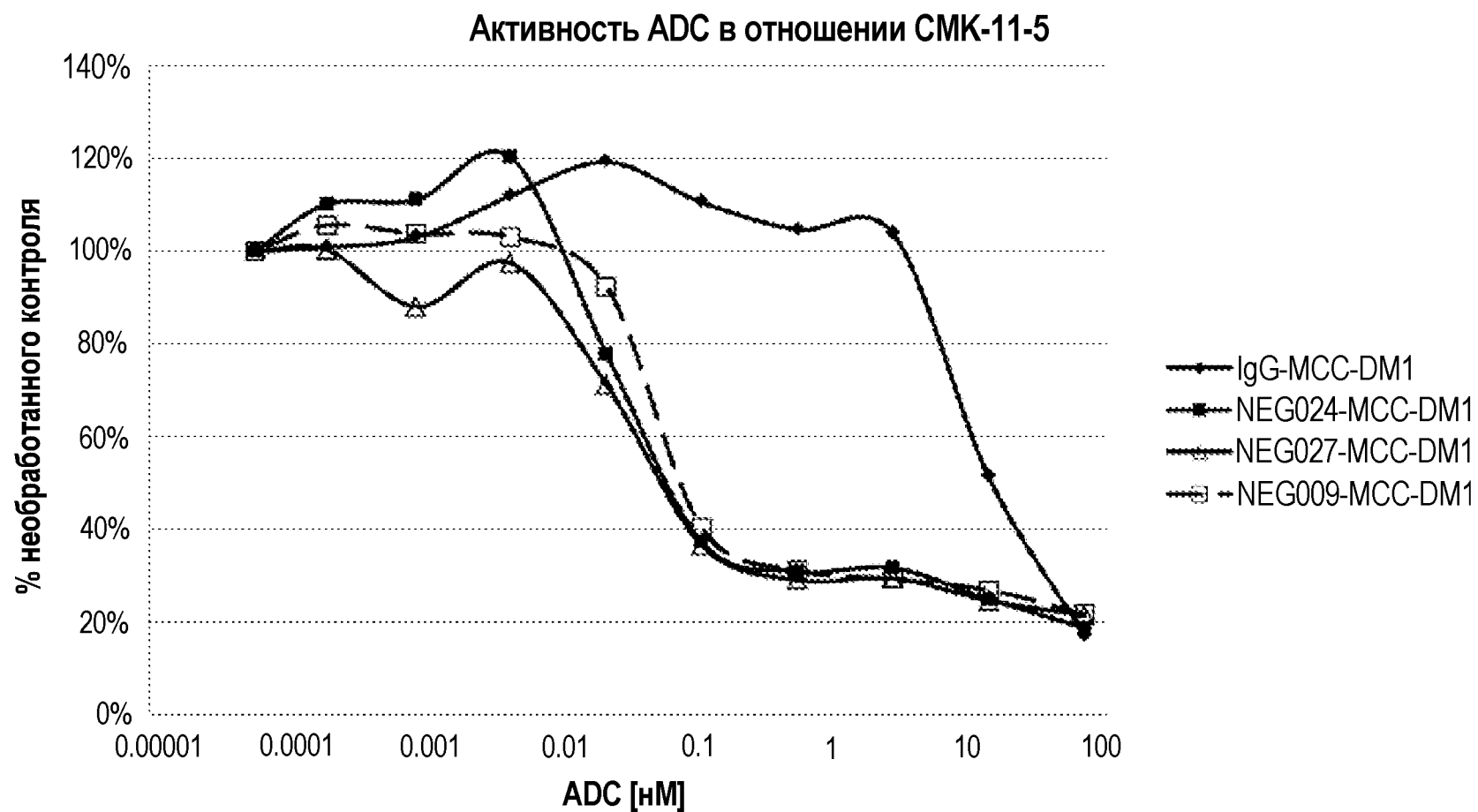
ФИГ.7

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток NCI-H1048



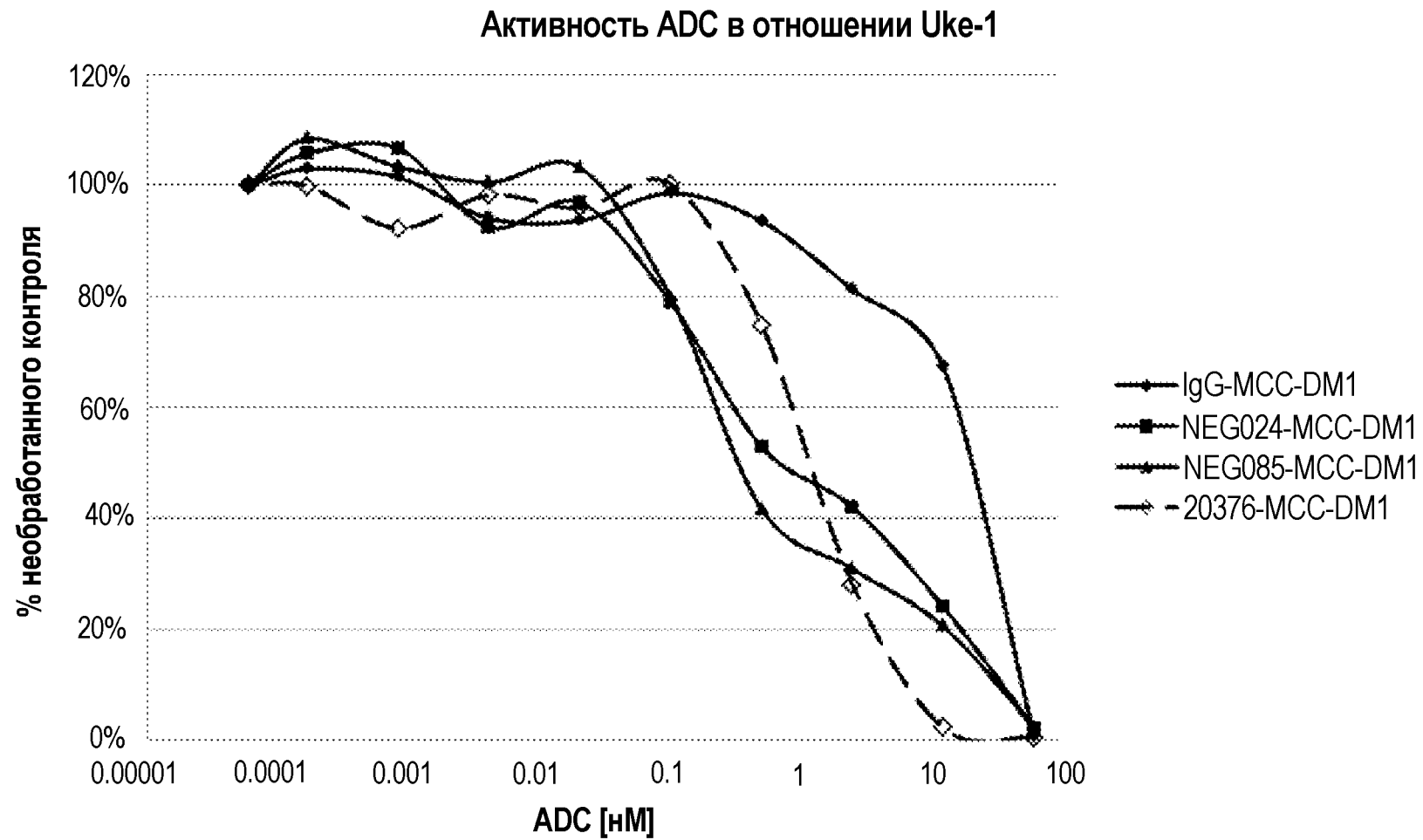
ФИГ.8

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток CMK-11-5



ФИГ.9

Активность ADC против c-Kit в отношении клеток Uke-1



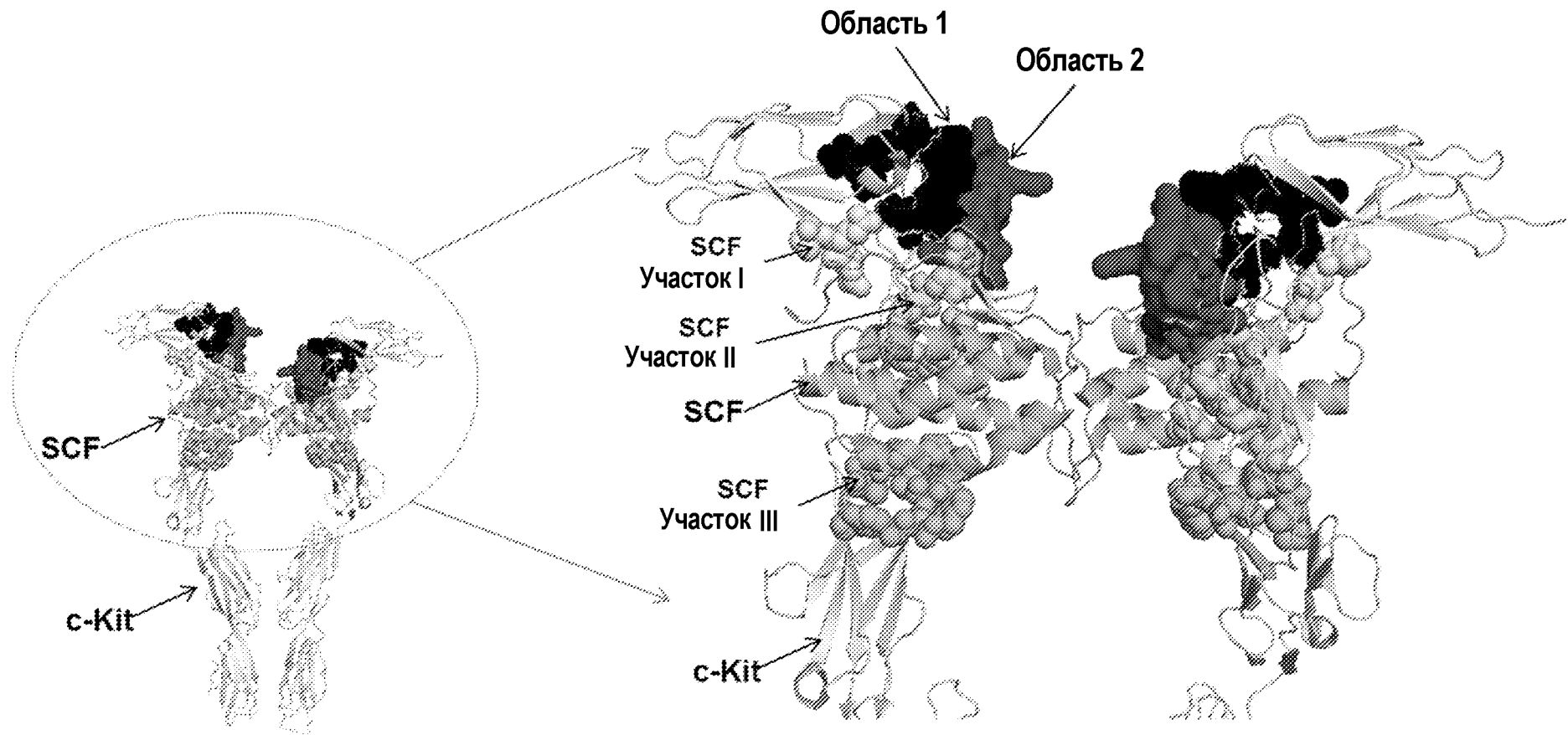
ФИГ.10

Картирование связывания антитела против c-Kit с рецептором c-kit



ФИГ.11

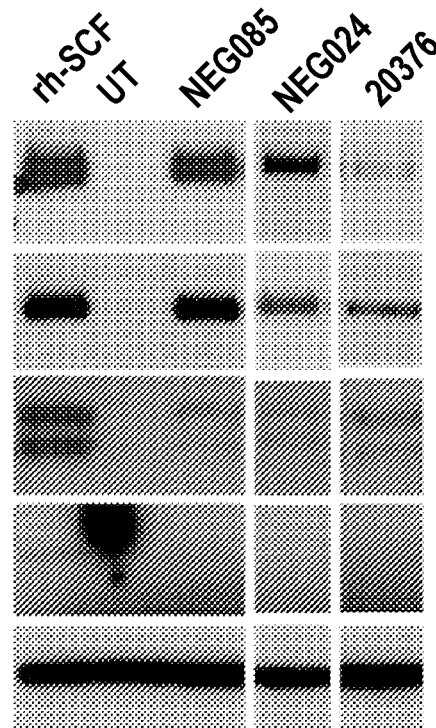
Картирование областей взаимодействия ADC против c-Kit



ФИГ.12

ADC против c-Kit могут опосредовать фосфорилирование c-Kit, но не нижележащих путей, в клетках, экспрессирующих c-Kit дикого типа. ADC против c-Kit не влияют на передачу сигнала в клетках, экспрессирующих мутантный c-Kit

A. Mo7e, c-Kit дикого типа



pc-Kit (Tyr703)
CST3073

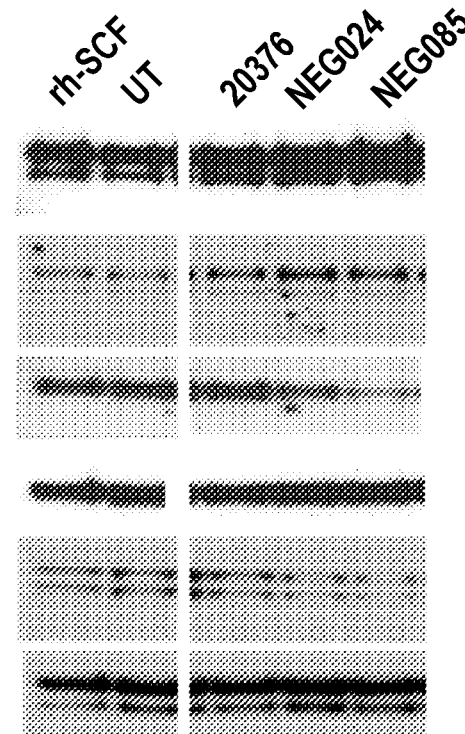
pc-Kit (Tyr721)
NBP1-51412

pERK (Thr202/Tyr204)
CST9101

pAKT (Ser473)
CST9271

GAPDH
CST3683

B. GIST T1, мутантный c-Kit



pc-Kit (Tyr703)
CST3073

pc-Kit (Tyr721)
NBP1-51412

pAKT (Ser473)
CST9271

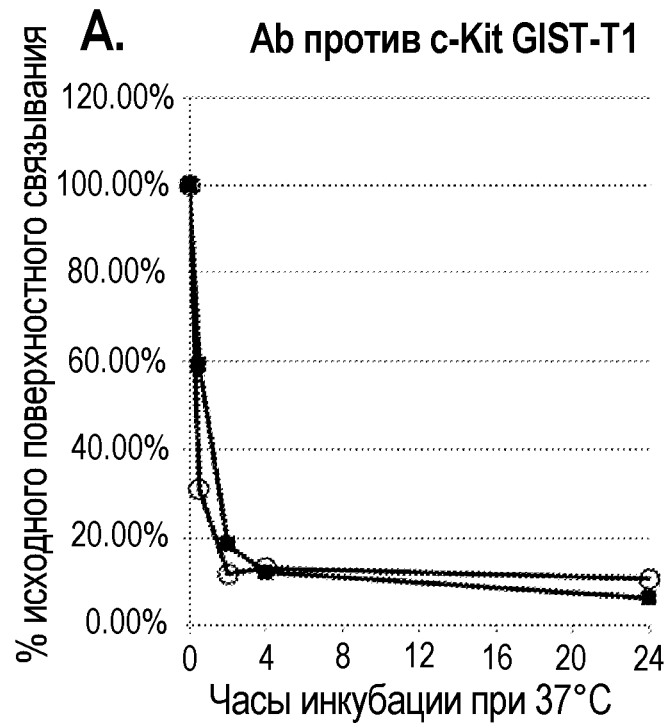
AKT
CST4691

pERK (Thr202/Tyr204)
CST9101

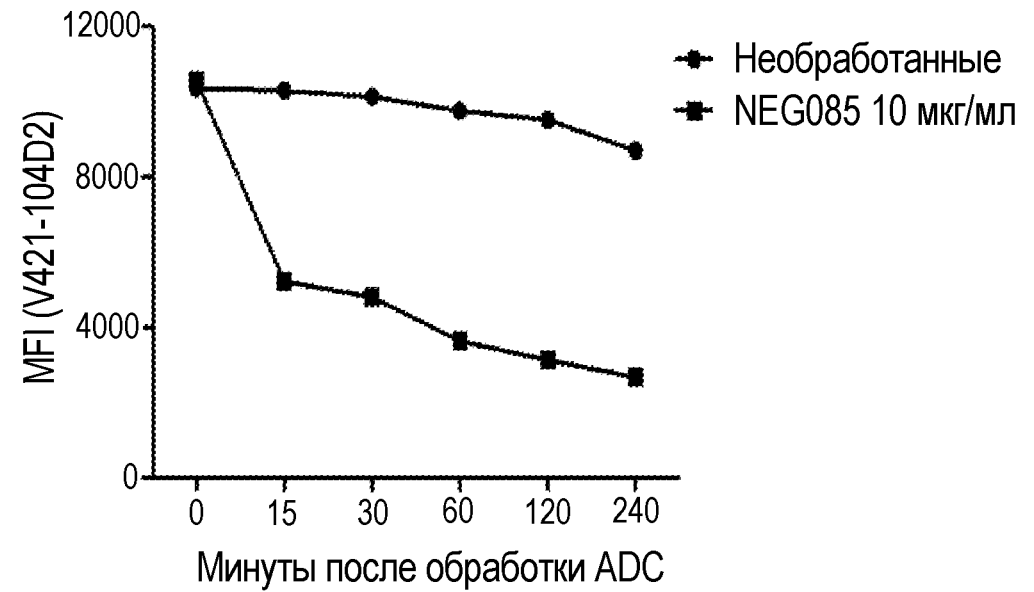
ERK
CST9102

ФИГ.13

NEG085 и 20376 опосредуют быструю интернализацию c-Kit на клетках



B. Общий уровень c-Kit после обработки ADC



ФИГ.14

NEG085-MCC-DM1 повышает деградацию c-Kit

A. GIST T-1, мутантный c-Kit

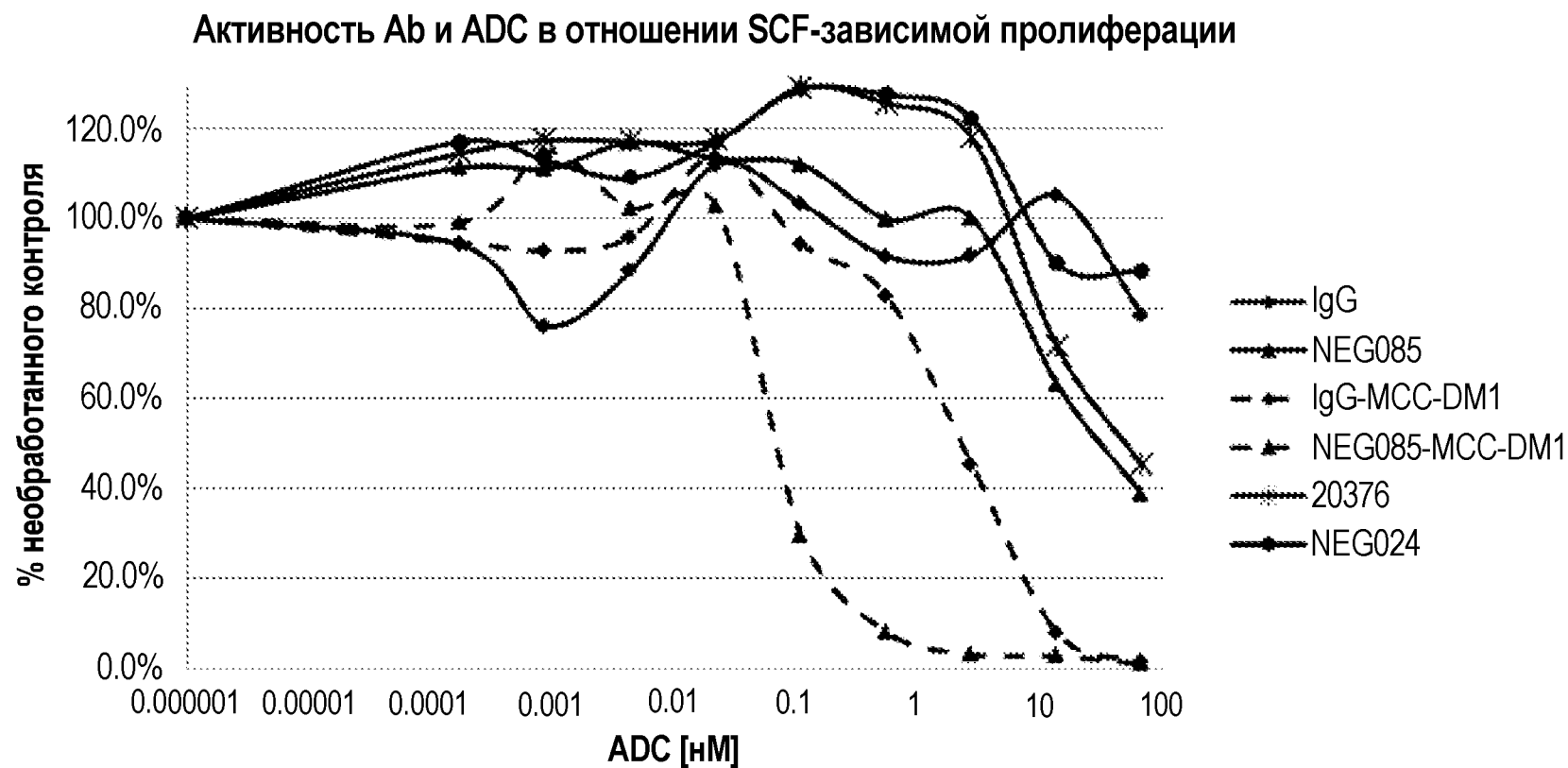


B. NCI-H526, c-Kit дикого типа



ФИГ.15

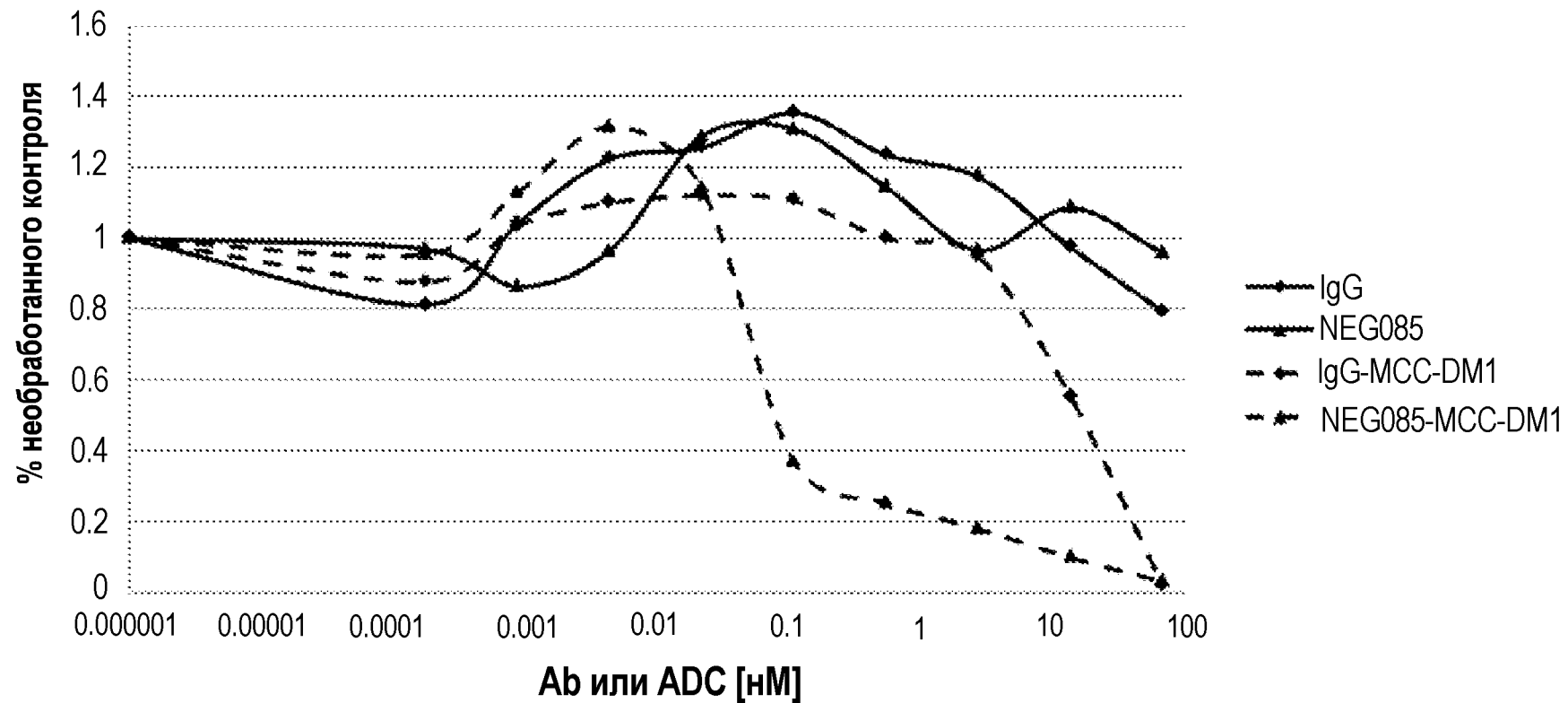
Активность NEG085, NEG024, 20376 в анализах пролиферации в SCF-зависимой клеточной линии Mo7e



ФИГ.16

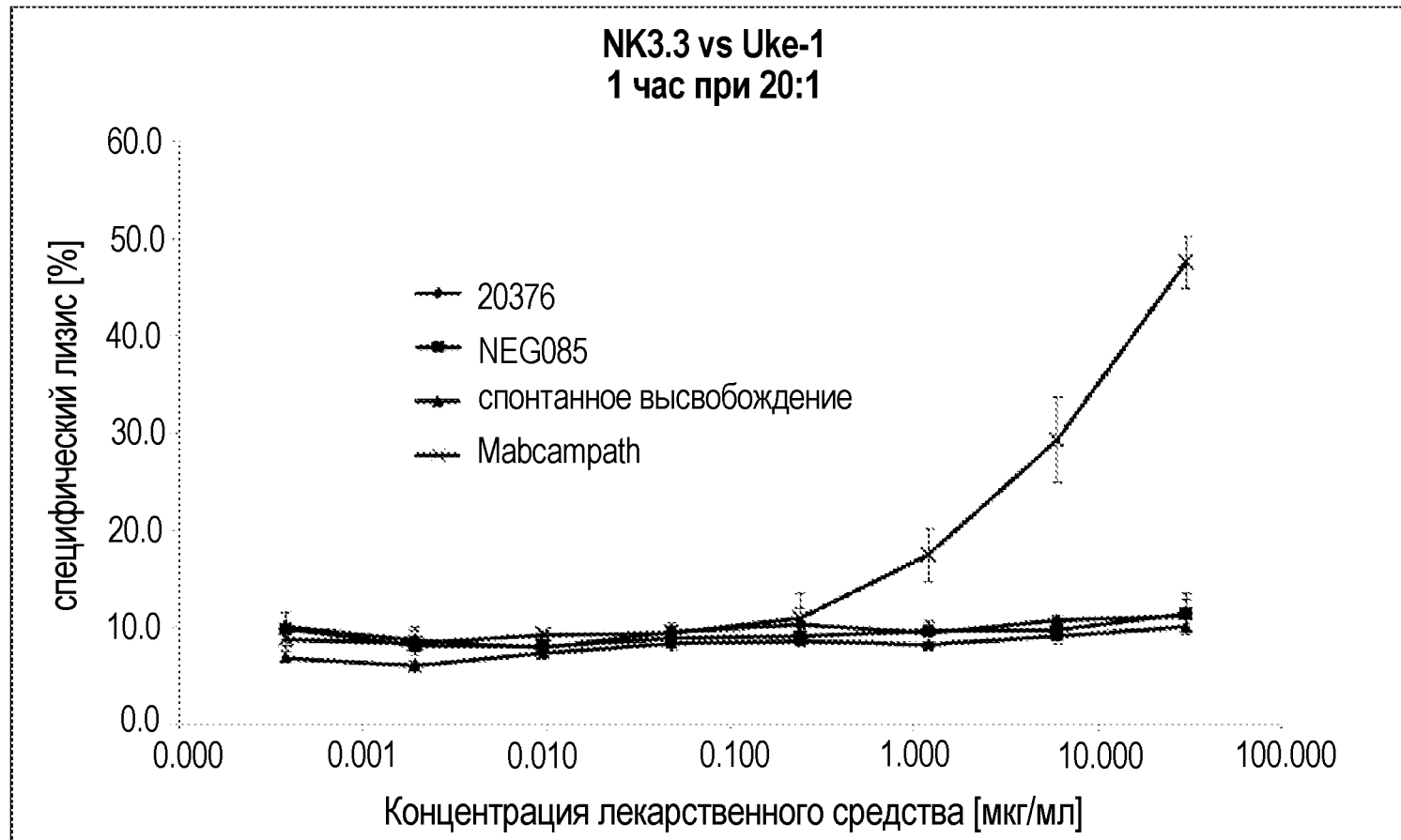
Активность NEG085 в анализах пролиферации в клеточной линии Mo7e, обработанной ГМ-КСФ

Эффект Ab и ADC в отношении SCF-зависимой пролиферации клеток Mo7e



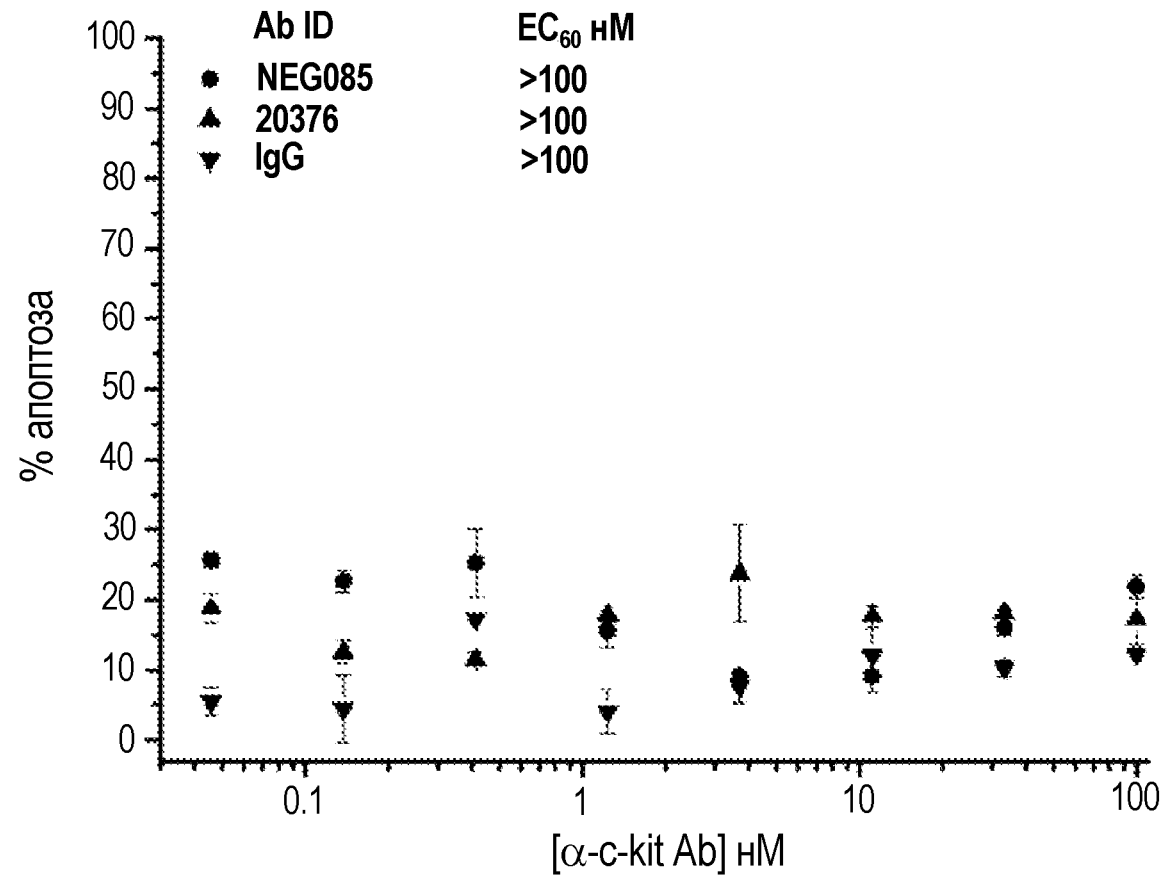
ФИГ.17

NEG085 и 20376 не опосредуют ADCC in vitro



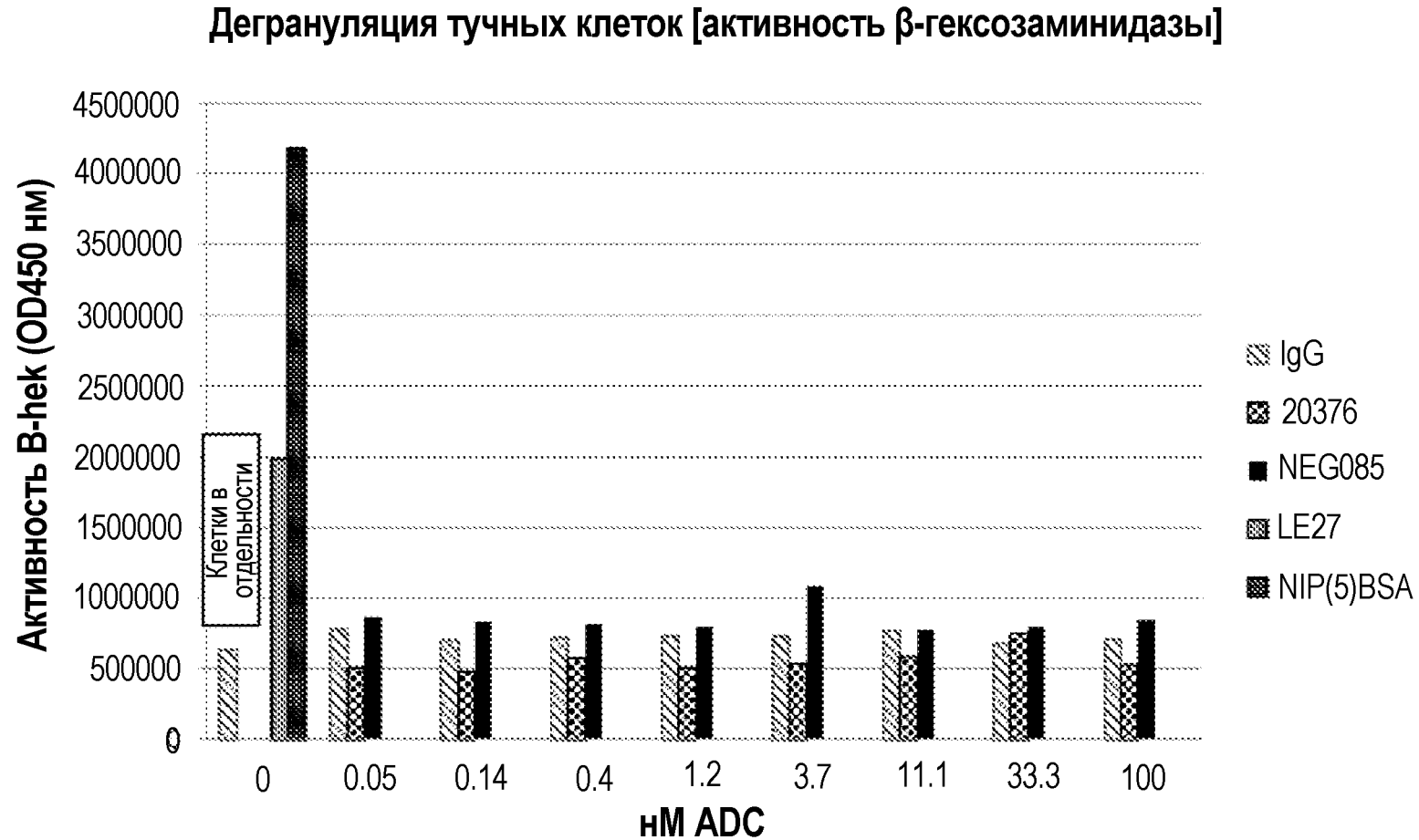
ФИГ.18

Антитела против c-Kit не приводят к апоптозу первичных тучных клеток человека



ФИГ.19

NEG085 и 20376 не опосредуют дегрануляцию тучных клеток в первичных тучных клетках человека ex vivo



ФИГ.20А

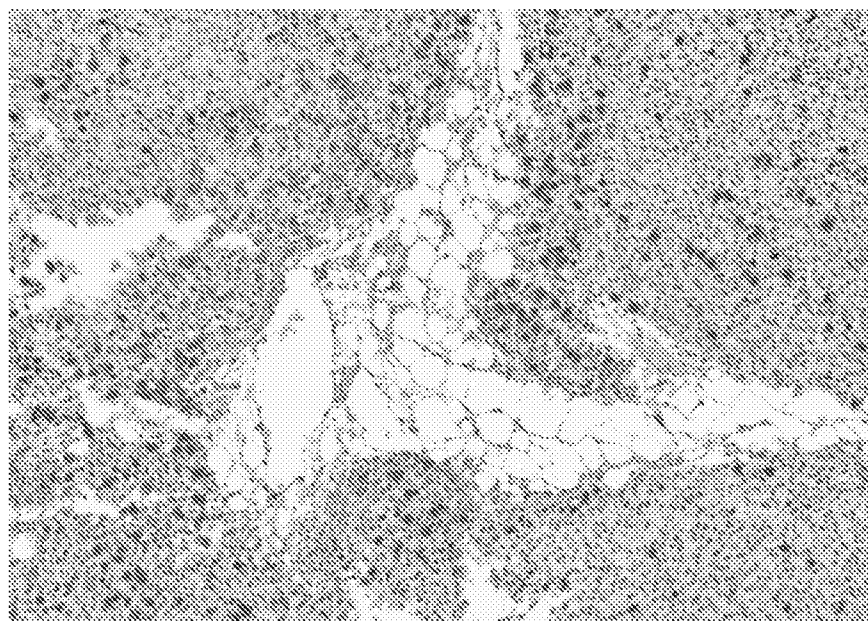
Ко-локализация IgG1 и митотического блока NEG027-MCC-DM1
в модели ксенотрансплантата GIST T1

IgG человека



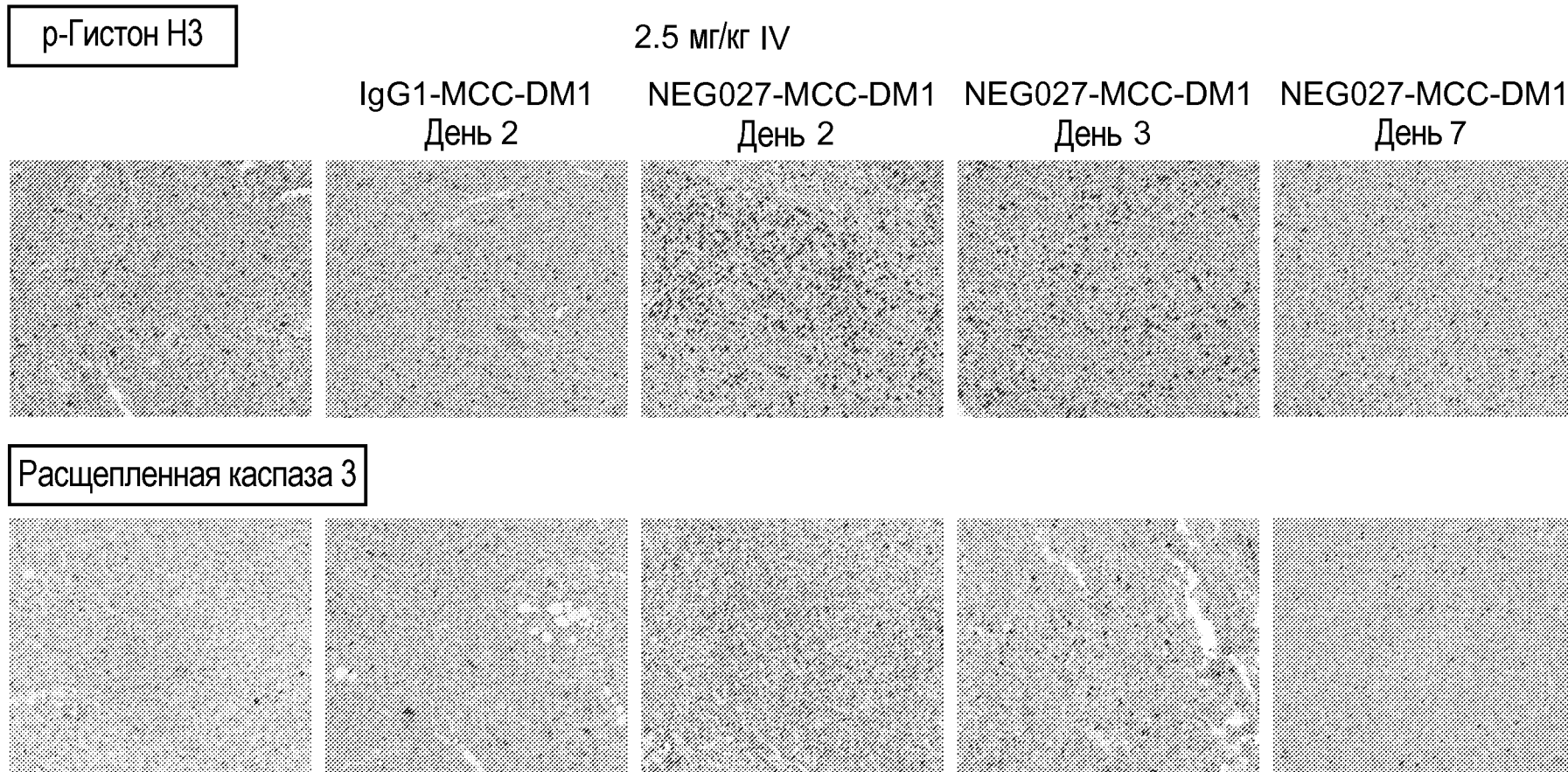
ФИГ.20В

p-Гистон H3



ФИГ.21

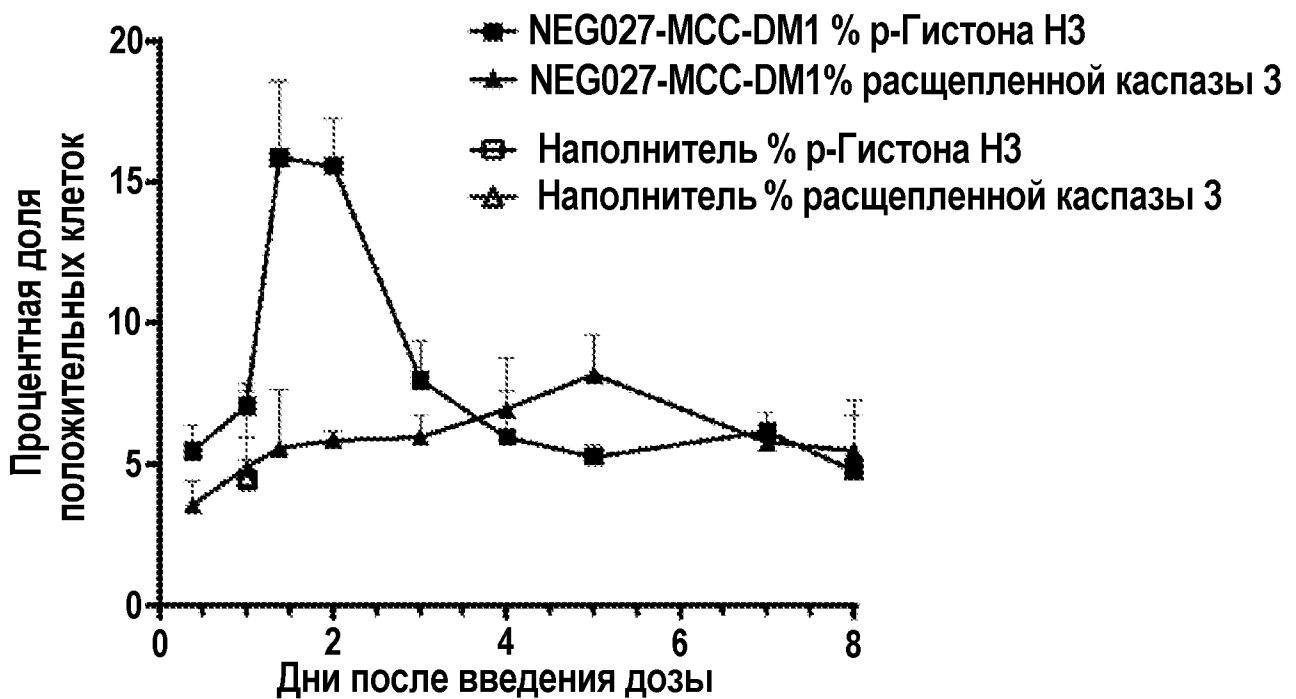
Митотический блок (p-гистон H3) и апоптоз (каспаза 3) после однократной дозы ADC против c-Kit



ФИГ.22

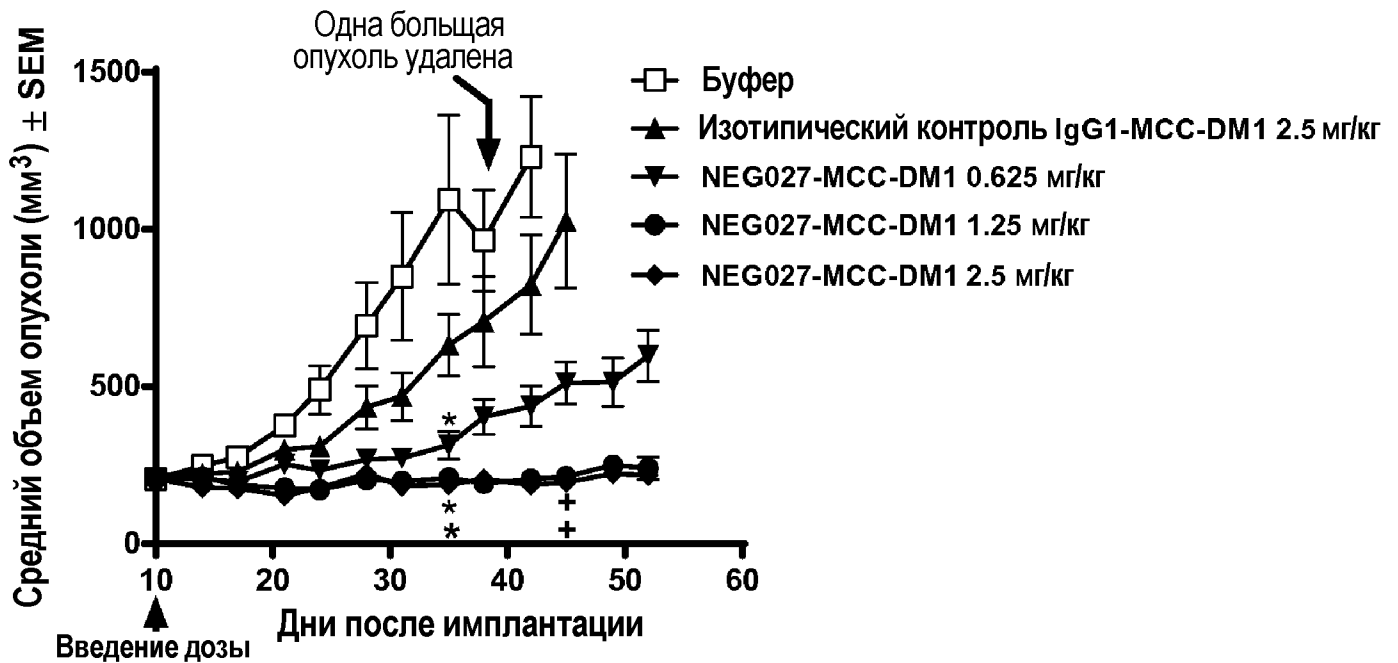
Индукция митотического блока и апоптоза через 8 дней
после введения однократной дозы ADC против c-Kit

Однократная I.V. доза 2,5 мг/кг NEG027-MCC-DM1

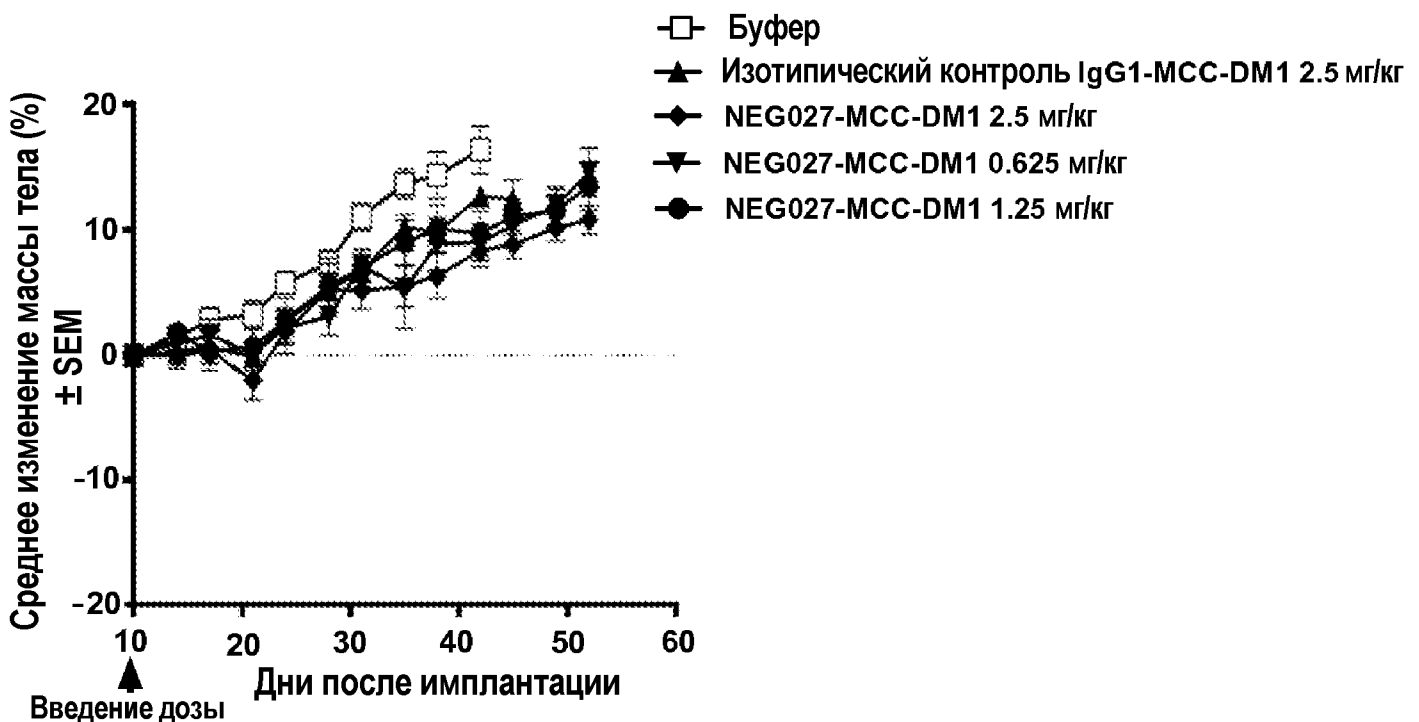


ФИГ.23

(A) Эффективность доза-ответ в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

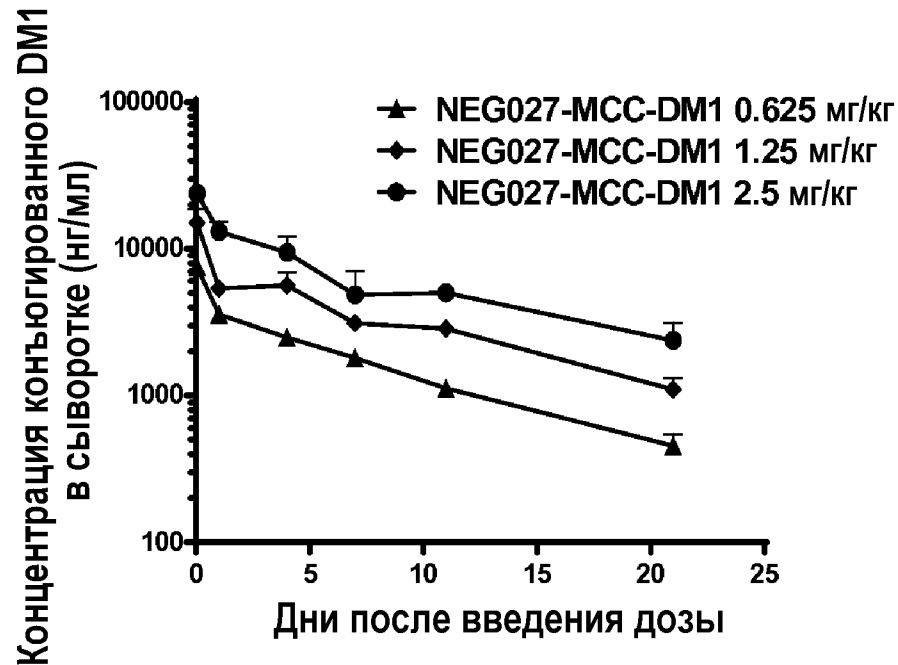


(B) Изменение массы тела в течение лечения

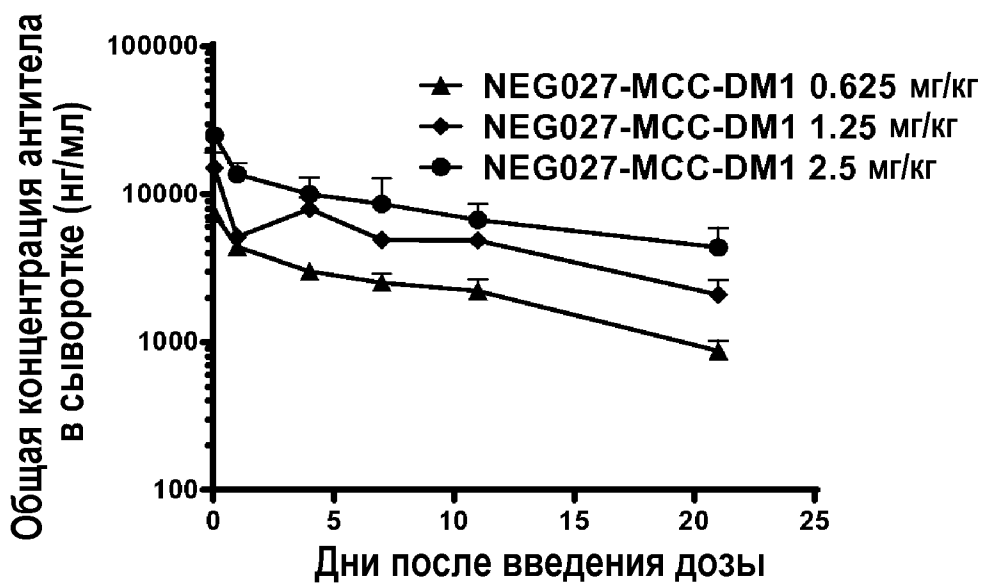


ФИГ.24

(A) ELISA с антителом против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1



(B) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата GIST T1



ФИГ.25

Ответ на дозу NEG027-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

(Верхняя таблица) Таблица данных для дня 35 (p<0,05 по сравнению с наполнителем, ANOVA/тест Тьюки)

(Нижняя таблица, таблица данных для дня 45 (p<0,05 по сравнению с Grp 2 (контроль IgG-DM1), ANOVA/метод Данна)

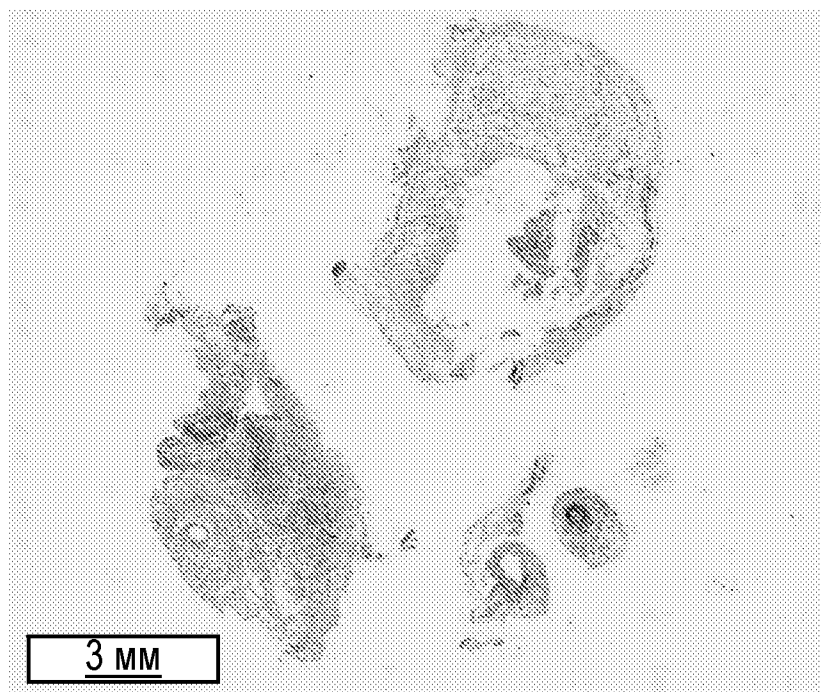
Группа	Лекарственное средство	Доза	Схема	Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
1	TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	890 ± 270	13.7 ± 1.2	9/9
2	IgG5-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	47	-	417 ± 95	10.2 ± 1.0	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	12*	-	109 ± 39	5.3 ± 3.2	9/9
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 мг/кг	однократная i.v. доза	0*	-	4 ± 15	9.0 ± 1.8	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	~*	-8.71	-18 ± 21	5.5 ± 1.6	9/9

Группа	Лекарственное средство	Доза	Схема	Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контрольным IgG (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
1	TBS	0 мг/кг		Снижение	Снижение	0 ± 0	0.0 ± 0.0	9/9
2	IgG5-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-	811 ± 214	12.5 ± 1.5	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	50	-	301 ± 62	10.4 ± 1.7	8/9 (одну исключали из исследования в день 38)
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 мг/кг	однократная i.v. доза	21*	-	8 ± 19	11.1 ± 1.4	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	20*	-	-14 ± 28	8.8 ± 1.1	8/9 (одну исключали из исследования в день 38)

ФИГ.26А

Дозозависимая эффективность NEG027-MCC-DM1 в GIST T1

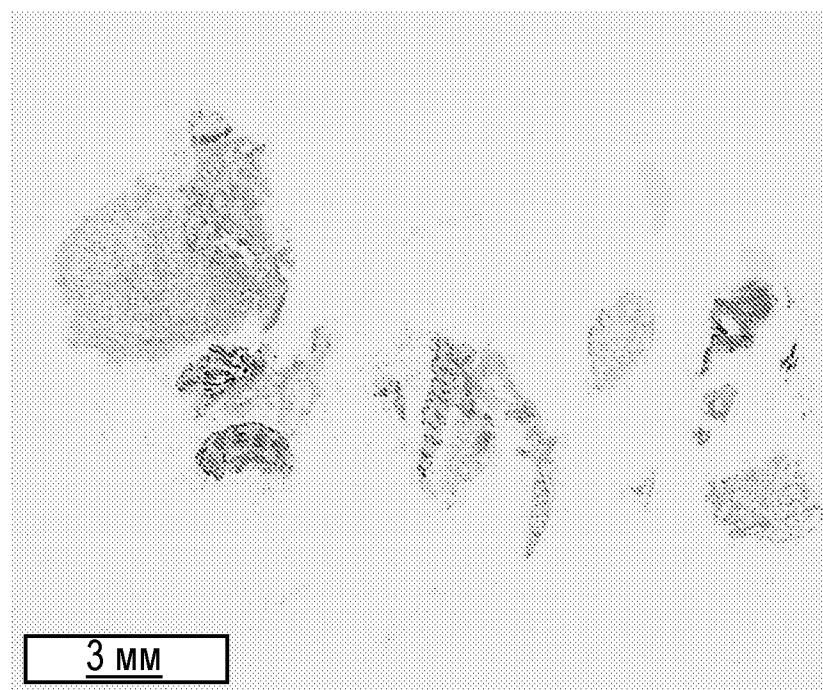
Совокупность опухолей группы 4



ФИГ.26В

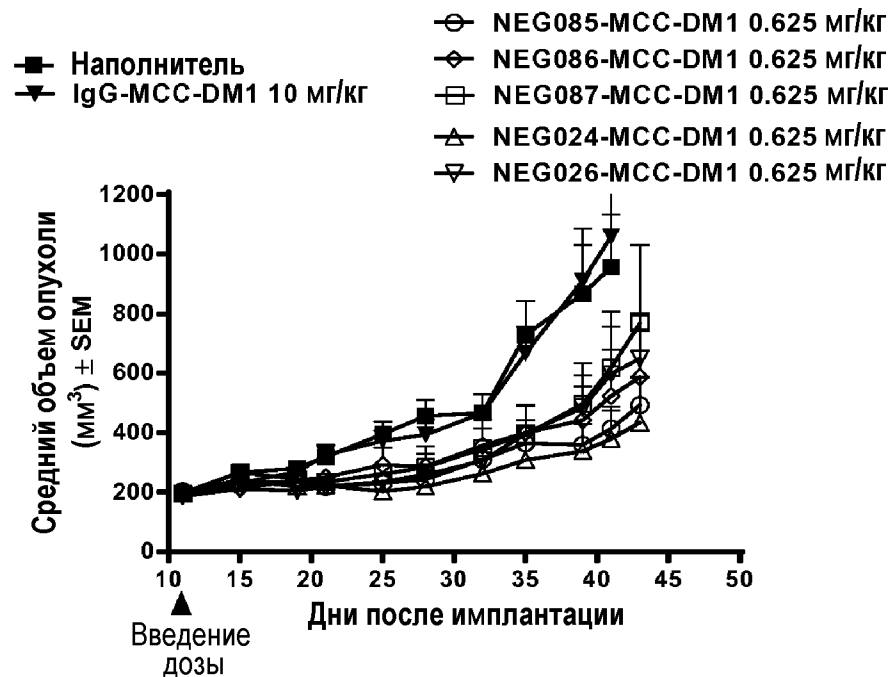
Дозозависимая эффективность NEG027-MCC-DM1 в GIST T1

Совокупность опухолей группы 5



ФИГ.27

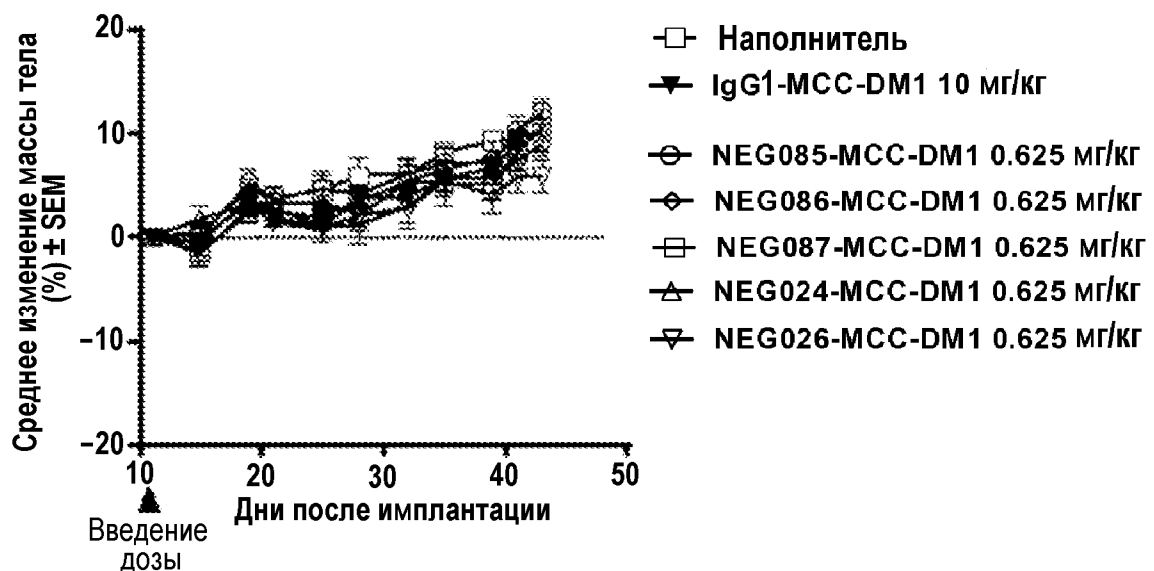
(A) Эффективность при дозе 0,625 мг/кг в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши



(B) Изменение объема опухоли по сравнению с контролем (% T/C)

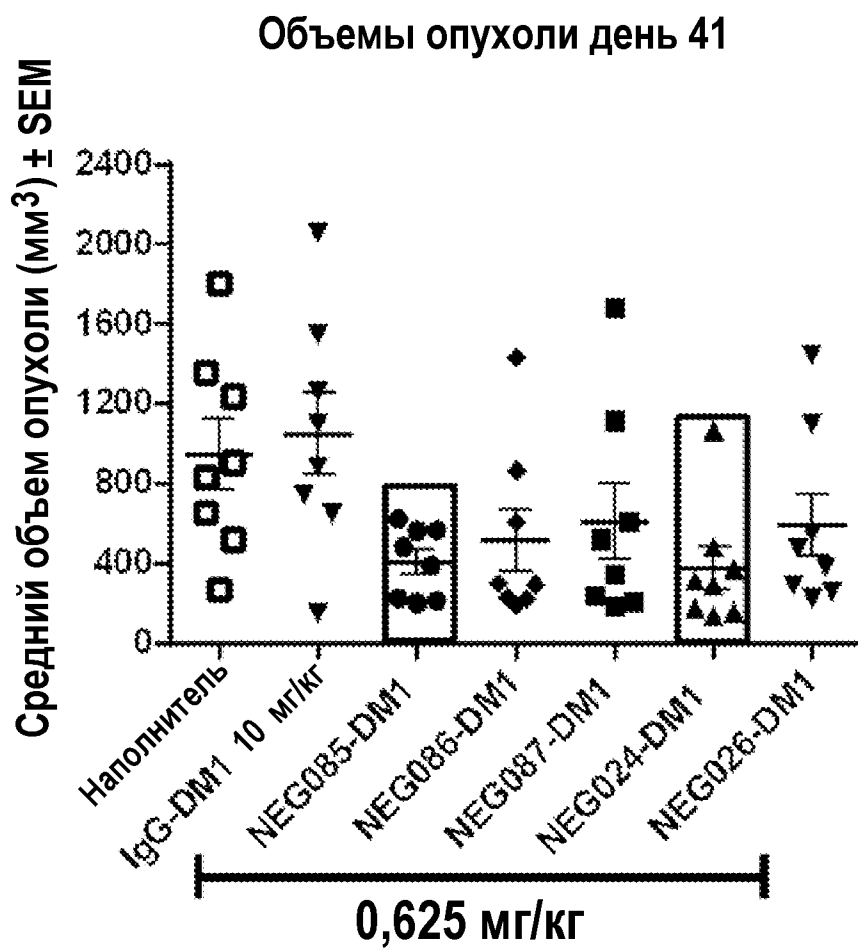
ADC	% $\Delta T/\Delta C$ (D41)
IgG1-DM1	114
NEG085-DM1	28
NEG086-DM1	43
NEG087-DM1	56
NEG024-DM1	23
NEG026-DM1	54

(C) Изменение массы тела в течение лечения



ФИГ.28

День 41 после введения однократной дозы ADC против c-Kit
в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши



ФИГ.29

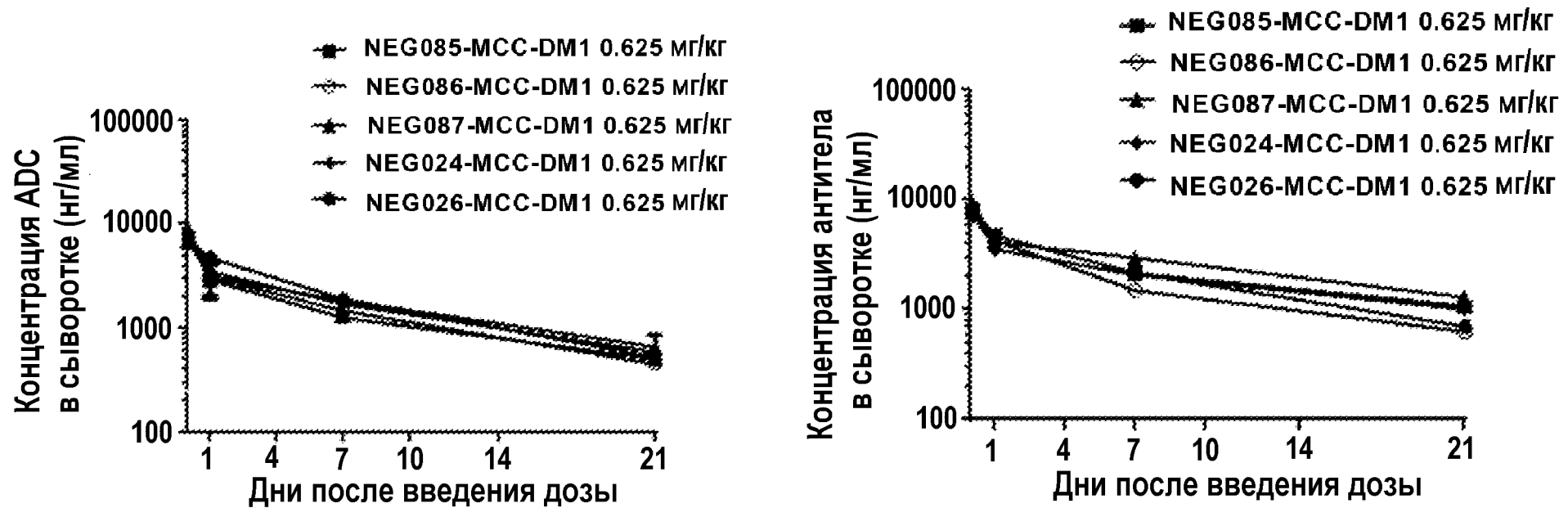
Исследование эффективности ADC против c-Kit (низкой дозы) в модели GIST T1 у мышей SCID-beige

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	757 ± 175	9.3 ± 1.0	8/8
IgG-SMCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	114	861 ± 206	9.1 ± 1.0	8/8
NEG085-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	28	210 ± 56	10.3 ± 1.3	8/8
NEG086-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	43	325 ± 146	7.4 ± 1.4	8/8
NEG087-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	56	423 ± 188	8.4 ± 2.1	8/8
NEG024-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	23	176 ± 104	9.6 ± 2.0	8/8
NEG026-SMCC-DM1	0.625 мг/кг	однократная i.v. доза	54	410 ± 166	5.7 ± 1.4	8/8

ФИГ.30

(A) PK антитела против c-Kit в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (левая панель представляет собой ELISA с антителом против DM1)

(B) Правая панель представляет собой ELISA с антителом против IgG1



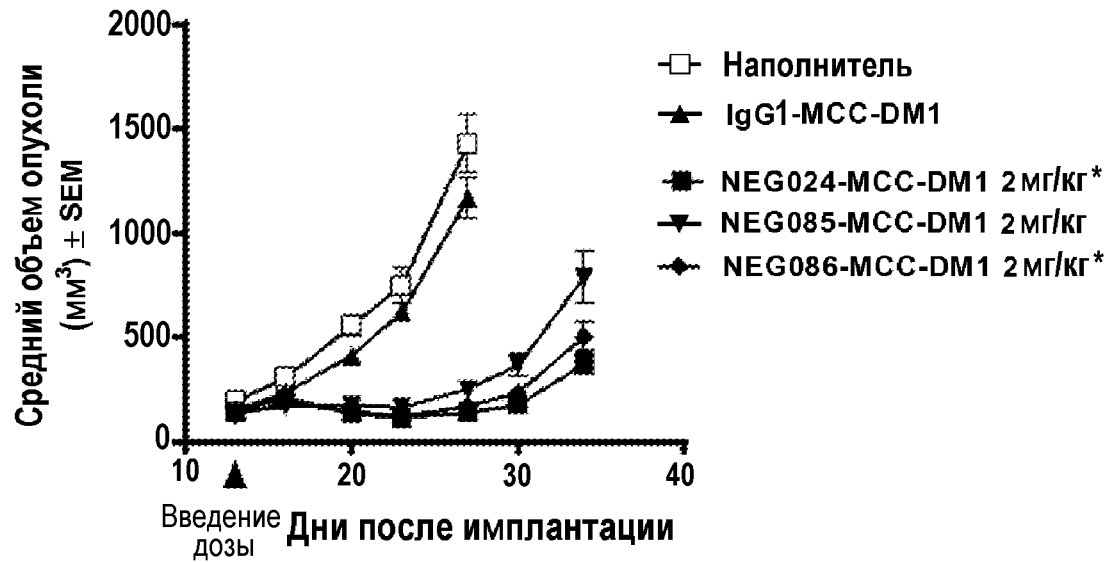
ФИГ.31

(A) Активность NEG085, NEG024 и NEG086 в модели SCLC

(B) Изменение массы тела в течение лечения

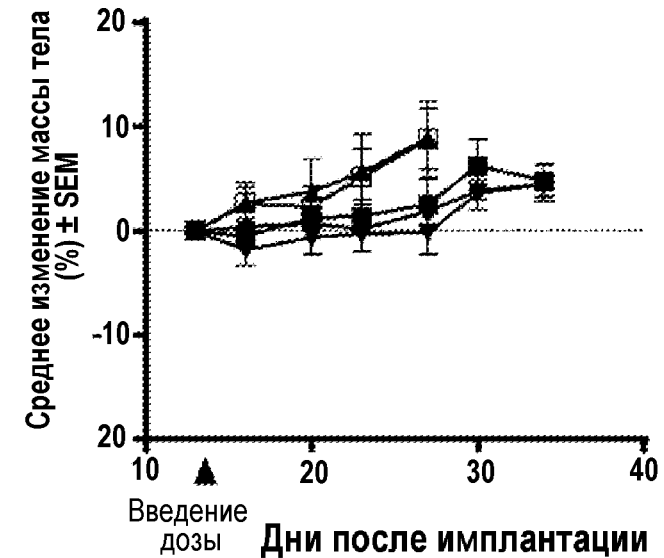
(C) Экспрессия c-Kit в образце опухоли

Эффективность в модели SCLC NCI-H1048

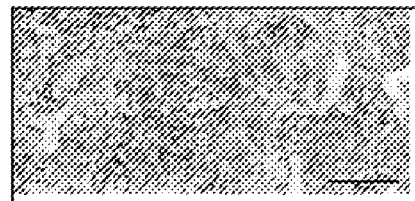


*P<0.05, ANOVA/LSD-метод Фишера

Масса тела



Экспрессия c-Kit в NCI-H1048



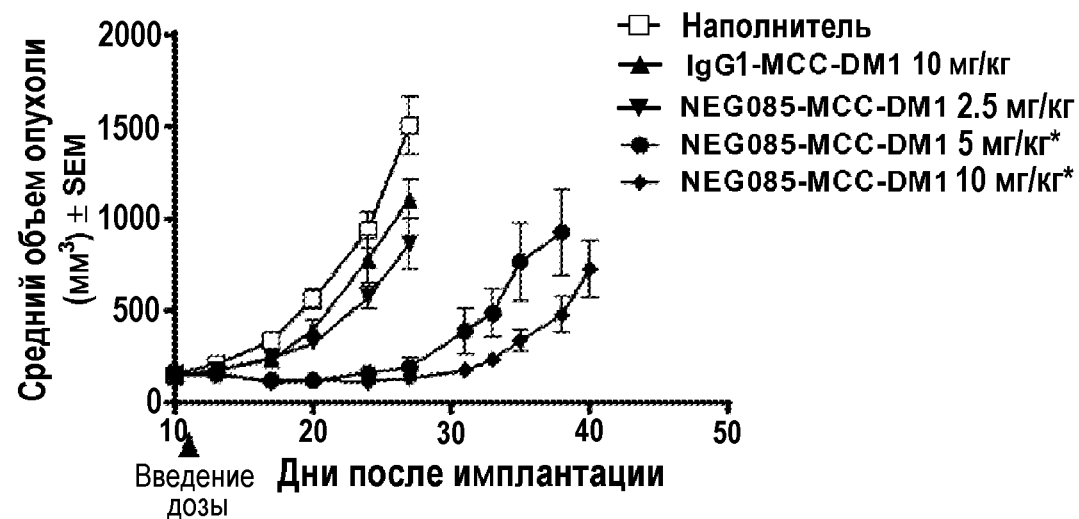
ФИГ.32

Исследование эффективности ADC против c-Kit в SCLC NCI-H1048

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Наполнитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	1234 ± 125	8.8 ± 3.7	8/8
IgG1-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	82	-	1013 ± 91	8.8 ± 2.9	8/8
NEG024-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-2.16*	-3 ± 18	2.5 ± 2.4	8/8
NEG085-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	9	-	114 ± 42	-0.2 ± 2.1	8/8
NEG086-MCC-DM1	2 мг/кг	однократная i.v. доза	4*	-	44 ± 22	1.8 ± 0.7	8/8

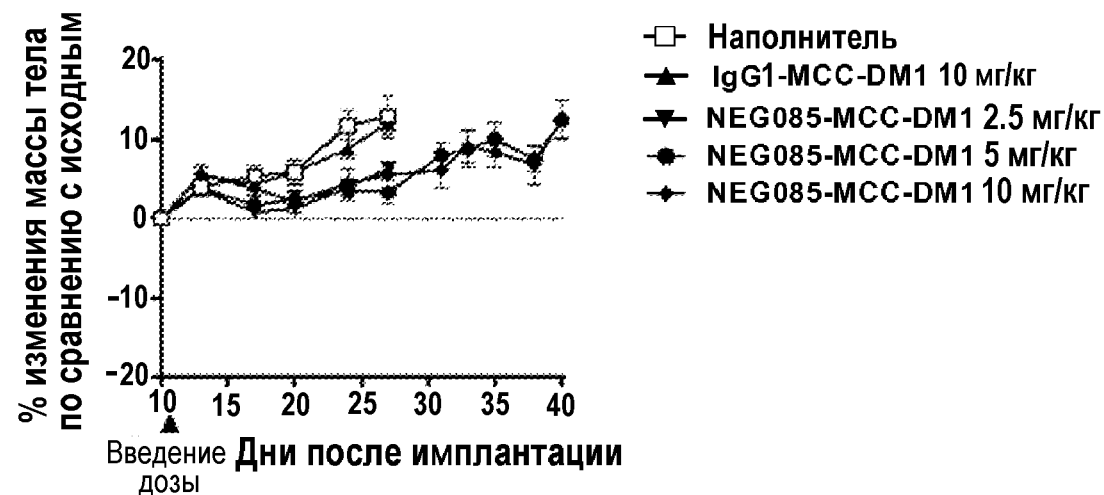
ФИГ.33

(A) Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC)



*P<0.05, ANOVA/тест Тьюки

(B) Изменение массы тела в течение лечения



ФИГ.34

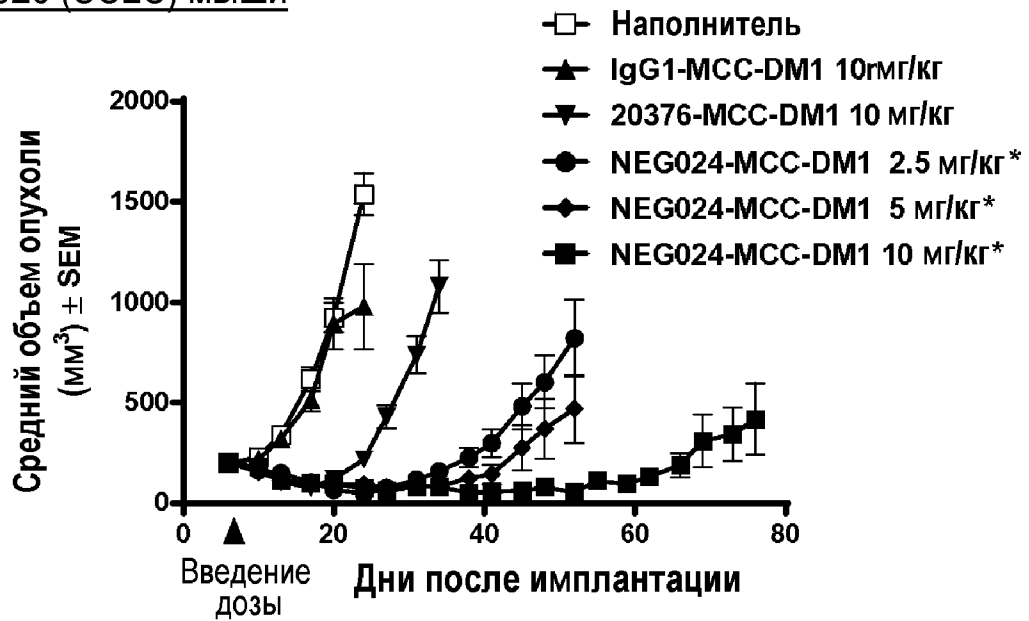
Исследование эффективности NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H1048 (SCLC) мыши

Таблица данных для дня 27

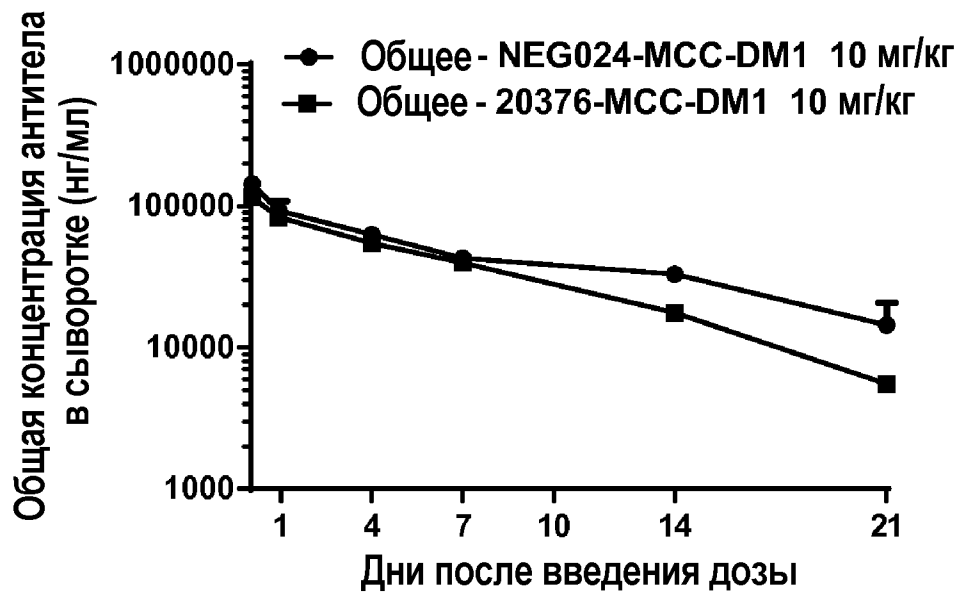
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	–	1347 ± 164	12.9 ± 2.6	8/8
IgG1–MCC–DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	72	–	963 ± 113	12.0 ± 1.3	8/8
NEG085–MCC–DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	53	–	716 ± 141	6.3 ± 1.7	8/8
NEG085–MCC–DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	3*	–	37 ± 55	6.0 ± 1.8	8/8
NEG085–MCC–DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	–	–14.92*	–23 ± 14	5.5 ± 1.7	8/8

ФИГ.35

(А) Эффективность 20376 и NEG024 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLC) мыши

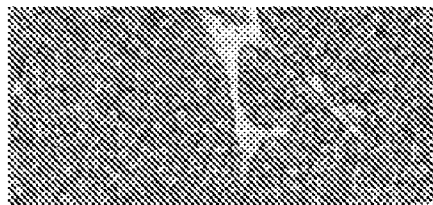


(В) Концентрация антитела в сыворотке после введения дозы



(С) ИHC для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли H526

ИHC c-Kit в опухоли H526



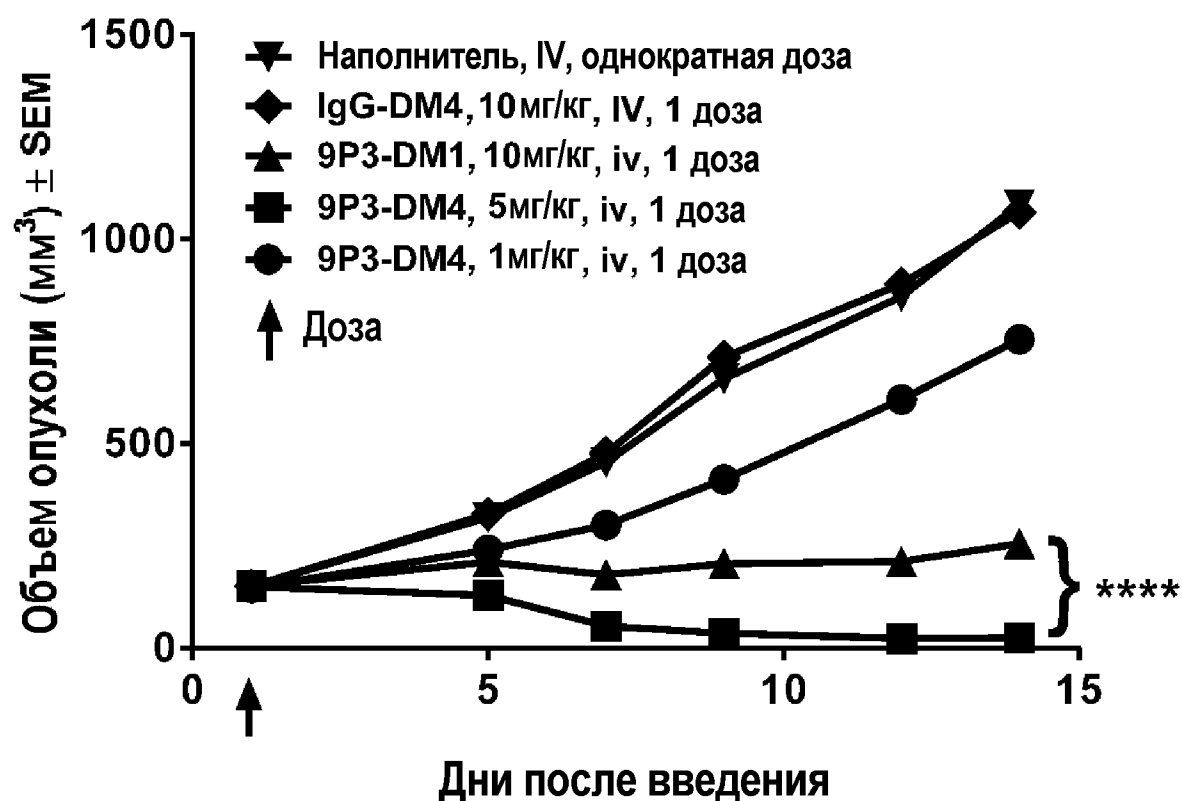
ФИГ.36

ADC против c-Kit в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких (SCLC) (*p < 0,05, ANOVA/метод Данна)

Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
TBS	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	1338±107	13.5 ± 3.6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	57	-	766±208	6.6 ± 0.7	9/9
20376-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	1	-	18±28	4.1 ± 1.9	9/9
NEG024-MCC-DM1	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-76.14*	-148±17	3.0 ± 1.1	9/9
NEG024-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-52.94*	-106±15	3.3 ± 1.1	9/9
NEG024-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-63.04*	-123±14	-0.1 ± 2.2	9/9

ФИГ.37

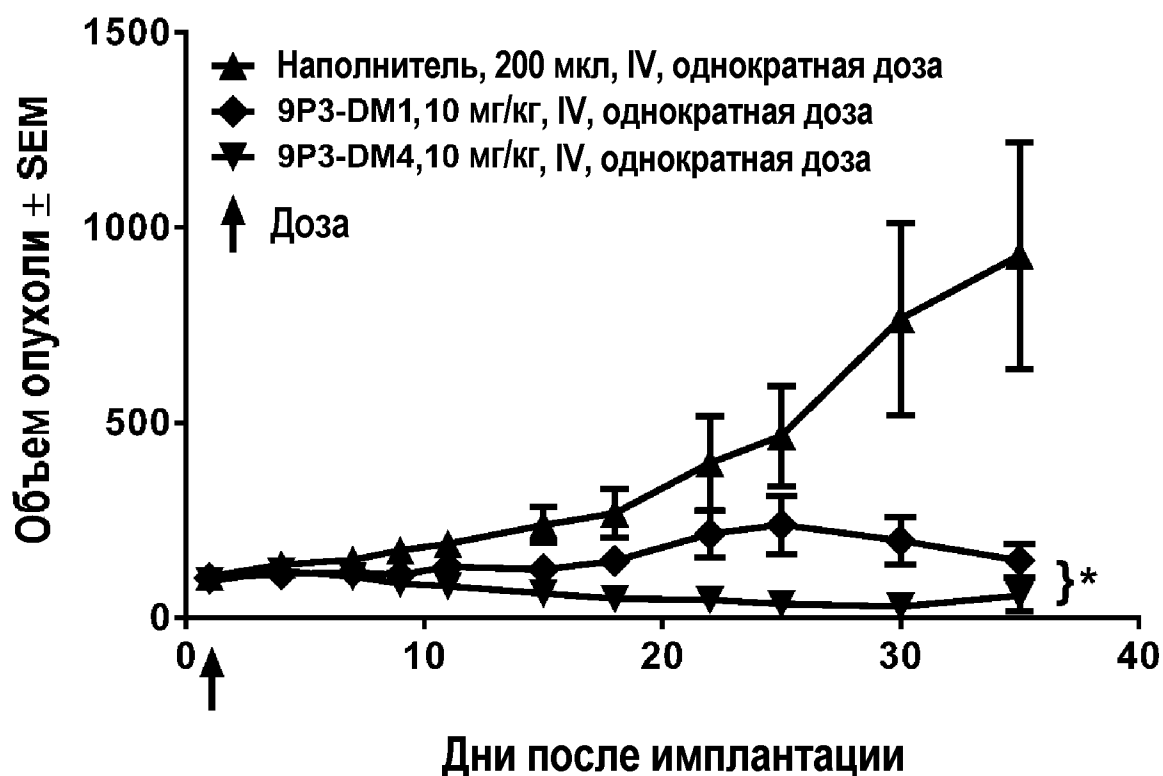
Эффективность в модели ксенотрансплантата AML (Kasumi-1)



Контроль по сравнению с исследуемыми группами: Значимые различия измеряли с использованием одностороннего ANOVA, апостериорного теста множественных сравнений Тьюки, (**** $p < 0,0001$)

ФИГ.38

Эффективность в модели ксенотрансплантата мастоцитоза НМС-1 мыши

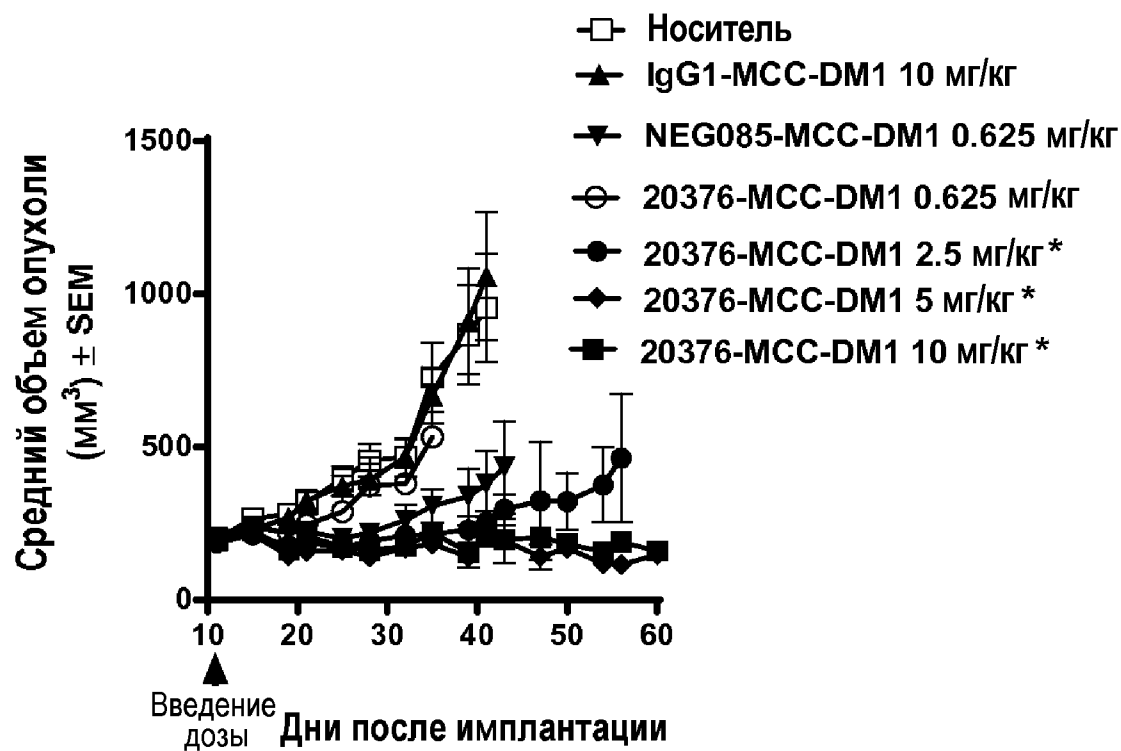


Контроль по сравнению с исследуемыми группами: Значимые различия измеряли с использованием одностороннего ANOVA, апостериорного теста множественных сравнений Тьюки, (* $p < 0,05$)

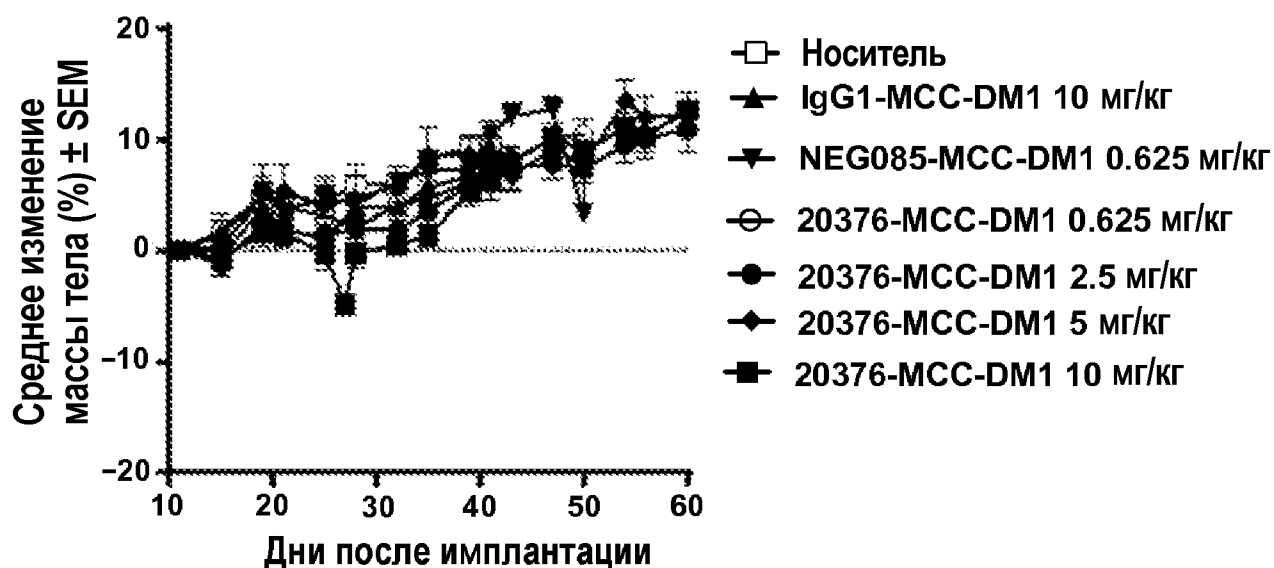
ФИГ.39

Эффективность перекрестно реагирующего 20376-MCC-DM1 мыши в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши

A – Дозировка и объем опухоли

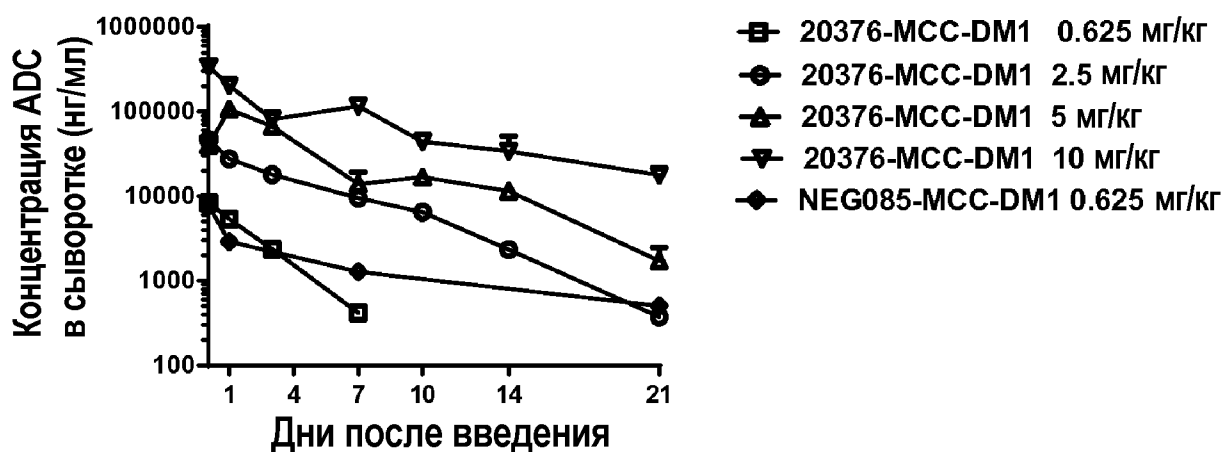


B – Изменение массы тела в течение лечения

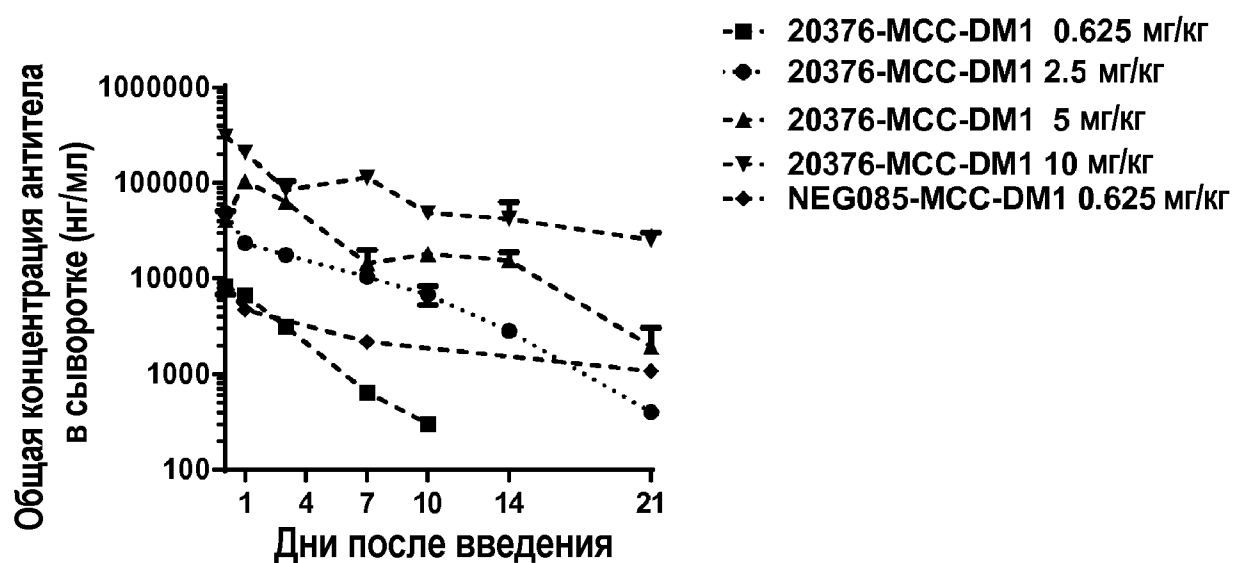


ФИГ.40

(А) Эффективность перекрестно реагирующего 20376-MCC-DM1 мыши в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши – РК



(В) Концентрация антитела в сыворотке после введения



ФИГ.41

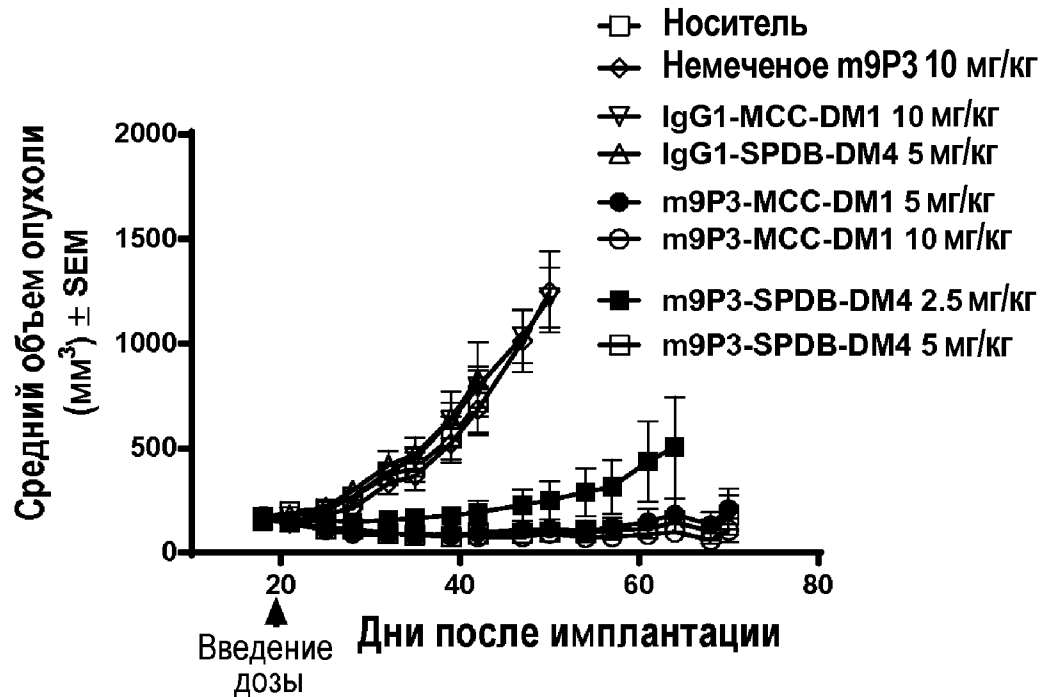
Исследование дозозависимой эффективности в GIST T1 у мышей SCID-beige (таблица данных 41)

Таблица данных для дня 27

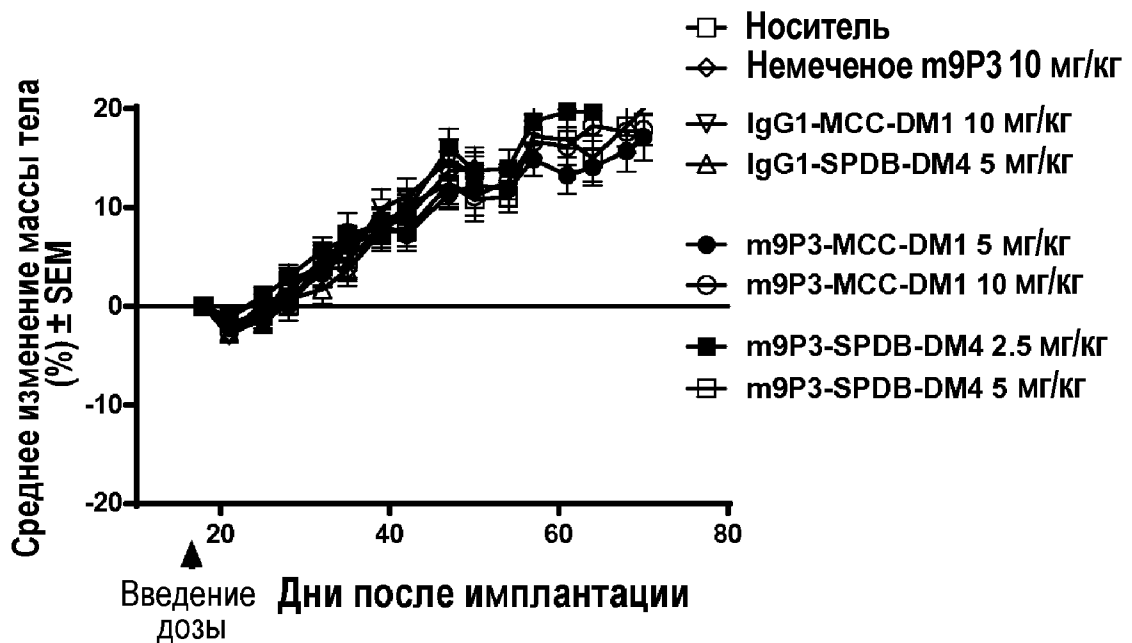
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли		Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0 мг/кг	однократная IV доза	100	757 ± 175	9.3 ± 1.0	8/8
IgG–SMCC–DM1	10 мг/кг	однократная IV доза	114	861 ± 206	9.1 ± 1.0	8/8
NEG085–SMCC–DM1	0.625 мг/кг	однократная IV доза	28	210 ± 56	10.3 ± 1.3	8/8
20376–SMCC–DM1	0.625 мг/кг	однократная IV доза	51	385 ± 106	8.1 ± 1.0	8/9 (одну мышь исключали из исследования)
20376–SMCC–DM1	2.5 мг/кг	однократная IV доза	9*	66 ± 41	7.2 ± 1.6	9/9
20376–SMCC–DM1	5 мг/кг	однократная IV доза	4*	34 ± 62	7.5 ± 1.2	9/9
20376–SMCC–DM1	10 мг/кг	однократная IV доза	3*	22 ± 16	6.1 ± 1.5	8/9 (одну мышь исключали из исследования)

ФИГ.42

(А) Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши
(не наблюдали эффективность при использовании неконъюгированного антитела)



(В) Изменение массы тела в течение лечения



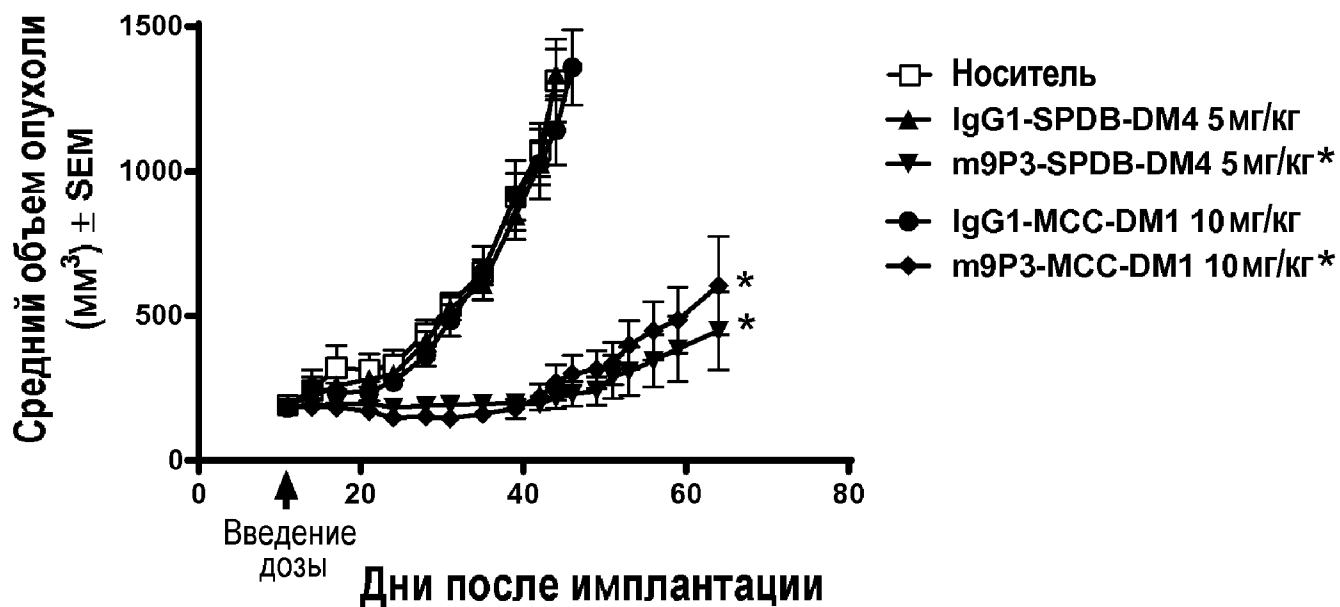
ФИГ.43

Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST T1 мыши (немеченое/MCC-DM1/SPDB-DM4)
(Таблица данных для дня 42, $p < 0,05$, ANOVA/тест Тьюки)

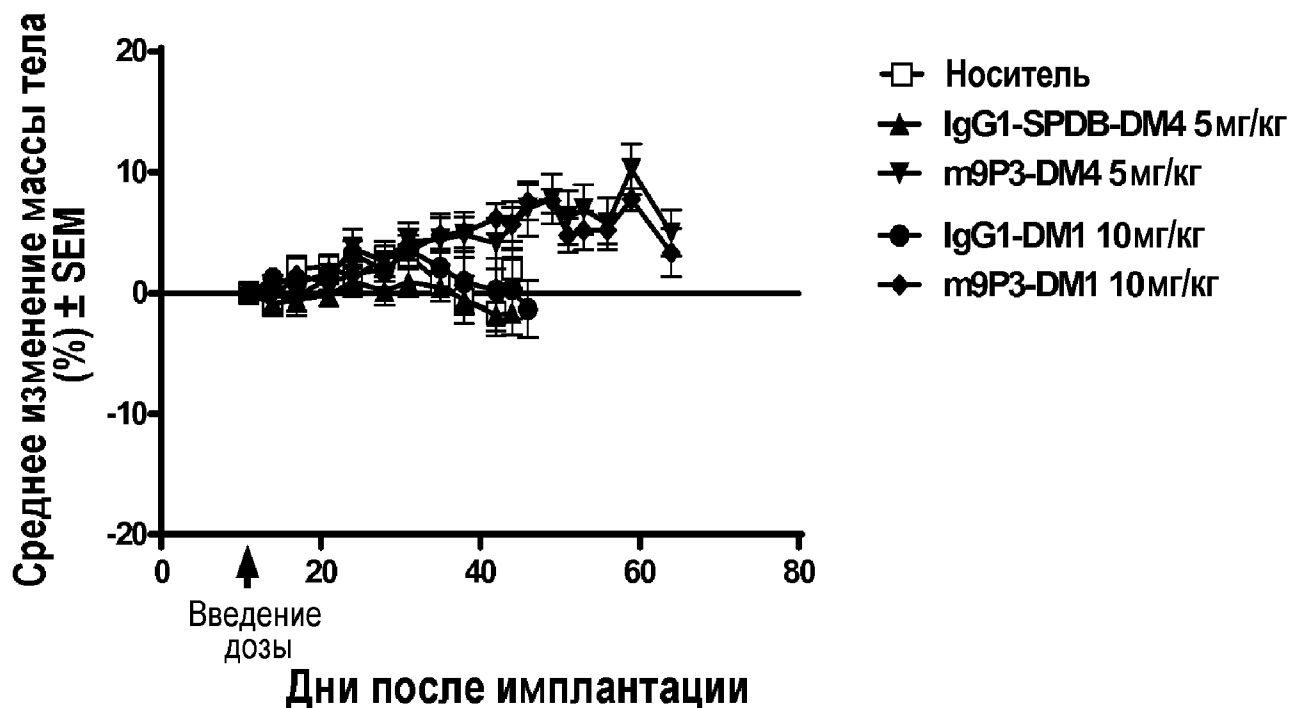
Лекарственное средство	Доза	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (T/C) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$)	Среднее изменение массы тела ($\% \pm \text{SEM}$)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0 мг/кг	однократная i.v. доза	100	-	554 ± 148	9.5 ± 2.2	8/8
Немеченое 9P3	10 мг/кг	однократная i.v. доза	95	-	525 ± 103	9.0 ± 1.9	8/8
IgG1-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	113	-	624 ± 96	11.1 ± 1.9	9/9
IgG1-SPDB-DM4	10 мг/кг	однократная i.v. доза	119	-	657 ± 176	10.0 ± 1.3	9/9
9P3-MCC-DM1	10 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-55.80	-97 ± 23	10.2 ± 1.1	9/9
9P3-MCC-DM1	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-43.84	-74 ± 28	7.2 ± 1.1	9/9
9P3-SPDB-DM4	5 мг/кг	однократная i.v. доза	-	-43.24	-67 ± 14	7.6 ± 2.0	9/9
9P3-SPDB-DM4	2.5 мг/кг	однократная i.v. доза	7	-	36 ± 58	9.6 ± 1.6	9/9

ФИГ.44

(А) Эффективность в модели ксенотрансплантата GIST 430
при сравнении SPDB-DM4 и MCC-DM1



(В) Изменение массы тела в течение лечения



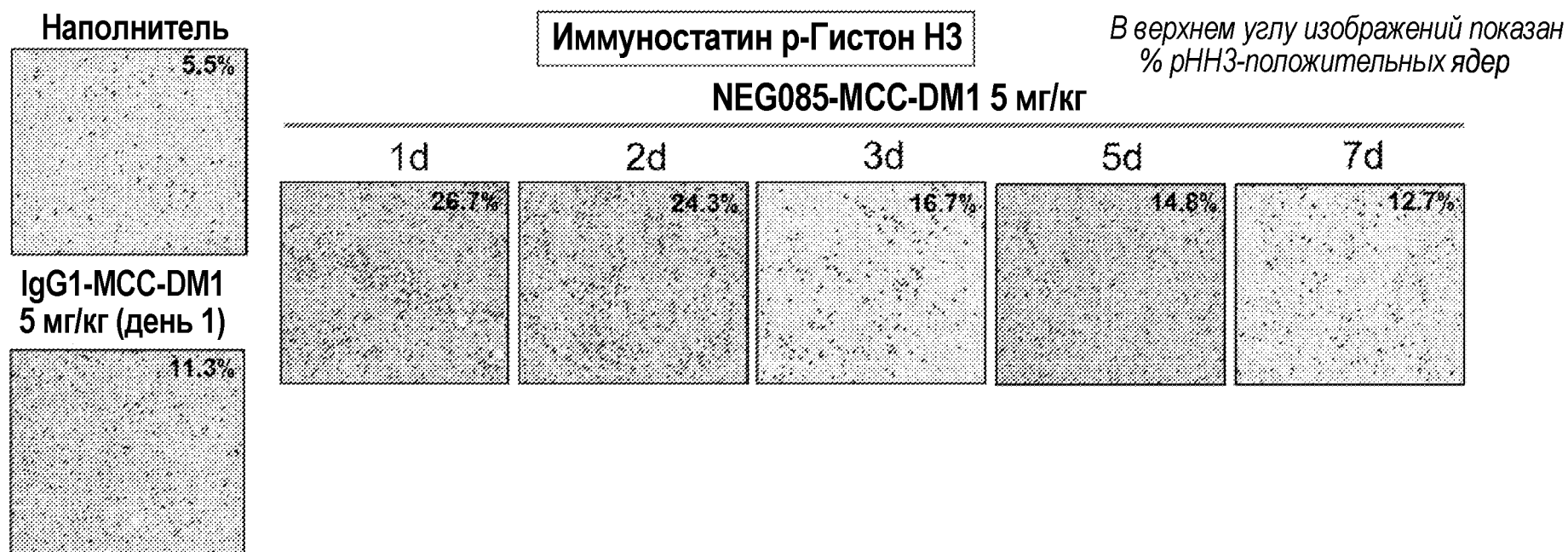
ФИГ.45

Эффективность в модели GIST430 мыши SCID-beige

Лекарственное средство	Доза (мг/кг)	Схема	Ответ опухоли			Ответ реципиента	
			Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (Т/С) (%)	Регрессирование (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± SEM)	Среднее изменение массы тела (% ± SEM)	Выживаемость (выжившие/общее количество)
Носитель	0	однократная i.v. доза	100	-	1127 ± 161	2.1 ± 1.7	8/9 (кахексия с опухолями более крупного размера)
IgG1-SPDB-DM4	5	однократная i.v. доза	101	-	1139 ± 91	-1.6 ± 1.9	9/9
9P3-SPDB-DM4	5	однократная i.v. доза	3*	-	34 ± 38	5.6 ± 2.0	9/9
IgG1-MCC-DM1	10	однократная i.v. доза	85	-	959 ± 112	0.3 ± 2.5	9/9
9P3-MCC-DM1	10	однократная i.v. доза	7*	-(22% в день 24)	80 ± 51	5.7 ± 1.4	9/9

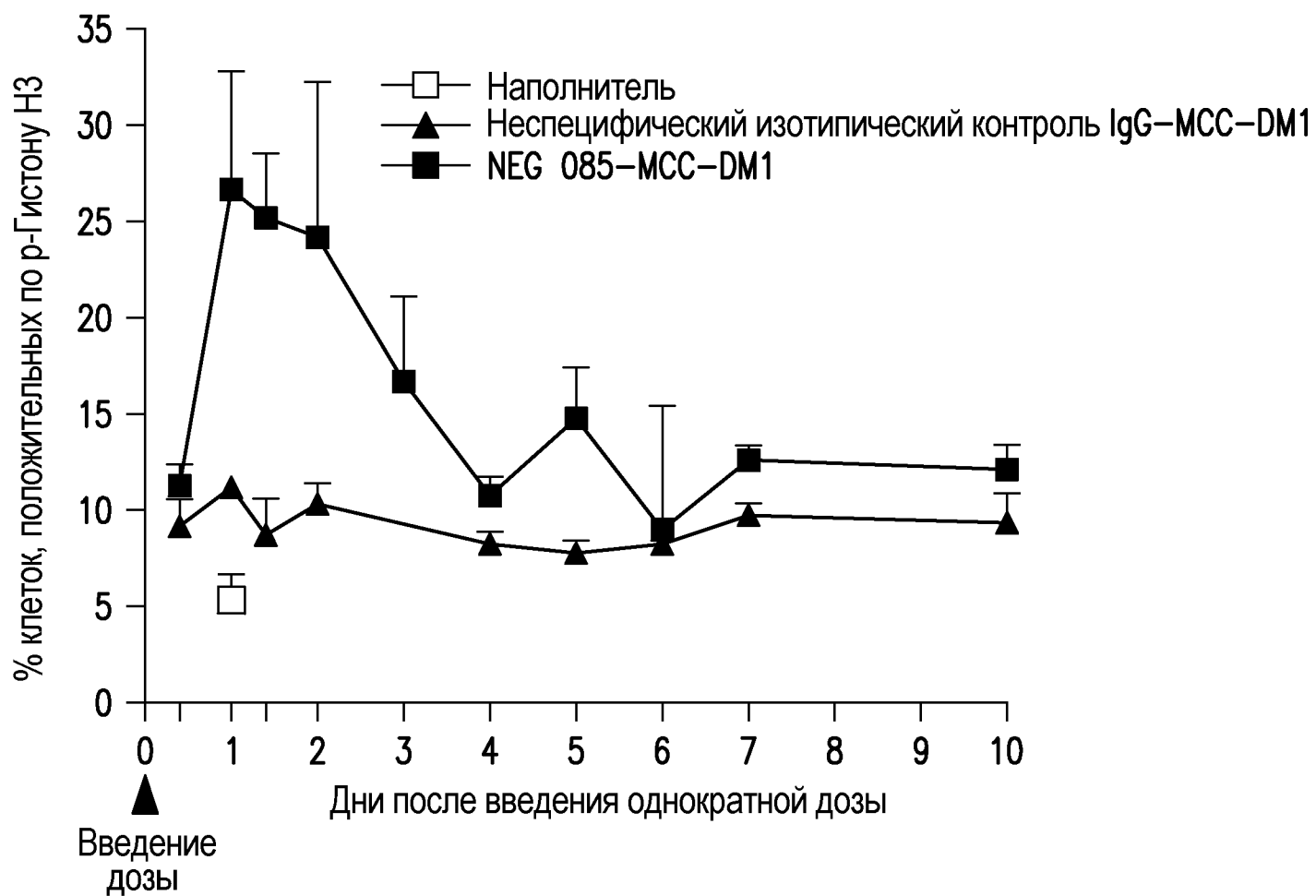
ФИГ.46

Митотический блок (p-Гистон H3) после однократной дозы ADC против c-Kit NEG085-MCC-DM1



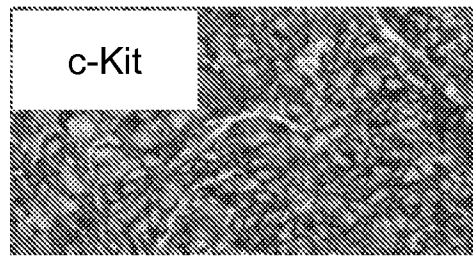
ФИГ.47

Митотический блок (p-Гистон H3) через 10 дней после однократной дозы ADC
против c-Kit NEG085-MCC-DM1



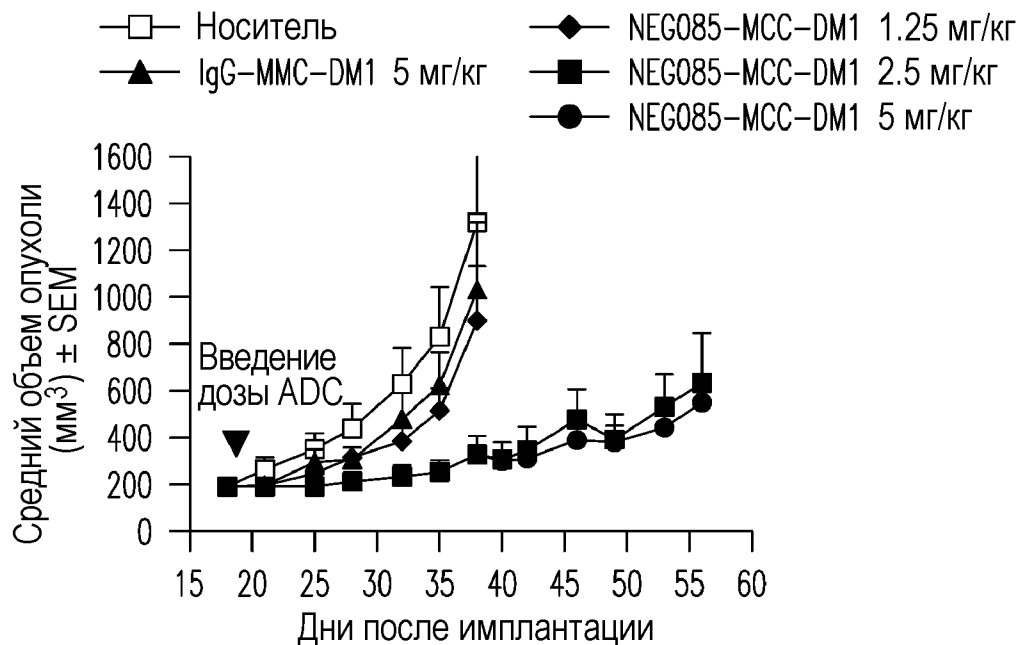
ФИГ.48А

ИНС для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли GIST T1



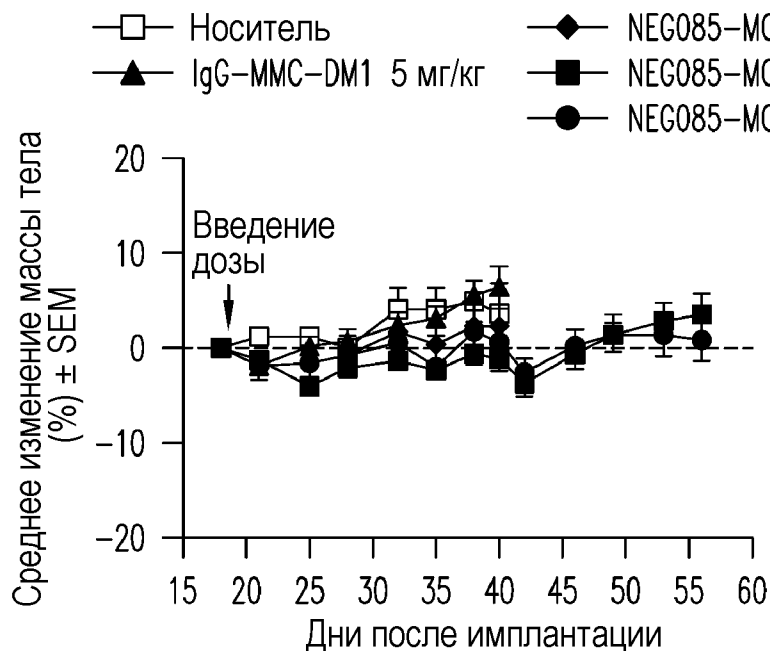
ФИГ.48В

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST T1



ФИГ.48С

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1



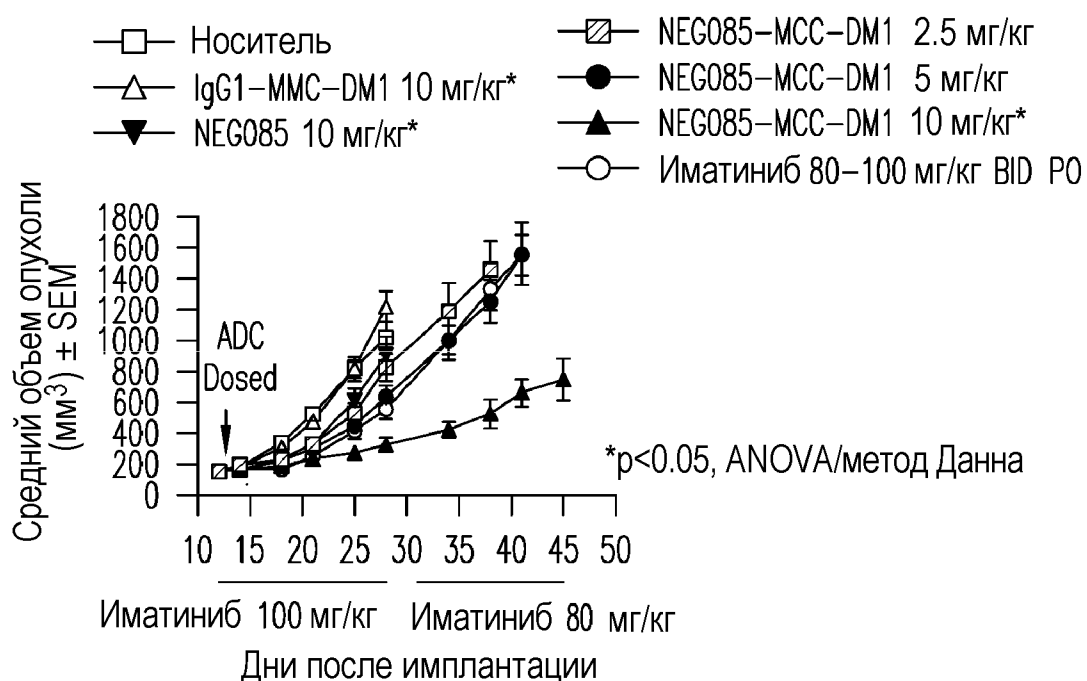
ФИГ.49А

ИНС для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли GIST430



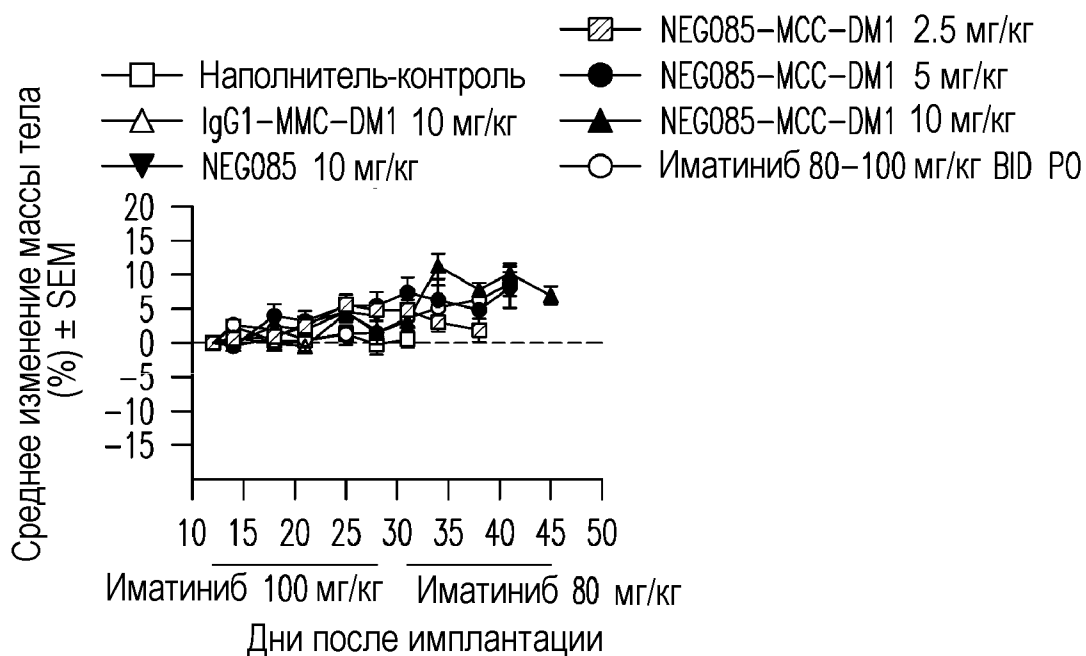
ФИГ.49В

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата GIST430



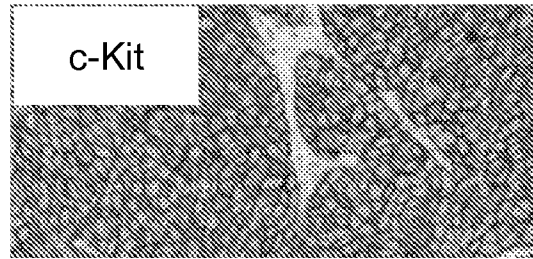
ФИГ.49С

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1



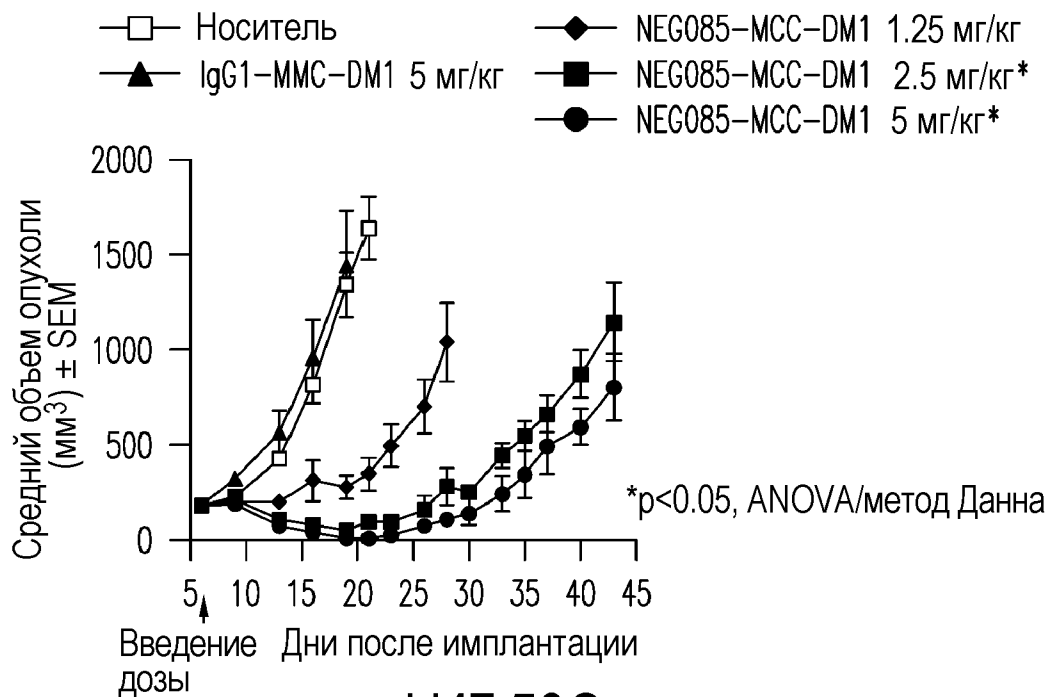
ФИГ.50А

IHC для c-Kit демонстрирует экспрессию уровней c-Kit в опухоли NCI-H526



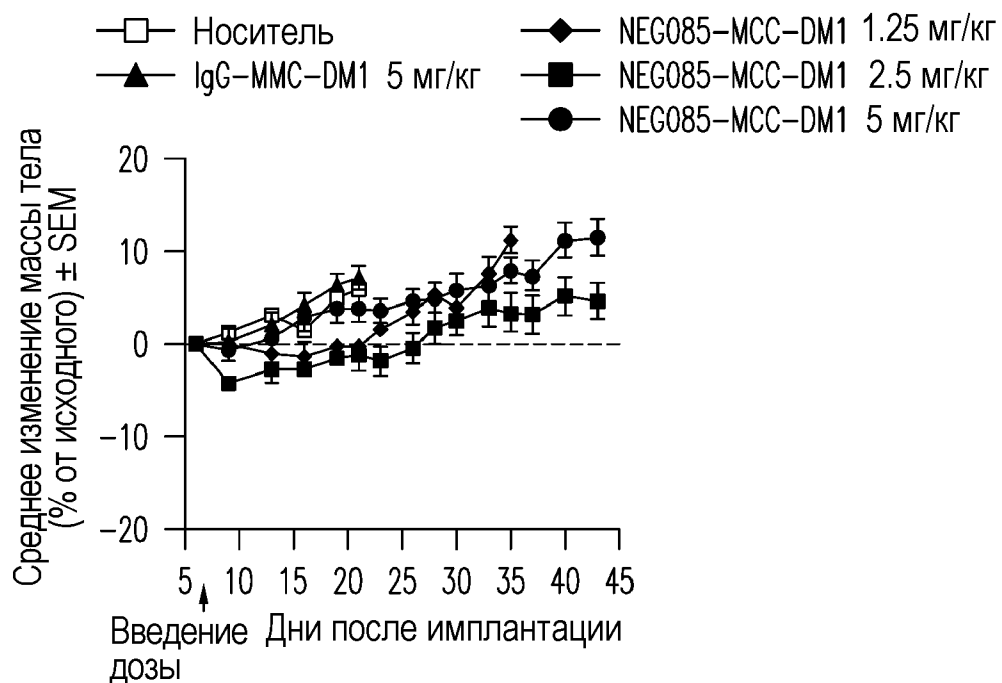
ФИГ.50В

Ответ на дозу NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата NCI-H526 (SCLS)



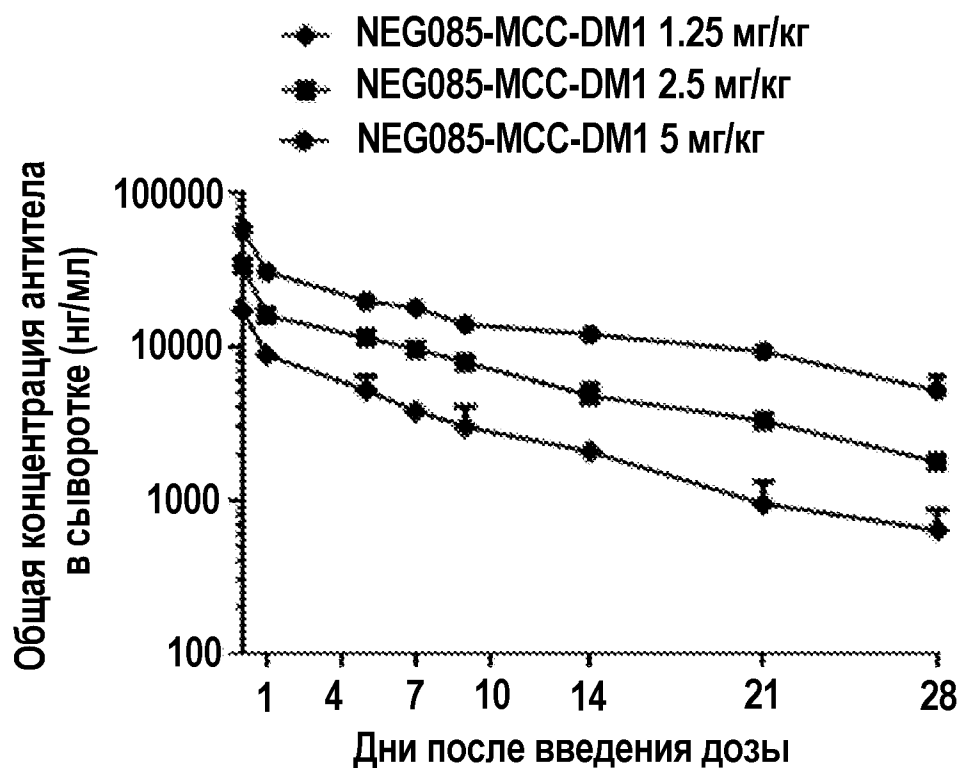
ФИГ.50С

Изменение массы тела в течение лечения NEG085-MCC-DM1

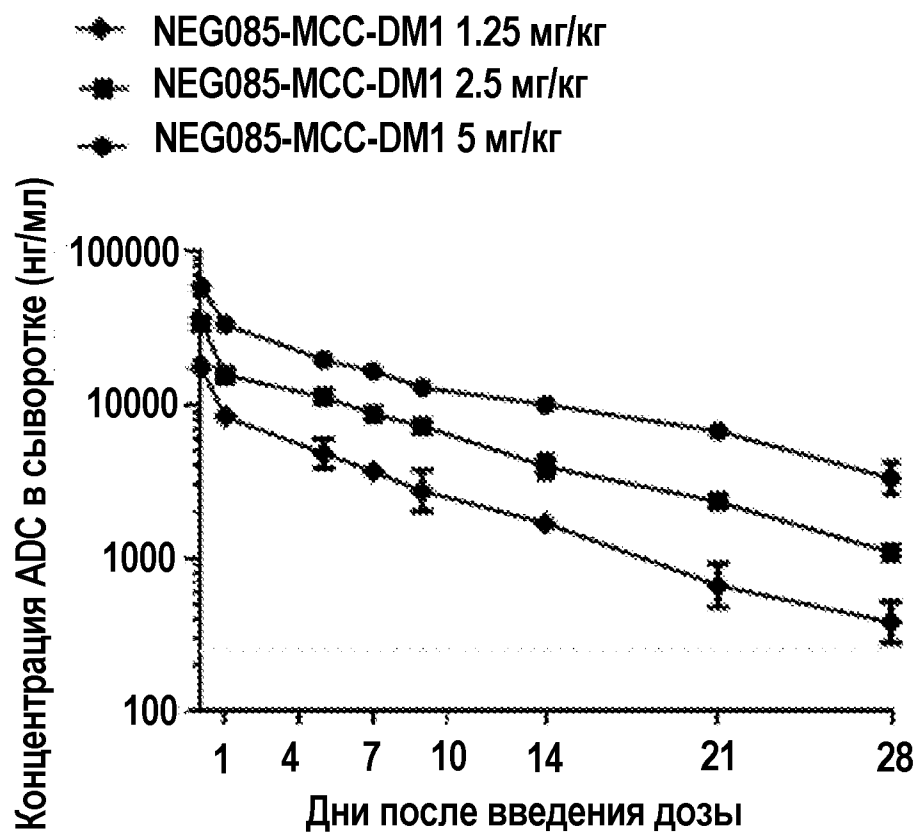


ФИГ.51

(A) ELISA с антителом против IgG1 человека после введения дозы в модели ксенотрансплантата NCI-H526

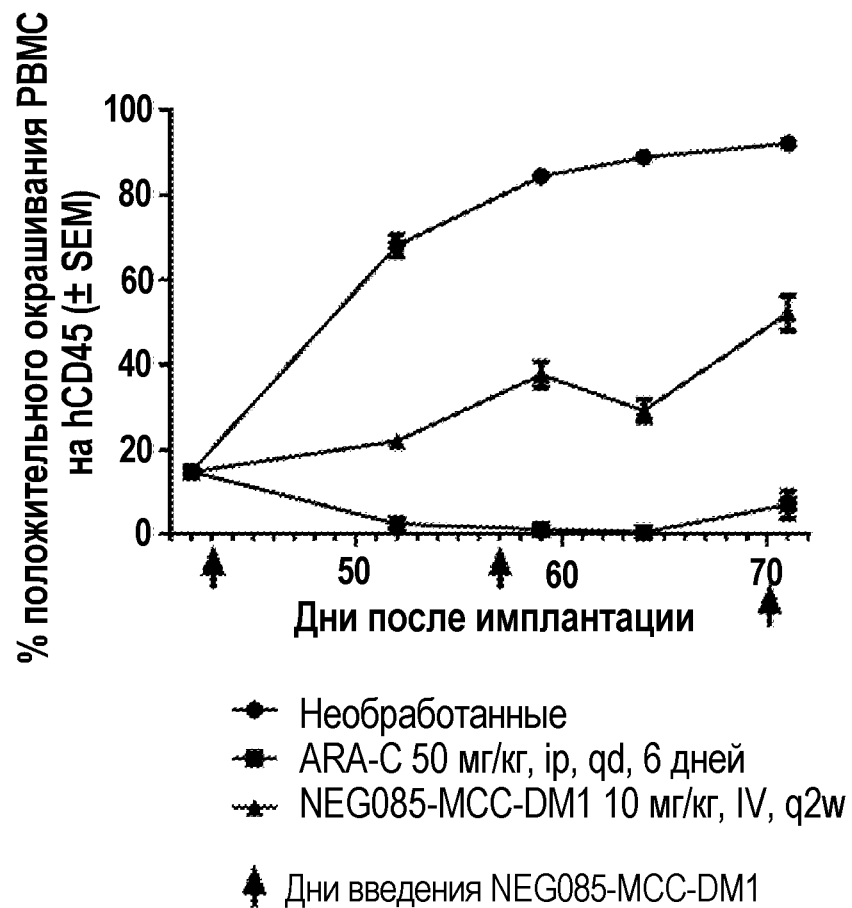


(B) ELISA с антителом против DM1 после введения дозы в модели ксенотрансплантата NCI-H526

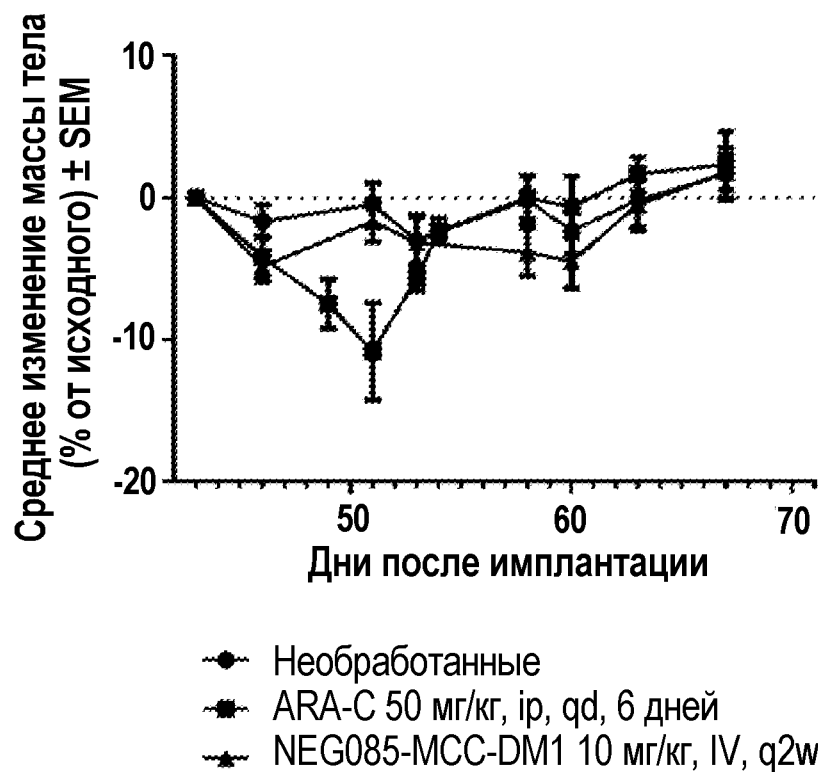


ФИГ.52

(А) Ответ на NEG085-MCC-DM1 в модели ксенотрансплантата HAMLX5343 системного первичного AML



(В) Изменение массы тела в течение лечения



ФИГ.53

Представление 3,1-Å кристаллической структуры комплекса D1-D2 Kit/Fab NEG085, на котором показаны тяжелые цепи Fab (темно-серым), легкие цепи Fab (белым) и домены D1-D2 Kit (светло-серым). Эпитопы и паратопы закрашены черным.

