

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201691824** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.12.30

(22) Дата подачи заявки
2015.03.10

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ EGFRvIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/950,963

(32) 2014.03.11

(33) US

(86) PCT/US2015/019722

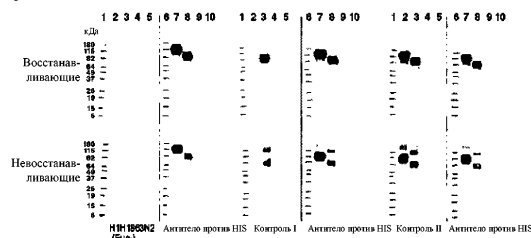
(87) WO 2015/138460 2015.09.17

(71) Заявитель:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Кишнер Джессика Р., Макдоналд
Дуглас, Терстон Гэвин, Мартин Джоэл
Х., Делфино Франк, Ниттоли Томас,
Келли Маркус (US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Угрюмов В.М., Лыгу
Т.Н., Глухарёва А.О., Дементьев В.Н.,
Клюкин В.А., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с вариантом класса III EGFR (EGFRvIII), и к способам их применения. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением связываются с человеческим EGFRvIII с высокой аффинностью. Антителами в соответствии с настоящим изобретением могут быть полностью человеческие антитела. Настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII, конъюгированным с цитотоксическим средством, радионуклидом или другим фрагментом, негативно влияющим на рост или пролиферацию клеток. Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения различных злокачественных опухолей.



A1

201691824

201691824

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ EGFRvIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые специфично связываются с делеционными мутантами человеческого рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), в частности, с делеционным мутантом класса III EGFRvIII, а также к терапевтическим и диагностическим способам использования таких антител.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Надэкспрессию и/или амплификацию гена рецептора эпидермального фактора роста (EGF) или EGFR регистрировали во многих опухолях человека, в том числе в опухолях молочной железы, яичника, мочевого пузыря, головного мозга и в различных плоскоклеточных карциномах (Wong, A.J. *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6899-6903; Harris *et al.*, 1992, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 11:181-187). Однако нацеливание на EGFR в качестве способа противоопухолевой терапии было проблематичным, поскольку многие нормальные ткани также экспрессируют этот рецептор и могут стать мишенями наряду с опухолевыми целями. Между тем, сообщалось, что многие глиобластомы с амплификацией гена EGFR часто содержат перестройку гена (Ekstrand, A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4309-4313; Wong A.J. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2965-2969). В одном исследовании выяснили, что 17 из 44 глиобластом имеют одну или несколько альтераций в кодирующей последовательности EGFR, и во всех этих случаях наблюдали амплифицированный EGFR, тогда как ни в одном из 22 случаев без амплификации гена не наблюдали какие-либо опухолеспецифические аномалии последовательности (Frederick, L. *et al.*, 2000, *Cancer Res* 60:1383-1387). То же исследование также показало, что несколько типов мутаций EGFR могут быть выявлены в отдельных опухолях.

Вариант класса III EGFR (EGFRvIII) является наиболее часто встречающимся вариантом EGFR в глиобластоме (Bigner *et al.*, 1990, *Cancer Res* 50:8017-8022; Humphrey *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4207-4211; Yamazaki *et al.*, 1990, *Jap J Cancer Res* 81:773-779; Ekstrand *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4309-4313; Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:3140-3148; и Frederick *et al.*, 2000, *Cancer Res*

60:1383-1387). EGFRvIII характеризуется делецией экзонов 2-7 гена EGFR, приводящей к делеции внутри рамки 801 пары оснований кодирующей области, т.е. к делеции 6-273 аминокислотных остатков (из числа остатков зрелого EGFR), а также к образованию нового глицина в точке слияния (Humphrey *et al.*, 1988, *Cancer Res* 48:2231-2238; Yamazaki *et al.*, 1990, выше). Было показано, что EGFRvIII обладает лиганд-независимой активностью слабой, но постоянно активной киназы, а также усиленной онкогенностью (Nishikawa *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7727-7731; и Batra *et al.*, 1995, *Cell Growth and Differentiation* 6:1251-1259). Кроме глиом EGFRvIII выявили при протоковой и внутрипротоковой карциноме молочной железы (Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:3140-3148), немелкоклеточных карциномах легкого (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *Cancer Res* 53:3217-3220), карциномах яичника (Moscatello *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:5536-5539), злокачественной опухоли предстательной железы (Olapade-Olaopa *et al.*, 2000, *British J Cancer* 82:186-194) и плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Tinhofer *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17(15):5197-5204). Эти и другие исследования показывают, что нормальные ткани, наоборот, не экспрессируют EGFRvIII (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, выше; Wikstrand *et al.*, 1995, выше; и Wikstrand *et al.*, 1998, *J Neuro Virol* 4:148-158). Высокоопухолеспецифическая природа EGFRvIII делает его особенно привлекательной целью для лечения злокачественных опухолей и опухолей, которые экспрессируют данную молекулу.

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот человеческого EGFR показаны в SEQ ID NO: 145 и 146, соответственно, а аминокислотная последовательность EGFRvIII показана в SEQ ID NO: 147. Антитела против EGFRvIII описываются, например, в патентах США №№ 5212290, 7736644, 7589180 и 7767792.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с EGFRvIII. Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы, *inter alia*, для нацеливания на клетки опухоли, которые экспрессируют EGFRvIII. Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением и их антигенсвязывающие части могут быть использованы отдельно в немодифицированной форме или могут быть включены как часть конъюгата антитело-лекарственное средство или биспецифического антитела.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть

непроцессированными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), а могут быть модифицированными с изменением функциональных свойств, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Типичные антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением приведены в таблицах 1 и 2 в настоящем документе. В таблице 1 приводятся идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител против EGFRvIII. В таблице 2 приводятся идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот для HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител против EGFRvIII.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления

настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом типичном антителе против EGFRvIII, приведенном в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из 2/20, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122 и 130/138.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом типичном антителе против EGFRvIII, приведенном в таблице 1.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом типичном антителе против EGFRvIII, приведенном в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, выбранный из группы, состоящей из 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128 и 132-134-136-140-142-144.

Согласно родственному варианту осуществления настоящее изобретение

относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим ряд из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из типичных антител против EGFRvIII, приведенных в таблице 1. Например, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с EGFRvIII, содержащим ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из 18/26; 66/74; 274/282; 290/298 и 370/378. Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в конкретных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Типичные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение по Kabat основывается на изменчивости последовательностей, определение по Chothia основывается на расположении областей структурных петель, а определение AbM является сочетанием подходов Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также пригодны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против EGFRvIII или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты,

кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой

кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в таблице 1; согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, приведенной в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, при этом HCVR содержит ряд из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом ряд аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 определяется любым из типичных антител против EGFRvIII, приведенных в таблице 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, при этом LCVR содержит ряд из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом ряд аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 определяется любым из типичных антител против EGFRvIII, приведенных в таблице 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, и при этом LCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в

таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним, и полинуклеотидную последовательность, выбранную любых последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в таблице 2, или по сути подобной им последовательности, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей по отношению к ним. Согласно некоторым вариантам осуществления в данном аспекте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом как HCVR, так и LCVR происходят из одного и того же антитела против EGFRvIII, приведенного в таблице 1.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий варибельную область тяжелой или легкой цепи антитела против EGFRvIII. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из вышеупомянутых молекул нуклеиновой кислоты, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблице 1. Также объем настоящего изобретения предусматривает клетки-хозяева, в которые вводятся такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител и извлечение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

Настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII, демонстрирующим паттерн модифицированного гликозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления могут быть полезны модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или антитело без фукозного фрагмента в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции зависимой от антитела клеточной цитотоксичности (ADCC) (см., Shield et al. (2002), JBC 277:26733). При других применениях может быть осуществлена модификация галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент,

которые специфично связываются с EGFRvIII, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, которая является комбинацией антитела против EGFRvIII и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления вторым терапевтическим средством является любое средство, которое успешно объединяется с антителом против EGFRvIII. Настоящее изобретение также относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело против EGFRvIII, конъюгированное с цитотоксическим средством. Типичные комбинации терапевтических средств, совместных составов и ADC, включающих в себя антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением, раскрываются в других разделах настоящего документа.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к терапевтическим способам киллинга опухолевых клеток, или ингибирования, или ослабления роста опухолевых клеток с использованием антитела против EGFRvIII или антигенсвязывающей части антитела в соответствии с настоящим изобретением. Терапевтические способы в данном аспекте настоящего изобретения предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением субъекту при необходимости этого. Подлежащим лечению нарушением является любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предупреждается путем нацеливания на EGFRvIII и/или путем ингибирования опосредованной лигандом клеточной передачи сигнала через EGFRvIII.

Другие варианты осуществления станут очевидны при рассмотрении следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты вестерн-блота EGFR и EGFRvIII с использованием антител против EGFRvIII (т.е. H1H1863N2(Fuc -), контролей I и II на фиг. 1a; и H1H1911, H1H1912 и H1H1915 на фиг. 1b), или антитела против His, при восстанавливающих (верхние панели) и невосстанавливающих (нижние панели) условиях. Дорожки 1 и 6: 10 мкл стандарта BENCHMARK™ (INVITROGEN™); дорожки 2 и 7: 400 нг hEGFR-mmh (SEQ ID NO: 154); дорожки 3 и 8: 400 нг hEGFRvIII-

mmh (SEQ ID NO: 152); и дорожки 4, 5, 9 и 10: промежуток. Контроль I: человеческое антитело против соединительного пептида EGFRvIII (IgG1), раскрытое в патенте США № 7736644; и контроль II: химерное антитело против EGFRvIII/EGFR, раскрытое в патенте США № 7589180.

На фиг. 2 показаны характеристики связывания H1H1863N2(Fuc -). Соединительный пептид EGFRvIII или пептид из остатков 311-326 в EGFR («пептид EGFR311-326 »), каждый из которых был меченным биотином через линкер на С-конце, захватывали покрытыми стрептавидином наконечниками OCTET® на устройстве FORTEBIO® OCTET® RED и осуществляли реагирование с H1H1863N2(Fuc -) или контролями I-III. Контроли I и II: такие же, как и описанные выше; контроль III: гуманизированное антитело против EGFRvIII (hIgG1), раскрытое в публикации заявки на выдачу патента США № 2010/0056762. (□): меченный биотином на С-конце соединительный пептид EGFRvIII (SEQ ID NO: 149); и (■): меченный биотином на С-конце пептид EGFR311-326 (SEQ ID NO: 151).

На фиг. 3 показана интернализация mAb против EGFRvIII клетками HEK293, экспрессирующими EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII). Связанные с клеточной поверхностью антитела против EGFRvIII и контрольные антитела выявляли с помощью конъюгированного с красителем вторичного антитела (Fab); изображения получали при 40х и определяли количество интернализированных везикул. Контроли I и II: такие же, как и описанные выше; и контроль IV: химерные антитела против EGFR, раскрытые в патенте США № 7060808. (□): интернализация при 37°C; и (■): интернализация при 4°C.

На фиг. 4 показаны связывание и интернализация антитела против EGFRvIII H1H1863N2(Fuc -) опухолями B16F10.9 или опухолями B16F10.9, экспрессирующими EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII), которые ксенотрансплантировали мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Связанное с клеточной поверхностью (фиг. 4a) или связанное с клеточной поверхностью и интернализированное (фиг. 4b) антитело против EGFRvIII или изотипическое контрольное антитело выявляли с помощью конъюгированного с аллофикоцианином антитела против человеческого Fc (hFc-APC) с использованием проточной цитометрии. Показаны средние интенсивности флуоресценции (MIF) через 10 минут (□), 4 часа (▒) и 24 часа (■) после инъекции антитела.

На фиг. 5 показаны результаты анализа фармакокинетических параметров для антитела против EGFRvIII H1H1863N2(Fuc +) (фиг. 5d) и контрольных антител (как

описано выше), т.е. контроля I (фиг. 5b), контроля III (фиг. 5c) и контроля IV (фиг. 5a), у мышей дикого типа (●) или мышей, экспрессирующих человеческий EGFR (■).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед прочтением раскрытия настоящего изобретения, следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, так как такие способы и условия могут варьировать. Также следует учитывать, что терминология используется в настоящем документе исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться исключительно прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что обычно известно рядовому специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин «приблизительно» при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может варьировать от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемый в настоящем документе термин «приблизительно 100» включает в себя 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя при осуществлении или тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на выдачу патентов и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определения

Используемый в настоящем документе термин «EGFRvIII» относится к варианту человеческого EGFR класса III с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 147, или к его биологически активному фрагменту, который обладает любыми характеристиками, специфическими для EGFRvIII, в отличие от тех, которые совместно обычно называют EGFR, если конкретно не указано иное. В EGFRvIII отсутствуют аминокислотные остатки от 6 до 273 из зрелого EGFR (т.е. SEQ ID NO:

146 без сигнального пептида, т.е. остатков 1-24) и содержится новый глициновый остаток в положении 6 между аминокислотными остатками 5 и 274.

Все упоминания белков, полипептидов и фрагментов белков в настоящем документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если четко не указано происхождение от видов, отличных от человека. Таким образом, термин «EGFRvIII» означает человеческий EGFRvIII, если четко не указано происхождение от видов, отличных от человека, например, «мышинный EGFRvIII», «EGFRvIII обезьяны» и т.д.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессируемый на клеточной поверхности EGFRvIII» означает один или несколько белков EGFRvIII или их внеклеточный домен, который экспрессируется на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* так, что по меньшей мере часть белка EGFRvIII выставляется на внеклеточную сторону клеточной мембраны и становится доступной для антигенсвязывающей части антитела. Экспрессируемый на клеточной поверхности EGFRvIII может содержать или состоять из белка EGFRvIII, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок EGFRvIII. В качестве альтернативы, экспрессируемый на клеточной поверхности EGFRvIII может содержать или состоять из белка EGFRvIII, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий EGFRvIII на своей поверхности, но искусственно сконструирована с возможностью экспрессии EGFRvIII на своей поверхности.

Используемый в настоящем документе термин «антитело против EGFRvIII» включает в себя как моновалентные антитела с единственной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывается с EGFRvIII, и второе плечо, которое связывается со вторым (целевым) антигеном, при этом плечо антитела против EGFRvIII содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в таблице 1 в настоящем документе. Термин «антитело против EGFRvIII» также включает в себя конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело против EGFRvIII или его антигенсвязывающую часть, конъюгированную с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксическим средством). Термин «антитело против EGFRvIII» также включает в себя конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело против EGFRvIII или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с радионуклидом.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей

мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, EGFRvIII). Термин «антитело» включает в себя иммуноглобулиновые молекулы, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи связанные вместе дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращается в настоящем документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращается в настоящем документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть, кроме того, разделены на области гиперизменчивости, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела против EGFRvIII (или его антигенсвязывающей части) может быть идентична человеческим зародышевым последовательностям или может быть естественно или искусственно модифицированной. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена с помощью параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых приемлемых стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление, или методик рекомбинантного генетического конструирования, предусматривающих манипуляцию с ДНК, кодирующей изменчивые и необязательно константные домены антитела, и экспрессию таковой. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК

(в том числе, например, библиотек антитела против фага), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и подвергнута манипуляции химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, с расположением одного или нескольких изменчивых и/или константных доменов в приемлемой конфигурации или с введением кодонов, созданием цистеиновых остатков, модификацией, добавлением или делецией аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченного пептида FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с исключенным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и изменчивые домены IgNAR акулы, также предусматриваются используемым в настоящем документе термином «антигенсвязывающий фрагмент».

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один изменчивый домен. Изменчивый домен может иметь любой размер или состав аминокислот и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая соседствует или находится в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут находиться друг относительно друга в любом приемлемом расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один изменчивый домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации изменчивых и константных доменов, которые могут находиться в антигенсвязывающем фрагменте антитела в соответствии с настоящим

изобретением, включают в себя: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации изменчивых и константных доменов, в том числе в любой из типичных конфигураций, приведенных выше, изменчивые и константные домены либо могут быть непосредственно связанными друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые в результате обеспечивают гибкое или полугибкое соединение между соседними изменчивыми и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций изменчивого и константного домена, приведенных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с молекулами полного антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных изменчивых домена, при этом каждый изменчивый домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом в том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, в том числе типичные форматы биспецифического антитела, раскрываемые в настоящем документе, могут быть приспособлены для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением с использованием рутинных методик, известных в уровне техники.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или зависимой от антитела опосредованной клеткой цитотоксичности (ADCC). Термин «комплементзависимая цитотоксичность» (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток антителом в соответствии с настоящим изобретением в присутствии комплемента. Термин «зависимая от антитела опосредованная клеткой цитотоксичность» (ADCC) относится к опосредованной клеткой реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например,

клетки натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке, что, тем самым, приводит к лизису целевой клетки. CDC и ADCC могут быть измерены с использованием анализов, которые общепризнаны и известны в уровне техники (см., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337, а также Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела играет важную роль в способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать зависимость от клетки цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антителами против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением являются человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» включает в себя антитела, имеющие изменчивые и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулина. Человеческие антитела в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя аминокислотные остатки, неcodируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулина (например, мутации, введенные путем случайного или сайтспецифического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR и, в частности, в CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» не предусматривает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародыша других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления антителами могут быть рекомбинантные человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает в себя все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описанные ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанные ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным в отношении человеческих генов иммуноглобулина (см., например, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью любого другого средства, которое включает в себя сплайсинг

последовательностей человеческого гена иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют изменчивые и константные области, полученные от человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются *in vitro* мутагенезу (или, если используется животное, трансгенное в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотными последовательностями областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательности, которые, несмотря на то, что получены из человеческих зародышевых последовательностей V_H и V_L или являются родственными таковым, не могут встречаться в природе в человеческом зародышевом наборе антител *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с шарнирной гетерогенностью. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе посредством межцепочечной дисульфидной связи тяжелых цепей. Во второй форме димеры не связываются межцепочечными дисульфидными связями, но молекула приблизительно 75-80 кДа образуется из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Такие формы очень трудно отделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG является следствием, но не ограничена структурными различиями, связанными с шарнирной областью изотипа антитела. Единичная аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может существенно уменьшать появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнире, в области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательны, например, при получении, чтобы повысить выход требуемой формы антитела.

Антителами в соответствии с настоящим изобретением могут быть выделенные антитела. Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» означает антитело, которое было идентифицировано и отделено по меньшей мере от одного компонента его естественной среды и/или извлечено из такового. Например, антитело, которое было отделено по меньшей мере от одного компонента организма

или от ткани или клетки, в которой антитело встречается в природе или продуцируется в природе, или извлечено из таковых, является выделенным антителом для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенными антителами являются антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело, по сути, может не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Антитела против EGFRvIII, раскрываемые в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR изменчивых доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых антитела получали. Такие мутации могут быть легко выявлены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, с зародышевыми последовательностями, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые получают из любых аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных областях и/или областях CDR мутируют в соответствующий остаток(остатки) зародышевой последовательности, из которой антитело получили, или соответствующий остаток(остатки) другой человеческой зародышевой последовательности, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего зародышевого остатка(остатков) (такие изменения последовательностей совместно называют в настоящем документе «зародышевыми мутациями»). Рядовой специалист в данной области, исходя из последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепей, раскрываемых в настоящем документе, сможет легко получить ряд антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных зародышевых мутаций или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления все из каркасных и/или CDR остатков в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, находящиеся в оригинальной зародышевой последовательности, из которой антитело получали. Согласно другим вариантам осуществления только некоторые остатки мутируют обратно в оригинальную зародышевую последовательность, например, только мутантные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах из FR1 или в последних 8 аминокислотах из FR4, или только мутантные

остатки, находящиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующие остатки другой зародышевой последовательности (т.е. зародышевой последовательности, которая отличается от зародышевой последовательности, из которой изначально было получено антитело). Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать любую комбинацию двух или более зародышевых мутаций в каркасных областях и/или областях CDR, например, при этом некоторые отдельные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной зародышевой последовательности, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от оригинальной зародышевой последовательности, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой зародышевой последовательности. При получении антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько зародышевых мутаций, можно легко тестировать на предмет одного или нескольких желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, получаемые таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к антителам против EGFRvIII, содержащим варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрываемых в настоящем документе, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами, относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, изложенных в таблице 1 в настоящем документе.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с сайтом специфического связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками на антигене и могут обладать разными биологическими эффектами. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп получается пространственным совмещением аминокислот из различных

сегментов линейной полипептидной цепи. Линейным эпитопом является эпитоп, полученный из соседних аминокислотных остатков в полипептидной цепи. При определенных обстоятельствах эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп в антигене.

Термин «существенная идентичность» или «по сути идентичная» в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере на приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, при измерении любым хорошо известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или, по сути, подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

В отношении полипептидов термин «существенное подобие» или «по сути, подобный» означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, таком как с помощью программы GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Термин «консервативная аминокислотная замена» означает замену, при которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком с боковой цепью (R-группой) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена, по сути, не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, если две или более аминокислотных последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательностей или степень подобия может быть скорректирована в сторону повышения, чтобы исправить консервативную природу замены. Средства для осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области, см., например, Pearson (1994)

Methods Mol. Biol. 24: 307-331, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают в себя (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) содержащие серу боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Термин «умеренно консервативное» замещение означает любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Подобие последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка совмещает подобные последовательности с использованием мер подобия, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG предусматривает программу, такую как Gap и Bestfit, которая может быть использована с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей близкородственных полипептидов, таких как гомологичные полипептиды организмов разных видов, или белка дикого типа и его мутанта, см., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей из областей наилучшего перекрытия запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности в соответствии с настоящим изобретением с базой данных,

содержащей большое число последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию, см., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 and Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

pH-Зависимое связывание

Настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением может демонстрировать пониженное связывание с EGFRvIII при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. В качестве альтернативы, антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут демонстрировать повышенное связывание с EGFRvIII при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Термин «кислотный pH» включает в себя значения pH менее приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. Используемый в настоящем документе термин «нейтральный pH» означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Термин «нейтральный pH» включает в себя значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В определенных случаях выражение «пониженное связывание с EGFRvIII при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH» применяется касательно отношения значения K_D связывания антитела с EGFRvIII при кислотном pH к значению K_D связывания антитела с EGFRvIII при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут рассматриваться как демонстрирующие «пониженное связывание с EGFRvIII при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH» для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют отношение кислотное/нейтральное K_D приблизительно 3,0 или больше. Согласно некоторым типичным вариантам осуществления отношение кислотное/нейтральное K_D для антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или больше.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены,

например, путем скрининга популяции антител по пониженному (или повышенному) связыванию с конкретным антигеном при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с pH-зависимыми характеристиками. Например, с помощью замены одной или нескольких аминокислот в антигенсвязывающем домене (например, в CDR) на гистидиновый остаток может быть получено антитело с пониженным связыванием антигена при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH.

Антитела против EGFRvIII, содержащие Fc-варианты

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против EGFRvIII, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII, содержащим мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(ии) повышает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, в которой pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни в сыворотке крови антитела при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y (N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y)), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S), модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F), модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y), модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E), модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно следующему варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение относится к антителам против EGFRvIII,

содержащим Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинаций вышеупомянутых мутаций Fc-домена и другие мутации в изменчивых доменах антитела, раскрываемых в настоящем документе, попадают в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к антителам против EGFRvIII, содержащим химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, при этом химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, объединенный с частью или всем доменом C_H3, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат химерную область C_H, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки положений 216-227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, объединенной с «нижней шарнирной» последовательностью (аминокислотные остатки положений 228-236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную область C_H, как описано в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления может обладать модифицированными эффекторными функциями Fc без неблагоприятного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (см., например, предварительную заявку на выдачу патента США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 года, раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством

ссылки во всей своей полноте).

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело против EGFRvIII или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксическое средство, химиотерапевтическое лекарственное средство или радиоизотоп.

Цитотоксические средства включают в себя любое средство, негативно влияющее на рост, жизнеспособность или размножение клеток. Примеры приемлемых цитотоксических средств и химиотерапевтических средств, которые могут быть конъюгированы с антителами против EGFRvIII в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения включают в себя, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, аманитины, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (AMC), ауристатины, блеомицин, бусульфан, масляную кислоту, калихемицины, камптотецин, карминомицины, кармустин, цемадотины, цисплатин, колхицин, комбретастатины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин B, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубицин, дибромманнит, дигидроксиантрациндион, дисоразолы, доластатин, доксорубицин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эсперамицин, эстрамустины, этидия бромид, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, лептомицины, леуроцины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пурамицин, пирролобензодиазепины (PDB), ризоксины, стрептозотоцин, таллисомицины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиозпахлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулузин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины и производные любого из вышеупомянутых. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксическим средством, которое конъюгировано с антителом против EGFRvIII, является майтанзиноид, такой как DM1 или DM4, производное томаймицина или производное доластатина. Другие цитотоксические средства, известные в уровне техники, попадают

в объем настоящего изобретения, в том числе, например, белковые токсины, такие как рицин, токсин *C. difficile*, экзотоксин *Pseudomonas*, рицин, дифтерийный токсин, ботулиновый токсин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса (т.е. фитолаккатоксин и фитолактигенин) и другие, такие как изложенные в Sapra *et al.*, *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469.

Настоящее изобретение также относится к конъюгатам антитело-радионуклид (ARC), содержащим антитела против EGFRvIII, конъюгированные с одним или несколькими радионуклидами. Типичные радионуклиды, которые могут быть использованы в контексте данного аспекта настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra и ^{90}Y .

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены ADC, содержащие антитело против EGFRvIII, конъюгированное с цитотоксическим средством (например, любым из цитотоксических средств, раскрытых выше) через линкерную молекулу. Может быть использована любая линкерная молекула или линкерная технология, известная в уровне техники, для создания или конструирования ADC в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам осуществления линкером является расщепляемый линкер. Согласно другим вариантам осуществления линкером является нерасщепляемый линкер. Типичные линкеры, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают в себя линкеры, которые содержат или состоят из, например, MC (6-малеимидокапроила), MP (малеимидопропаноила), val-cit (валин-цитруллина), val-ala (валин-аланина), дипептидного сайта в расщепляемом протеазой линкере, ala-phe (аланин-фенилаланина), дипептидного сайта в расщепляемом протеазой линкере, PAB (п-аминобензилоксикарбонила), SPP (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноата), SMCC (N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата), SIAB (N-сукцинимидил-(4-йод-ацетил)аминобензоата), а также их вариантов и комбинаций. Дополнительные примеры линкеров, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, раскрываются, например, в патенте США № 7754681 и в Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21:5-13, а также в ссылках, цитируемых там, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение относится к ADC, в которых линкер соединяет антитело против EGFRvIII или антигенсвязывающую молекулу с лекарственным средством или цитотоксином посредством присоединения на определенной аминокислоте в антителе

или антигенсвязывающей молекуле. Типичные аминокислотные присоединения, которые могут быть использованы в контексте данного аспекта настоящего изобретения, включают в себя, например, лизин (см., например, патент США № 5208020; заявку на выдачу патента США № 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; патент США № 5714586; заявки на выдачу патентов США №№ 2013/0101546 и 2012/0585592), цистеин (см., например, заявку на выдачу патента США № 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; заявку на выдачу патента США № 2013/0101546 и патент США № 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), не встречающиеся в природе аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком путем присоединения к углеводам (см., например, заявку на выдачу патента США № 2008/0305497 и Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361) и к дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313).

Любой известный в уровне техники способ конъюгации химического фрагмента с пептидом, полипептидом или другой макромолекулой может быть использован в контексте настоящего изобретения для создания ADC против EGFRvIII, описываемого в настоящем документе. Типичный способ конъюгации антитела с лекарственным средством через линкер изложен в примере 12 в настоящем документе. Вариации такого типичного способа будут очевидны рядовым специалистам в данной области и охватываются объемом настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к ADC, при этом антитело против EGFRvIII, описываемое в настоящем документе (например, антитело, обозначаемое H1H1863N2), конъюгировано с композицией линкер-лекарственное средство, как изложено в WO 2014/145090 (например, соединение «7», также называемое в настоящем документе «M0026»), раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте (см. также пример 12 в настоящем документе).

Картирование эпитопа и связанные с этим технологии

Эпитоп, с которым связываются антитела в соответствии с настоящим изобретением, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот белка EGFRvIII. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества прерывистых аминокислот (или аминокислотных последовательностей) EGFRvIII. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп располагается на связывающемся с лигандом домене EGFRvIII или рядом с ним. Согласно другим вариантам осуществления эпитоп располагается вне связывающегося с лигандом домена EGFRvIII, например, располагается на поверхности EGFRvIII, при этом антитело, при связывании с таким эпитопом, не мешает связыванию лиганда с EGFRvIII.

Настоящее изобретение согласно некоторым вариантам осуществления относится к антителам против EGFRvIII, которые специфично связываются с EGFRvIII (но не связываются с EGFR), при этом антитела распознают соединительный пептид EGFRvIII (например, SEQ ID NO: 148). Такие антитела могут называться в настоящем документе «связующие соединительного пептида», «антитела, связывающиеся с пептидом EGFRvIII» и т.п. Настоящее изобретение согласно другим вариантам осуществления относится к антителам против EGFRvIII, которые специфично связываются с EGFRvIII (но не связываются с EGFR), при этом антитела не распознают соединительный пептид EGFRvIII (например, не распознают соединительный пептид SEQ ID NO: 148 и/или не распознают пептид SEQ ID NO: 165). Такие антитела могут называться в настоящем документе «конформационными связующими», «связующими конформационного эпитопа EGFRvIII» и т.п.

Различные методики, известные рядовым специалистам в данной области, могут быть использованы для определения взаимодействия антитела с одной или несколькими аминокислотами в полипептиде или белке. Типичные методики включают в себя, например, рутинный перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), аланин-сканирующий мутационный анализ, пептидный блот-анализ (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ расщепления пептида. Кроме того, могут быть использованы способы, такие как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с

которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый масс-спектрометрией. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело перемещают в воду для обеспечения протекания водородно-дейтериевого обмена на всех остатках за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу с выявлением тем самым меченных дейтерием остатков, которые соответствуют определенным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к антителам против EGFRvIII, которые связываются с одним и тем же эпитопом, что и любое из конкретных типичных антител, описываемых в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице 1 в настоящем документе). Подобным образом, настоящее изобретение также относится к антителам против EGFRvIII, которые конкурируют за связывание с EGFRvIII с любым из конкретных антител, описываемых в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице 1 в настоящем документе).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против EGFRvIII, или конкурирует за связывание с таковым, с использованием рутинных способов, известных в уровне техники и представленных в настоящем документе. Например, для определения связывания тестируемого антитела с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком EGFRvIII. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой EGFRvIII. Если тестируемое антитело способно связываться с EGFRvIII после насыщающего связывания с эталонным антителом против EGFRvIII, то можно заключить, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от такового для эталонного антитела против EGFRvIII. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой EGFRvIII после насыщающего связывания с эталонным антителом против EGFRvIII, то тестируемое антитело может

связываться с тем же самым эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением. Затем можно провести дополнительный рутинный эксперимент (например, анализы пептидной мутации и связывания) для подтверждения того, что наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела объясняется связыванием с тем же эпитопом, что и связывание эталонного антитела, или тем, что за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает пространственное блокирование (или другое явление). Эксперименты подобного рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, известного в уровне техники. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы, считают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если главным образом все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого. Считают, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подгруппа аминокислотных мутаций, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом против EGFRvIII, описываемый выше метод связывания осуществляют в двух направлениях. Согласно первому направлению обеспечивают связывание эталонного антитела с белком EGFRvIII в условиях насыщения с последующим оцениванием связывания тестируемого антитела с молекулой EGFRvIII. Согласно второму направлению обеспечивают связывание тестируемого антитела с молекулой EGFRvIII в условиях насыщения с последующим оцениванием связывания эталонного антитела с молекулой EGFRvIII. Если, согласно обоим направлениям, только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой EGFRvIII, то заключают, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с EGFRvIII. Как будет понятно рядовому специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но

может пространственно блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение человеческих антител

Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут быть полностью человеческими антителами. Способы создания моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител, известны в уровне техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфично связываются с человеческим EGFRvIII.

С использованием технологии, например, VELOCIMMUNET[™] или любого другого подобного известного способа, для создания полностью человеческих моноклональных антител сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против EGFRvIII, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Как в нижеприведенном экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают по желаемым характеристикам, в том числе по аффинности, активности блокирования лиганда, селективности, эпитопу и т.д. При необходимости мышиные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, с созданием полностью человеческого антитела против EGFRvIII. Тогда как выбранная константная область может варьировать согласно конкретному применению, вариабельной области свойственны характеристики высокоаффинного связывания антигена и целевой специфичности. В определенных случаях полностью человеческие антитела против EGFRvIII выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток.

Биоэквиваленты

Антитела против EGFRvIII и фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые варьируют в отношении таковых в описываемых антителах, но которые сохраняют способность связываться с человеческим EGFRvIII. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, которая главным образом эквивалентна таковой описываемых антител. Подобным образом, кодирующие антитело против EGFRvIII

последовательности ДНК в соответствии с настоящим изобретением охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько из добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело против EGFRvIII или фрагмент антитела, которые главным образом биоэквивалентны антителу против EGFRvIII или фрагменту антитела в соответствии с настоящим изобретением. Примеры таких вариантных последовательностей аминокислот и ДНК обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, чья скорость и степень абсорбции не показывают существенного различия при введении при одинаковой молярной дозе при подобных экспериментальных условиях либо однократной дозой, либо многократной дозой. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по их скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются запланированными и отражены в мечении, но не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и с медицинской точки зрения считаются незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не наблюдаются с клинической точки зрения существенные различия в их безопасности, чистоте и эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если больной может быть переключен один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без предполагаемого повышения риска побочных эффектов, в том числе с клинической точки зрения существенного изменения иммуногенности или уменьшенной эффективности по сравнению с длительной терапией без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они действуют по общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения в случае, если такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и *in vitro*

способами. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (a) *in vivo* тестирование людей или других млекопитающих, при котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке крови или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) *in vitro* тестирование, которое коррелирует с данными *in vivo* биодоступности человека и обоснованно прогнозирует таковые; (c) *in vivo* тестирование людей или других млекопитающих, при котором измеряют соответствующий видимый фармакологический эффект антитела (или его цели) как функцию времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся важными для биологической активности, могут быть исключены или заменены на другие аминокислоты для предупреждения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антитела против EGFRvIII, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые исключают или устраняют гликозилирование.

Видовая селективность и видовая перекрестная реактивность

Настоящее изобретение согласно некоторым вариантам осуществления относится к антителам против EGFRvIII, которые связываются с человеческим EGFRvIII, но не с EGFRvIII других видов. Настоящее изобретение также относится к антителам против EGFRvIII, которые связываются с человеческим EGFRvIII и с EGFRvIII одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с человеческим EGFRvIII и могут связываться или не могут связываться, в зависимости от ситуации, с одним или несколькими EGFRvIII мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макака-резус или шимпанзе. Согласно

некоторым типичным вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против EGFRvIII, которые специфично связываются с человеческим EGFRvIII и EGFRvIII яванского макака (например, *Macaca fascicularis*). Другие антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением связываются с человеческим EGFRvIII, но не связываются или лишь слабо связываются с EGFRvIII яванского макака.

Мультиспецифические антитела

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфическими по отношению к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические по отношению к более чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, химическим присоединением, генетическим слиянием, нековалентной связью или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, у которых одно плечо иммуноглобулина связывается с человеческим EGFRvIII, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению ко второму антигену. Связывающееся с EGFRvIII плечо может содержать любую из HCVR/LCVR или CDR аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающееся с EGFRvIII плечо связывается с человеческим EGFRvIII и блокирует связывание лиганда с EGFRvIII. Согласно другим вариантам осуществления связывающееся с EGFRvIII плечо связывается с человеческим EGFRvIII, но не блокирует связывание лиганда с EGFRvIII.

Типичный формат биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение

первого домена С_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена С_H3 Ig, при этом первый и второй домены С_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом по меньшей мере одно аминокислотное отличие снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. Согласно одному варианту осуществления первый домен С_H3 Ig связывается с белком А, а второй домен С_H3 Ig содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание белка А, такую как модификация Н95R (по нумерации экзонов IMGT; Н435R - по EU нумерации). Второй С_H3, кроме того, может содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F - по EU). Дополнительные модификации, которые могут встречаться во втором С_H3, включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I - по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (по IMGT; N384S, K392N и V422I - по EU) в случае антител IgG2, а также Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I - по EU) в случае антител IgG4. Описываемые выше вариации формата биспецифического антитела охватываются объемом настоящего изобретения.

Другие типичные биспецифические форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, основанные на scFv или диателе биспецифические форматы, слияния IgG-scFv, двойной изменчивый домен (DVD)-Ig, квадрому, «выступы-во-впадины», общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с «выступами-во-впадинах» и т.д.), CrossMab, CrossFab, SEEDbody, лейциновую «застежку», DuoBody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и цитируемые там ссылки, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с использованием конъюгации пептида с нуклеиновой кислотой, например, при которой используются не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью для создания конъюгатов сайт-специфическое антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными композицией, валентностью и геометрией (см., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтический состав и введение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям,

содержащим антитела против EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением составляют с приемлемыми носителями, вспомогательными средствами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенные перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество соответствующих составов могут быть найдены в известном всем фармацевтам справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии «масло-в-воде» и «вода-в-масле», эмульсии карбовакса (полиэтиленгликолей с различной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимая больному, может варьировать в зависимости от возраста и массы больного, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают по массе тела или площади поверхности тела. Для взрослого больного может быть целесообразным внутривенное введение антитела в соответствии с настоящим изобретением обычно однократной дозой от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и длительность лечения. Эффективные дозировки и схемы для введения антител против EGFRvIII могут быть определены эмпирически; например, прогресс у больного можно контролировать путем периодического оценивания и соответственно регулировать дозу. Более того, межвидовое оценивание дозировок можно осуществлять с использованием способов, хорошо известных в уровне техники (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Известны и могут быть использованы различные системы доставки для введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы

введения включают в себя без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композиция может быть введена любым удобным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или слизистые оболочки (например, через слизистую полости рта, ректальную и кишечную слизистую и т.д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлена подкожно или внутривенно стандартными иглой и шприцем. Кроме того, в отношении подкожной доставки, удобно применять устройство доставки в виде шприца-ручки при доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Такое устройство доставки в виде шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки в виде шприца-ручки, как правило, используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже введена, и картридж опустошился, пустой картридж можно легко снять и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство доставки в виде шприца-ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве доставки в виде шприца-ручки нет сменного картриджа. Напротив, одноразовое устройство доставки в виде шприца-ручки предварительно заполнено фармацевтической композицией, хранящейся в резервуаре устройства. Как только фармацевтическая композиция в резервуаре заканчивается, все устройство выбрасывают.

Применяют многочисленные многоразовые устройства доставки в виде шприцев-ручек и шприцев для самостоятельной инъекции при подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Примеры включают в себя без ограничения шприц-ручку AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) среди прочих. Примеры одноразовых устройств доставки в виде

шприцев-ручек, применяемых при подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц для самостоятельной инъекции SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL) среди прочих.

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления может быть использован насос (см. Langer выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Согласно другому варианту осуществления могут быть использованы полимерные материалы, см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Согласно следующему варианту осуществления система контролируемого высвобождения может быть помещена рядом с целью композиции, таким образом, при этом необходима только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать в себя дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Такие инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описываемых выше антигена или его соли в стерильной водной среде или в масляной среде, традиционно используемых для инъекций. Что касается водной среды для инъекций, используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу, другие вспомогательные средства и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 мол.) аддукт гидрогенизированного касторового масла)) и т.д. Что касается масляной среды, используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую

ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для описываемого выше перорального или парентерального применения получают в дозированных формах с единичной дозой, подходящей для добавления дозы активных ингредиентов. Такие дозированные формы в единичной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на дозированную форму в единичной дозе, в частности, для формы инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Терапевтические применения антител

Настоящее изобретение относится к способам, предусматривающим введение субъекту при необходимости этого терапевтической композиции, содержащей антитело против EGFRvIII или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело против EGFRvIII (например, антитело против EGFRvIII или ADC, содержащий любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в таблице 1 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любые из антител против EGFRvIII, их антигенсвязывающих фрагментов или ADC, раскрываемых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела и ADC в соответствии с настоящим изобретением применимы, *inter alia*, для лечения, предупреждения и/или облегчения какого-либо заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью EGFRvIII или опосредованного таковыми, или излечиваемого путем блокирования взаимодействия между EGFRvIII и лигандом EGFR или иного ингибирования активности EGFRvIII и/или передачи сигнала, и/или обеспечения интернализации рецептора, и/или снижения числа рецепторов клеточной поверхности. Например, антитела и ADC в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения опухолей, которые экспрессируют EGFRvIII и/или которые отвечают на опосредованную лигандом передачу сигнала. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением также могут быть использованы для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и оболочках головного мозга, ротоглотке,

легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужской и женской половой системе, мышце, кости, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях и специальных органах чувств, таких как глаз. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и ADC в соответствии с настоящим изобретением используют для лечения одной или нескольких из следующих злокачественных опухолей: почечно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли желудка (например, злокачественной опухоли желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, злокачественной опухоли яичника, мелкоклеточной злокачественной опухоли легкого, немелкоклеточной злокачественной опухоли легкого, синовиальной саркомы, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли молочной железы или меланомы.

В контексте способов лечения, описываемых в настоящем документе, антитело против EGFRvIII может быть введено в виде монотерапии (т.е. как единственное терапевтическое средство) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описываются в других разделах настоящего документа).

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, снижения роста опухоли и/или обеспечения регрессии опухоли у больного. Способы в данном аспекте настоящего изобретения предусматривают введение больному первого конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), либо отдельно, либо в комбинации со вторым антителом против EGFRvIII или ADC. Первое ADC, как правило, будет содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела и цитотоксин, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого ADC специфично связывается с EGFRvIII, но не связывается с соединительным пептидом EGFRvIII из SEQ ID NO: 148 или пептидом из SEQ ID NO: 165 (т.е. первый ADC содержит связывающееся с конформационным EGFRvIII антитело). Согласно вариантам осуществления, при которых вводят вторые антитело или ADC, вторые антитело или ADC, как правило, будут содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела и цитотоксин, при этом вторые антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфично

связываются с EGFRvIII, а также связываются с соединительным пептидом EGFRvIII из SEQ ID NO: 148 и/или пептидом из SEQ ID NO: 165 (т.е. вторые антитело или ADC содержат связывающееся с соединительным пептидом EGFRvIII антитело). При использовании двух отдельных ADC против EGFRvIII в контексте данного аспекта настоящего изобретения согласно некоторым вариантам осуществления оба ADC могут содержать одинаковое цитотоксическое средство или цитотоксическое средство одного и того же класса. Согласно другим вариантам осуществления при использовании двух отдельных ADC против EGFRvIII каждый ADC может содержать отличающееся цитотоксическое средство и/или цитотоксическое средство другого класса. Неограничивающие типичные варианты осуществления данного аспекта настоящего изобретения изложены в настоящем документе в примере 14. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого ADC (т.е. связывающееся с конформационным EGFRvIII антитело) содержит определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепей, включающие в себя SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 и 48, или переменную область тяжелой цепи, включающую в себя SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, включающую в себя SEQ ID NO: 42.

Комбинационные терапевтические средства и составы

Настоящее изобретение относится к композициям и терапевтическим составам, содержащим любое из антител против EGFRvIII, описываемых в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и к способам лечения, предусматривающим введение таких комбинаций субъектам при необходимости этого.

Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением могут быть совместно составлены и/или введены в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из антагониста PRLR (например, антитела против PRLR или низкомолекулярного ингибитора PRLR), антагониста EGFR (например, антитела против EGFR (например, цетуксимаба или панитумумаба) или низкомолекулярного ингибитора EGFR (например, гефитиниба или эрлотиниба)), антагониста другого представителя семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антител против ErbB2 (например, трастузумаба или T-DM1 (KADCYLA®)), против ErbB3 или против ErbB4 или низкомолекулярного ингибитора активности ErbB2, ErbB3

или ErbB4), антагониста cMET (например, антитела против cMET), антагониста IGF1R (например, антитела против IGF1R), ингибитора B-raf (например, вемурафениба, сорафениба, GDC-0879, PLX-4720), ингибитора PDGFR- α (например, антитела против PDGFR- α), ингибитора PDGFR- β (например, антитела против PDGFR- β или низкомолекулярного ингибитора киназы, такого как, например, иматиниб мезилат или сунитиниб малат), ингибитора лиганда PDGF (например, антитела против PDGF-A, -B, -C или -D, аптамера, siRNA и т.д.), антагониста VEGF (например, VEGF-Trap, такого как афлиберсепт, см., например, патент США № 7087411 (также называемый в настоящем документе «ингибирующим VEGF белком слияния»), антитела против VEGF (например, бевацизумаба), низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)), антагониста DLL4 (например, антитела против DLL4, раскрываемого в заявке на выдачу патента США № 2009/0142354, такого как REGN421), антагониста (например, антитела против Ang2, раскрываемого в заявке на выдачу патента США № 2011/0027286, такого как H1H685P), антагониста FOLH1 (например, антитела против FOLH1), антагониста STEAP1 или STEAP2 (например, антитела против STEAP1 или антитела против STEAP2), антагониста TMPRSS2 (например, антитела против TMPRSS2), антагониста MSLN (например, антитела против MSLN), антагониста CA9 (например, антитела против CA9), уроплакинового антагониста (например, антитела против уроплакина (например, антитела против UPK3A)), антагониста MUC16 (например, антитела против MUC16), антагониста антигена Tn (например, антитела против Tn), антагониста CLEC12A (например, антитела против CLEC12A), антагониста TNFRSF17 (например, антитела против TNFRSF17), антагониста LGR5 (например, антитела против LGR5), моновалентного антагониста CD20 (например, моновалентного антитела против CD20, такого как ритуксимаб), антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против CD3, антитела против CTLA-4 и т.д. Другие средства, которые предпочтительно могут быть введены в комбинации с биспецифическими антигенсвязывающими молекулами в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и цитокиновые ингибиторы, в том числе низкомолекулярные цитокиновые ингибиторы, и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами.

Настоящее изобретение относится к композициям и терапевтическим составам, содержащим любое из антител против EGFRvIII, описываемых в настоящем документе,

в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств включают в себя алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импосульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохинон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, меклоретамин, меклоретамин оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихемицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитадин, 6-азауредин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, подавляющие функцию коры надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения фолиевой кислоты, такое как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозин; аминоклевулиновую кислоту; амсарцин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизфиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers

Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (Taxotere™; Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеупомянутых. Также данное определение предусматривает противогормональные средства, которые действуют с регулированием или ингибированием действия гормонов в опухолях, такие как антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеупомянутых.

Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением также могут быть введены и/или совместно составлены в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиозащитными средствами, металлохелатами, IFN-гамма и/или NSAID.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например, какое-либо из приведенных выше средств или их производных, может быть введен до, одновременно или сразу же после введения антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением (для целей настоящего раскрытия такие режимы введения предусматривают введение антитела против EGFRvIII в комбинации с дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением совместно составлено с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описывается в других разделах настоящего документа.

Режимы введения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела против EGFRvIII (или фармацевтической композиции,

содержащей комбинацию антитела против EGFRvIII и любое из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) могут быть введены субъекту за определенный период времени. Способы в данном аспекте настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в настоящем документе термин «последовательное введение» означает, что каждую дозу антитела против EGFRvIII вводят субъекту в определенный момент времени, например, в разные сутки, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часы, сутки, недели или месяцы). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение больному однократной начальной дозы антитела против EGFRvIII, а затем одной или нескольких вторичных доз антитела против EGFRvIII и необязательно с последующими одной или несколькими третичными дозами антитела против EGFRvIII.

Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (также называется «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; а «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Все начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антитела против EGFRvIII, но, как правило, могут отличаться друг от друга по частоте введения. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, количество антитела против EGFRvIII, содержащегося в начальной, вторичных и/или третичных дозах, варьирует от одной к другой (например, повышается или понижается по необходимости) в ходе лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения как «загружающие дозы», а затем последующие дозы, которые вводят менее часто (например, «поддерживающие дозы»).

Согласно некоторым типичным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или больше) недель после непосредственно

предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза «непосредственно предшествующая доза» означает при последовательности нескольких введений дозу антитела против EGFRvIII, которую вводят больному до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в данном аспекте настоящего изобретения могут предусматривать введение больному любого числа вторичных и/или третичных доз антитела против EGFRvIII. Например, согласно некоторым вариантам осуществления больному вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления больному вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления больному вводят единственную третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления больному вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз. Режим введения может осуществляться неограниченно в течение жизни конкретного субъекта, или до тех пор, пока в таком лечении больше не будет терапевтической необходимости или пользы.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена больному через 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Подобным образом, согласно вариантам осуществления, предусматривающим несколько третичных доз, каждая третичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может быть введена больному через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения частота введения вторичных и/или третичных доз больному может варьировать в ходе режима лечения. Частота введения также может регулироваться в ходе лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного больного после клинического обследования.

Настоящее изобретение относится к режимам введения, при которых 2-6 загружающих доз вводят больному с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т.д.) с последующим введением больному двух или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, в данном аспекте настоящего изобретения, если загружающие дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводить больному один раз каждые шесть недель, один

раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца и т.д.

Диагностическое применение антител

Антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением также могут быть использованы для выявления и/или измерения EGFRvIII или экспрессирующих EGFRvIII клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против EGFRvIII или его фрагмент могут быть использованы для диагностирования состояния или заболевания, характеризующегося аномальной экспрессией (например, надэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) EGFRvIII. Типичные диагностические анализы для EGFRvIII могут предусматривать, например, контакт образца, полученного от больного, с антителом против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением, при этом антитело против EGFRvIII метят выявляемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы, немеченое антитело против EGFRvIII может быть использовано в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое как таковое является меченым выявляемой меткой. Выявляемой меткой или репортерной молекулой может быть радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин изотиоцианат или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Специфические типичные анализы, которые могут быть использованы для выявления или измерения EGFRvIII в образце, включают в себя фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно активированных клеток (FACS).

Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя получаемый от больного образец любой ткани или жидкости, который содержит выявляемые количества белка EGFRvIII или его фрагментов при нормальных или патологических состояниях. Как правило, уровни EGFRvIII в конкретном образце, получаемом от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными уровнями или активностью EGFRvIII), будут измерять относительно изначально установленного исходного или стандартного уровня EGFRvIII. Такой исходный уровень EGFRvIII затем можно сравнивать с уровнями EGFRvIII, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов,

предположительно страдающих связанным с EGFRvIII заболеванием или состоянием.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры использованы для того, чтобы предоставить рядовому специалисту в данной области полное раскрытие и описание осуществления и применения способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением, и не предназначены для ограничения объема, который авторы настоящего изобретения рассматривают как изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел, но следует учитывать некоторые погрешности и отклонения эксперимента. Если не указано иное, молекулярной массой является средняя молекулярная масса, температура указывается в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близко к таковому.

Пример 1. Создание антител против EGFRvIII

Антитела против EGFRvIII получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепей человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, содержащим внеклеточный домен EGFRvIII. Антитела первого набора включали в себя антитела, обозначаемые H1H2194P, H1H2195P, H2M1863N2, H2M1911N, H2M1912N, H2M1915N, H2M1917N, H2M1918N и H3M1913N (как показано в таблицах 1 и 2).

Антительный иммунный ответ контролировали с помощью EGFRvIII-специфического иммуноанализа. При достижении желаемого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования гибридных клеточных линий. Гибридные клеточные линии подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, которые продуцировали EGFRvIII-специфические антитела. С использованием этой методики получали некоторые химерные антитела против EGFRvIII (т.е. антитела, обладающие человеческими изменчивыми доменами и мышиными константными доменами). Кроме того, некоторые полностью человеческие антитела против EGFRvIII выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описывается в заявке на выдачу патента США № 2007/0280945A1.

Отдельно также получали H1H1863N2 с пониженным фукозилированием

[«H1H1863N2(Fuc -)»] в линии клеток-хозяев СНО, которые описывали как «8088» в заявке на выдачу патента США № 2010/0304436A1, которая специально включена посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, последовательности легкой цепи и тяжелой цепи H1H1863N2 клонировали в векторы экспрессии. Два миллиона клеток 8088 трансфицировали плазмидами легкой и тяжелой цепей и вектором pR4004, содержащим ген, кодирующий Cre. Трансфицированные клетки, которые выживали при отборе с помощью 400 мкг/мл гигромицина, адаптировали для роста в суспензии в среде без сыворотки крови и без фукозы. Клетки, которые экспрессировали флуоресцентный белок EGFP, но не DsRed или ECFP, выделяли из трансфицированных клеток проточной цитометрией. Отсортированные клетки высевали во встряхиваемую колбу при 4×10^5 клеток/мл и через трое суток культуральную среду собирали, а белки антитела в ней (т.е. H1H1863N2(Fuc -)) очищали с помощью хроматографии с белком А. Масс-спектрометрическим анализом полученного в результате H1H1863N2(Fuc -) подтверждали, что по сравнению с H1H1863N2(Fuc +), оригинальным антителом, коровая фукоза была удалена. Обозначения «H1H1863N2» и «H1H1863N2(Fuc +)» в настоящем документе относятся к оригинальному антителу без модификаций фукозилирования.

Некоторые биологические свойства типичных антител против EGFRvIII, созданных согласно способам данного примера, подробно описываются в нижеизложенных примерах.

Пример 2. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот переменных областей тяжелой и легкой цепей

В таблице 1 приводятся идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR отобранных антител против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот изложены в таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32

H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

Антитела в настоящем документе, как правило, называют согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, «H1H», «H2M», «H3M» и т.д.), затем числовой идентификатор (например, «2194», «2195», «1863» и т.д.), затем суффикс «P» или «N», как показано в таблицах 1 и 2. Таким образом, согласно данной номенклатуре в настоящем документе антитело может быть названо, например, «H1H2194N», «H2M1911N», «H3M1913N» и т.д. Приставки H1H, H2M и H3M в обозначении антител, используемых в настоящем документе, указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело «H1H» имеет человеческую Fc IgG1, антитело «H2M» имеет мышиную Fc IgG2, а антитело «H3M» имеет мышиную Fc IgG3 (все переменные области являются полностью человеческими, что обозначается первым «H» в обозначении антитела). Рядовому специалисту в данной области будет понятно,

что антитело с определенным изотипом Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с мышьиной Fc IgG1 может быть превращено в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае изменчивые домены (в том числе CDR), которые обозначаются числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2, будут оставаться теми же, и, как предполагают, свойства связывания будут идентичными или, по сути, подобными независимо от природы Fc-домена.

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах

В следующие эксперименты в целях сравнения включали следующие контрольные конструкции. Контроль I: человеческое антитело против EGFRvIII (IgG1) с изменчивыми доменами тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями, соответствующими SEQ ID NO: 142 и 144, соответственно, антитела «13.1.2», раскрываемого в патенте США № 7736644; контроль II: химерное антитело против EGFRvIII (hIgG1) с изменчивыми доменами тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями, соответствующими SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно, антитела «ch806», раскрываемого в патенте США № 7589180; контроль III: гуманизированное антитело против EGFRvIII (hIgG1) с изменчивыми доменами тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями, соответствующими SEQ ID NO: 42 и 47, соответственно, антитела «hu806», раскрываемого в публикации заявки на выдачу патента США № 2010/0056762; контроль IV: химерное антитело против EGFR с изменчивыми доменами тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями соответствующих доменов «C225», как изложено в патенте США №7060808; и контроль V: человеческое антитело против EGFRvIII (IgG1) с изменчивыми доменами тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями, соответствующими SEQ ID NO: 2 и 19, соответственно, антитела «131», раскрываемого в патенте США № 7736644 B2. Антитело «13.1.2», как известно, является специфическим в отношении соединительного пептида (SEQ ID NO: 148) EGFRvIII; а антитела «ch806» и «hu806», как известно, связываются с остатками 311-326 (SEQ ID NO: 165) в EGFR (SEQ ID NO: 146), который амплифицируется или надэкспрессируется, или с остатками 44-59 в EGFRvIII (SEQ ID NO: 147).

Пример 3. Определение аффинности связывания EGFRvIII

Аффинности связывания и кинетические константы человеческих

моноклональных антител против EGFRvIII определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C. Измерения выполняли на устройстве T100 BIACORE™. Антитела, называемые человеческими Fc IgG1 (т.е. обозначения «H1H»), захватывали на поверхность антитела против человеческого Fc-сенсора (формат захваченного mAb), и растворимые мономерные (EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154) и EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152)) или димерные (EGFR-mFc (SEQ ID NO: 155) и EGFRvIII-mFc (SEQ ID NO: 153)) белки инъецировали над поверхностью. В формате захваченного рецептора либо EGFRvIII-mFc, либо EGFR-mFc захватывали чипом BIACORE™, и по ним протекали соответствующие антитела. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0 для подбора эмпирической кривой. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t_{1/2}$) вычисляли по кинетическим константам скорости как: $K_D (M) = k_d/k_a$; и $t_{1/2} (минуты) = \ln 2 / (60 * k_d)$.

Результаты показаны в таблицах 3 и 4. NB = отсутствие связывания при тестируемых условиях; NT = не тестировали.

Таблица 3: Кинетические параметры связывания человеческих антител против Fc

Связывание при 37°C/формат захваченного mAb					
Ab	Анализируемое вещество	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc +)	EGFRvIII-mmh	1,97E+04	8,95E-03	4,54E-07	1,3
	EGFR-mmh	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mFc	7,28E+04	8,07E-04	1,11E-08	14
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
H1H1863N2 (Fuc -)	EGFRvIII-mmh	3,02E+04	1,02E-02	3,39E-07	1,1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,12E+05	6,42E-04	5,73E-09	18
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB

	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1,83E+04	1,64E-02	8,99E-07	0,7
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,04E+04	9,71E-04	4,77E-08	12
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1,63E+02	1,14E-03	7,03E-06	10
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,40E+04	3,16E-04	2,26E-08	37
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1915N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H2194P	EGFRvIII-mmh	8,10E+04	1,37E-03	1,70E-08	8
	EGFR-mmh	7,60E+04	9,60E-04	1,26E-08	12
	EGFRvIII-mFc	9,54E+04	2,22E-04	2,33E-09	52
	EGFR-mFc	8,10E+04	1,99E-04	2,43E-09	58
H1H2195P	EGFRvIII-mmh	6,48E+04	6,94E-04	1,07E-08	17
	EGFR-mmh	5,66E+04	5,23E-04	9,20E-09	22
	EGFRvIII-mFc	1,02E+05	1,13E-04	1,10E-09	103
	EGFR-mFc	9,20E+04	1,89E-04	2,05E-09	61
Контроль I	EGFRvIII-mmh	1,29E+05	1,53E-01	1,19E-06	0,1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	7,15E+04	7,36E-03	1,03E-07	1,6
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Контроль II	EGFRvIII-mmh	4,90E+04	7,33E-03	1,50E-07	2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,02E+05	4,08E-04	2,02E-09	28
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Контроль III	EGFRvIII-mmh	8,57E+04	5,16E-03	6,02E-08	2,2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2,52E+05	2,98E-04	1,18E-09	39

	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
Контроль V	EGFRvIII-mmh	1,94E+05	1,59E-02	8,20E-08	1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1,91E+05	3,71E-04	1,95E-09	31
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT

Таблица 4: Кинетические параметры связывания человеческих антител против Fc

Связывание при 37°C/формат захваченного рецептора					
Ab	Захваченный рецептор	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)	T½
H1H1863N2 (Fuc +)	EGFRvIII-mFc	9,00E+05	2,06E-04	2,30E-10	56
	EGFR-mFc	2,11E+05	1,82E-01	8,65E-07	0,1
H1H1863N2 (Fuc -)	EGFRvIII-mFc	1,01E+06	2,15E-04	2,10E-10	54
	EGFR-mFc	1,99E+05	4,67E-01	2,34E-06	0,02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3,29E+04	6,43E-04	1,95E-08	18
	EGFR-mFc	7,77E+03	1,74E-03	2,24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9,90E+04	5,37E-04	5,40E-09	22
	EGFR-mFc	3,99E+04	9,14E-04	2,29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6,30E+04	1,00E-06	1,58E-11	11550
	EGFR-mFc	5,93E+03	1,00E-06	1,69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1,00E+05	3,28E-04	3,20E-09	35
	EGFR-mFc	4,35E+04	8,01E-03	1,84E-07	1,4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2,17E+05	5,85E-05	2,68E-10	197
	EGFR-mFc	2,04E+05	9,15E-05	4,47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1,88E+05	7,38E-05	3,94E-10	157
	EGFR-mFc	1,87E+05	7,07E-05	3,80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2,37E+05	2,53E-05	1,06E-10	456
	EGFR-mFc	2,25E+05	5,20E-05	2,31E-10	222
Контроль I	EGFRvIII-mFc	4,46E+05	4,04E-03	9,06E-09	2,9
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB

Контроль II	EGFRvIII-mFc	1,25E+06	7,31E-05	5,90E-11	158
	EGFR-mFc	4,44E+05	1,46E-04	3,29E-10	79
Контроль III	EGFRvIII-mFc	1,49E+06	1,00E-06	6,70E-13	11550
	EGFR-mFc	2,86E+05	6,17E-05	2,15E-10	187

Как показано в таблицах 3 и 4, некоторые антитела демонстрировали селективность по отношению к EGFRvIII и не связывались с EGFR дикого типа в формате захваченного mAb. В формате захваченного рецептора (таблица 4) H1H863N2, H1H1915N и контроль I демонстрировали наибольшую селективность.

Эксперимент 4: Специфичность антитела, определяемая с помощью ELISA

Для дополнительной характеристики mAb против hEGFRvIII проверяли их специфичность связывания с помощью ELISA. Планшеты покрывали одним из следующих: EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154); EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152) и соединительный пептид (J-пептид) (SEQ ID NO: 148). В отношении соединительных пептидов, которые были связаны с биотином либо на C-конце (SEQ ID NO: 149), либо на N-конце (SEQ ID NO: 150) через линкер, планшеты повторно покрывали авидином. Также покрывали нерелевантным пептидом (контрольным пептидом) с биотином или без такового на его N-конце. Антитела против EGFRvIII, а также изотипическое контрольное антитело добавляли в покрытые планшеты и обеспечивали инкубацию в течение 1 часа при 25°C. Затем планшеты промывали и выявляли связанные mAb против EGFRvIII с антителами против человеческого Fc, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Планшеты обрабатывали раствором субстрата тетраметилбензидина (TMB) для получения колориметрической реакции и нейтрализовали серной кислотой перед считыванием поглощения при 450 нм на устройстве для считывания планшетов VICTOR™ X5. Для анализа данных использовали сигмоидальную модель доза-ответ в программном обеспечении PRISM™. Рассчитанное значение EC₅₀, определяемое как 50% концентрация антител, необходимая для развития максимального ответа, использовали как индикатор эффективности связывания. Результаты представлены в таблице 5. Н.т.: не тестировали. Контроли I-III: как описываемые выше.

Таблица 5

Антитело	EC ₅₀ (нМ)
----------	-----------------------

	EGFR- mmh (25°C)	EGFRvI II-mmh (25°C)	J- пептид	J- пептид с C- концев ым биотино м	J- пептид с N- концев ым биотино м	Контр ольны й пептид	Контр ольны й пептид с N- концев ым биотин ом
H1H1863N2 (Fuc -)	> 10	0,0766	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1863N2 (Fuc +)	> 10	0,113	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1911N	9,06	0,0748	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1912N	0,0405	0,0118	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1913N	2,55	2,14	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H1915N	> 10	0,167	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2193P	0,0040	0,0035	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2194P	0,0037	0,0032	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
H1H2195P	0,0052	0,0049	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Контроль I	> 10	0,0094	0,118	0,0153	0,0106	> 10	> 10
Контроль II	0,0095	0,0057	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Контроль III	0,0079	0,0048	Н.т.	Н.т.	Н.т.	Н.т.	Н.т.
Изотипичес кий контроль	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

Антитела H1H1863N2, H1H1915 и контроль I демонстрировали сильное связывание с EGFRvIII, но не связывались (> 10 нМ) с EGFR дикого типа. Ни одно из антител, за исключением контроля I (имеющего последовательности, которые соответствуют последовательностям тяжелой и легкой цепей антитела «13.1.2», полученного из мышей, иммунизированных соединительным пептидом (патент США № 7736644), не показало связывания с соединительными пептидами.

Пример 5: Вестерн-блот EGFR и EGFRvIII с использованием антител против EGFRvIII

Одно из антител H1H1863N2 тестировали по его характеристикам связывания с помощью вестерн-блотов как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях. EGFR-mmh (SEQ ID NO: 154) или EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152) загружали на гели Tris-Glycine SDS PAGE, прогоняли, а затем переносили на нитроцеллюлозу. После блокирования мембраны разрезали пополам и испытывали либо с антителами против EGFRvIII, либо с антителом против His. Контроли I и II описаны выше.

Как показано на фиг. 1a, H1H1862N2 (Fuc -) не связывается в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях с EGFRvIII-mmh или EGFR-mmh и, таким образом, имеет конформационный эпитоп для EGFRvIII. В отличие от этого, контроль II связывается как с EGFR дикого типа, так и с вариантом III EGFR в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях, тогда как контроль I, связующее соединительного пептида, является специфическим по отношению к EGFRvIII. И контроль I, и контроль II в отличие от H1H1863N2 имеют линейные эпитопы связывания. На фиг. 1b показаны другие антитела против EGFRvIII, которые демонстрируют смешанное поведение при вестерн-блотах.

Пример 6: Анализы связывания пептидов EGFR/EGFRvIII и конкурентного связывания антител

H1H1863N2(Fuc -) тестировали по его характеристикам связывания с использованием анализов связывания пептидов и конкурентного связывания антител. Для экспериментов связывания пептидов соединительный пептид EGFRvIII (SEQ ID NO: 148), меченный через линкер биотином на его С-конце (т.е. LEEKKGNVVTDHGGGGSK (SEQ ID NO: 149)-биотин), или пептид, состоящий из остатков 311-326 EGFR («311-326 пептид EGFR»; SEQ ID NO: 165), меченный через линкер биотином на его С-конце (т.е. CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK (SEQ ID NO: 151)-биотин), захватывали на толщине ~ 0,4 нМ с использованием покрытых стрептавидином наконечников OCTET® на устройстве FORTEBIO® OCTET® RED. После захвата пептида покрытые наконечники помещали в 1-мкМ растворы антитела и регистрировали ответы связывания (см. фиг. 2). Контроли I-III являются такими же, как и описанные выше.

Как и предполагали, контроль I связывался с соединительным пептидом с С-концевым биотином, а контроли II и III связывались с пептидом EGFR 311-326 с С-концевым биотином. H1H1863N2(Fuc -) не связывался ни с одним из пептидов.

Для перекрестной конкуренции антител ~ 200 резонансных единиц (RU) ohEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO: 152) захватывали на поверхности BIACORE™, покрытой с высокой плотностью поликлональным антителом против пентагистидина (№ по каталогу 34660, QUIAGEN). С использованием метода совместной инъекции захваченный hEGFRvIII-mmh насыщали 5-минутной инъекцией 500 нМ первого mAb, а затем сразу же другой 5-минутной инъекцией второго mAb (500 нМ), которую дополняли 500 нМ первого mAb. Значительное связывание, выражаемое в RU, второго mAb объясняли тем, что оно не конкурирует за связывание с первым mAb. Для контрольных экспериментов использовали изотипически сходные mAb в качестве либо первого mAb, либо второго mAb. Результаты показаны в таблице 6.

Таблица 6

Поверхность BIACORE™ (первое антитело)	Связывание второго антитела (RU)			
	Ответ связывания H1H1863N2(Fuc -)	Ответ связывания контроля I	Ответ связывания контроля II	Ответ связывания контроля III
Только EGFRvIII	270	234	247	247
Комплекс EGFRvIII- H1H1863N2(Fuc -)	5	253	191	208
Комплекс EGFRvIII- контроль I	291	5	258	272
Комплекс EGFRvIII- контроль II	225	252	6	25
Комплекс EGFRvIII- контроль III	223	254	13	7

H1H1863N2(Fuc -) не конкурирует с каким-либо из контрольных антител I-III за связывание с hEGFRvIII-mmh, захваченным на поверхности. Как и предполагали, контроли II и III, как известно, связываются с остатками 311-326 в EGFR, конкурировали друг с другом за связывание с EGFRvIII-mmh, захваченным на

поверхности.

Пример 7: Селективность связывания клеток антителами против EGFRvIII

Для определения специфичности связывания mAb против EGFRvIII с клетками HEK293 клетки HEK293, экспрессирующие EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII), и клетки A431 анализировали с помощью сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS). Клетки HEK293/EGFRvIII получали путем трансфекции клеток HEK293 устойчивыми к неомицину ДНК-векторами, постоянно экспрессирующими непротессированный hEGFRvIII (SEQ ID NO: 147), с использованием реагента для трансфекции LIPOFECTAMINE™ 2000 (INVITROGEN™). Через два дня после трансфекции клетки помещали для отбора G418 на приблизительно две недели. Популяции, положительно экспрессирующие EGFRvIII, выделяли с помощью сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS). В эксперименте использовали клетки HEK293, экспрессирующие $\sim 3 \times 10^6$ копий EGFRvIII на клетку. Вкратце, антитела против EGFRvIII при 10 мкг/мл инкубировали с клетками в течение 30 минут при комнатной температуре, промывали, инкубировали со вторичным антителом, т.е. меченным фикоэритрином (PE) антителом козы F(ab')₂ против человеческого IgG (№ по каталогу 109-116-170, Jackson ImmunoResearch Laboratories), а затем окончательно промывали перед анализом FACS. В другой серии экспериментов антитела против EGFRvIII непосредственно конъюгировали через их лизиновые остатки с флуоресцентным красителем ALEXA FLUOR® 488 (INVITROGEN™), тем самым устраняя стадию использования вторичного антитела. Результаты по клеткам HEK293 и клеткам HEK293/EGFRvIII с использованием непосредственно меченых антител против EGFRvIII, показаны в таблице 7, а результаты с использованием вторичного меченного PE антитела против Fc (человеческого или мышиного) показаны в таблице 8. Результаты по клеткам A431 с использованием непосредственно меченых антител против EGFRvIII показаны в таблице 9, а результаты с использованием вторичного меченного PE антитела против Fc (человеческого или мышиного) показаны в таблице 10. Контроли I, II, III, IV и V описаны выше. MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

Таблица 7

Антитело	MFI родительских	MFI HEK 293/EGFRvIII	Отношение (MFI EGFRvIII/MFI
----------	---------------------	----------------------------	-----------------------------------

	HEK293		родительских)
Неокрашенное	3548	4005	1,1
H1H1863N2 (Fuc -)	3776	361000	95,6
H1H1863N2 (Fuc +)	3805	360000	94,6
H1H1911N	3593	55064	15,3
H1H1912N	3727	122000	32,7
H1H1913N	4801	239000	49,8
H1H1915N	3461	73413	21,2
Контроль I	3559	258000	72,5
Контроль II	3582	313000	87,4
Контроль IV	24954	439000	17,6

Таблица 8

Антитело	MFI родительских HEK293	MFI HEK 293/EGFRvIII	Отношение (MFI EGFRvIII/MFI родительских)
Неокрашенное	819	920	1,1
РЕ-антитело против человеческого IgG	1027	1106	1,1
H1H1863N2 (Fuc -)	1671	301000	180,1
H1H1911N	1812	107000	59,1
H1H2194P	981	18583	18,9
H1H2195P	1176	13517	11,5
Контроль I	1480	272000	183,8
Контроль II	1015	313000	308,4
Контроль IV	23325	354000	15,2
Контроль V	11732	997062	85,0

Таблица 9

Антитело	MFI A431	Превышение фонового
-----------------	-----------------	--------------------------------

		значения
Неокрашенное	6708	1,0
H1H1863N2 (Fuc -)	26036	3,9
H1H1911N	15984	2,4
H1H1912N	14343	2,1
H1H1915N	8440	1,2
Контроль I	9652	1,4
Контроль II	15716	2,3
Контроль III	71514	10,7
Контроль IV	962000	143,4

Таблица 10

Антитело	MFI A431	Превышение фонового значения
Неокрашенное	1314	0,9
РЕ-антитело против человеческого IgG	1428	1,0
H1H1863N2 (Fuc -)	3385	2,4
H1H1911N	3140	2,2
H1H2194P	2291	1,6
H1H2195P	2227	1,6
Контроль I	1448	1,0
Контроль II	5576	3,9
Контроль IV	395000	276,6
Контроль V	4240	3,0

Некоторые антитела против EGFRvIII демонстрировали явное предпочтение связывания клеточной линии HEK293/EGFRVIII над родительскими клетками HEK293 при выявлении с использованием либо непосредственно меченых антител против EGFRvIII (таблица 7), либо вторичного меченного РЕ антитела против человеческого IgG (таблица 8). Большинство антител при инкубировании с клетками A431 (30 минут

при 4°C) демонстрировали минимальное связывание или отсутствие связывания, за исключением контрольных антител III и IV (таблицы 9 и 10).

Пример 8: Интернализация mAb против EGFRvIII клетками HEK293/EGFRvIII

MAb против EGFRvIII (10 мкг/мл) инкубировали с клетками HEK293/EGFRvIII (см. вышеприведенный пример 7) в течение 2 часов на льду, а затем два раза промывали с помощью PBS. Затем клетки подвергали 30-минутной инкубации на льду со вторичными конъюгированными с DYLIGHT™ 488 антителами против Fab-фрагментов человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), а затем еще два раза промывали с помощью PBS. Обеспечивали интернализацию антител в течение 1 часа при 37°C в буфере для интернализации (PBS + FBS) или хранили при 4°C. Клетки фиксировали в 4% формальдегиде и ядра окрашивали красителем для ДНК DRAQ5® (Cell Signaling Technology, Inc.). Изображения получали при 40x на многопараметровой системе IMAGEXPRESS™ (Molecular Devices) и определяли количество интернализированных везикул с использованием программного обеспечения Columbus (Perkin Elmer). Результаты показаны в таблице 11 и на фиг. 3.

Таблица 11

Ab	Интенсивность флуоресценции везикул при 4°C		Интенсивность флуоресценции везикул при 37°C	
	Среднее	± SD	Среднее	± SD
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
Контроль I	21981	4613	263506	28067
Контроль II	20339	5644	615239	144397
Контроль IV	92311	19386	1078196	106073

Активную интернализацию наблюдали при 37°C для H1H1863N2, контроля II и контроля IV. Интернализацию также наблюдали для H1H1911N, H1H1912N и контроля I.

Пример 9: Связывание антитела против EGFRvIII с ксенотрансплантатом опухоли U87/EGFRvIII

Для дальнейшего определения специфичности H1H1863N2 получали линию клеток человеческой глиобластомы U87, экспрессирующих EGFRvIII, как описано для клеток HEK293/EGFRvIII в примере 7. В эксперименте использовали клетки U87, экспрессирующие $\sim 1,5 \times 10^5$ копий EGFRvIII на клетку (U87/EGFRvIII). Клетки U87/EGFRvIII (3×10^6 клеток) ксенотрансплантировали больным тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) мышам и обеспечивали рост опухолей до получения медианного размера 200-300 мм³. Затем мышам инъецировали H1H1863N2(Fuc -) или изотипический контроль через хвостовую вену. Через 10 минут, 4 часа и 24 часа после инъекции антитела мышей умерщвляли, а опухоли удаляли и помещали в PBS. Опухоли немедленно разделяли и окрашивали конъюгированным с аллофикоцианином (APC) антителом против человеческого Fc (hFc-APC). Окрашенные клетки промывали 3 раза потоком PBS, содержащим 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,1% азида натрия. Опухоли в моменты времени 10 минут и 4 часа фиксировали в течение ночи, а затем измеряли с помощью проточного цитометра. Опухоли, собранные в момент времени 24 часа, измеряли без фиксации. Все образцы собирали на ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) и определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Результаты представлены в таблице 12. Значения MFI являются средним 2-3 биологических повторностей $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 12

Время после инъекции	MFI $\pm$ SEM (U87/EGFRvIII)	
	Изотипический контроль	H1H1863N2(Fuc -)
10 минут	708 $\pm$ 4	2259 $\pm$ 115
4 часа	741 $\pm$ 34	10620 $\pm$ 2881
24 часа	664 $\pm$ 34	27923 $\pm$ 3297

По сравнению с изотипическим контролем антитело H1H1863N2(Fuc -) связывалось с опухолевыми клетками U87/EGFRvIII эффективно в зависимости от времени.

Пример 10: Связывание антитела против EGFRvIII с ксенотрансплантатом опухоли B16F10.9/EGFRvIII

Мышам SCID имплантировали пятьдесят тысяч клеток меланомы мышевидных B16F10.9 или B16F10.9, надэкспрессирующих EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII). Клетки B16F10.9/EGFRvIII получали, как описано для клеток HEK293/EGFRvIII в примере 7. Для данного эксперимента использовали клетки B16F10.9, экспрессирующие $\sim 1,5 \times 10^5$ копий EGFRvIII на клетку. Обеспечивали рост опухолей в течение приблизительно 14 дней до получения медианного размера 200-300 мм³. Затем мышам инъецировали H1H1863N2(Fuc -) или изотипический контроль через хвостовую вену. Через 10 минут, 4 часа и 24 часа после инъекции антитела мышей умерщвляли, а опухоли удаляли и помещали в PBS. Опухоли немедленно разделяли и окрашивали конъюгированным с аллофикоцианином антителом против человеческого Fc (hFc-APC). Окрашенные клетки промывали 3 раза потоком PBS (1 x PBS, 2% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,1% азида натрия), фиксировали и пермеабилizировали с использованием стандартных способов. Использовали проточную цитометрию для выявления связанного с клеточной поверхностью H1H1863N2(Fuc -) и анализ выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представлены в таблице 13 и на фиг. 4a. Для выявления как связанных с клеточной поверхностью, так и внутриклеточно связанных антител клетки окрашивали второй раз с использованием того же антитела против человеческого Fc (hFc-APC) после стадий фиксации и пермеабилзации. Это позволило выявление внутриклеточного антитела. Результаты представлены в таблице 14 и на фиг. 4b. Все образцы собирали на ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) и определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). MFI для каждого образца регистрировали после вычитания MFI неокрашенного контроля. Значения MFI являются средним двух биологических повторностей (N = 2) $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). * N = 1 для данного момента времени.

Таблица 13

Время после инъекции	MFI $\pm$ SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – окрашивание поверхности			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Изотипический контроль	H1H1863N2(Fuc -)	Изотипический контроль	H1H1863N2(Fuc -)

10 минут	74 ± 67	56 ± 2	128 ± 49	2003 ± 216
4 часа	80 ± 15	195 ± 52	54 ± 21	4224 ± 610
24 часа	79 ± 21	155 ± 42	72*	5692 ± 595

Таблица 14

Время после инъекции	MFI ± SEM (B16F10.9/EGFRvIII) – Окрашивание поверхности и внутренней части			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	Изотипический контроль	H1H1863N2(Fuc -)	Изотипический контроль	H1H1863N2(Fuc -)
10 минут	132 ± 92	117 ± 18	155 ± 44	2627 ± 192
4 часа	165 ± 22	422 ± 106	120 ± 22	7785 ± 782
24 часа	135 ± 11	281 ± 51	132*	9578 ± 852

H1H1863N2(Fuc -) эффективно связывалось с поверхностью клеток B16F10.9, экспрессирующих EGFRvIII в зависимости от времени, тогда как связывание изотипического контроля было минимальным. Повышение суммарного связывания (т.е. связывания с клеточной поверхностью и внутреннего связывания) H1H1863N2(Fuc -) по сравнению с его связыванием только с клеточной поверхностью указывало на то, что связанные с клеточной поверхностью антитела были эффективно интернализованы клетками B16F10.0.

Пример 11: Фармакокинетические параметры антител против EGFRvIII у мышей

Для определения *in vivo* селективности антител против EGFRvIII выполняли фармакокинетическое исследование с использованием мышей дикого типа («мышей WT»), в природе экспрессирующих мышиный EGFR, и гуманизированных мышей EGFR («мышей hEGFR»), экспрессирующих человеческий EGFR. Мыши были из кроссбредных линий с фоном, содержащим C57BL6 (75%) и 129Sv (25%). Каждая группа состояла из 5 мышей, либо WT, либо hEGFR. Все антитела вводили подкожно дозой 0,2 мг/кг. Кровь собирали через 0 часов, 6 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день и 30 дней после введения. Уровни человеческих антител в сыворотке крови определяли с помощью «сэндвич»-анализа ELISA. Вкратце,

поликлональным антителом козы против человеческого IgG (Fc-специфическим) (Jackson ImmunoResearch) покрывали 96-луночные планшеты при концентрации один мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C. После блокирования планшетов с помощью BSA образцы сыворотки крови в шестикратных серийных разведениях и эталонные стандарты соответствующего антител в двенадцатикратных серийных разведениях добавляли в планшет и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После промывания с целью удаления несвязанного антитела захваченные человеческие антитела выявляли с использованием того же поликлонального антитела козы против человеческого IgG (Fc-специфического), конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch) и обрабатывали стандартным колориметрическим субстратом тетраметилбензидином (TMB) согласно рекомендации изготовителя. Поглощение при 450 нм регистрировали на устройстве для считывания планшетов и вычисляли концентрацию hIgG в образцах сыворотки крови с использованием эталонной стандартной кривой, полученной с помощью планшета с образцами. Мышинные антитела против человеческих (МАНА) измеряли с использованием стандартных способов, и они, как правило, были низкими.

На фиг. 5a-5d показаны графики зависимости концентрации антител от времени для четырех тестируемых антител. Контроль IV («Mab C225»), как известно, связывается с человеческим EGFR, но не с его мышинным гомологом. Как и предполагали, это антитело демонстрировало быстрый клиренс у мышей hEGFR и медленный клиренс (т.е. отсутствие цель-опосредованного клиренса) у мышей WT (фиг. 5a). Контроль I («Mab 13.1.2»), как известно, связывается с соединительным пептидом EGFRvIII «LEEKKGNYVVDH», которого нет в человеческом или мышинном EGFR. Антитело не связывается с человеческим или мышинным EGFR *in vivo*. Как и предполагали, это антитело демонстрировало идентичные низкие фармакокинетические показатели клиренса у обоих типов мышей (фиг. 5b), и наблюдали отсутствие цель-опосредованного клиренса. Контрольное антитело III («Mab hu806») демонстрировало повышенный клиренс у мышей hEGFR по сравнению с мышами WT (фиг. 5c). Эти данные соответствуют их способности связываться с hEGFR *in vitro*, как определяли с помощью Biacore (см. пример 3, таблицу 4) и FACS (пример 7, таблица 9). На фиг. 5d показан клиренс H1H1863N2(Fuc +). Данное антитело подобно контролю I демонстрировало идентичные низкие скорости клиренса у мышей обоих типов. Таким образом, H1H1863N2 не связывается с человеческим или мышинным EGFR *in vivo*.

Пример 12: Конъюгат антитело против EGFRvIII-лекарственное средство ингибирует рост опухоли у *in vivo* моделей EGFRvIII-положительного аллотрансплантата злокачественной опухоли молочной железы

В данном примере два разных конъюгата антитело-лекарственное средство из типичного антитела против EGFRvIII H1H1863N2 тестировали по их способности ингибировать рост опухоли *in vivo*. Первый ADC получали путем конъюгации H1H1863N2 с майтанзиноидным токсином DM1 через нерасщепляемый MCC линкер (см., например, патент США № 5208020 и заявку на выдачу патента США № 2010/0129314) с получением «H1H1863N2-MCC-DM1». Второе ADC получали путем конъюгации H1H1863N2 с модифицированной версией DM1, присоединенной к новому расщепляемому линкеру, называемому «M0026» (также известному как «соединение 7» в WO 2014/145090, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), с получением «H1H1863N2-M0026». При тестировании по цитотоксичности *in vitro* по отношению к клеткам MMT/EGFRvIII H1H1863N2-MCC-DM1 демонстрировал IC₅₀ 12 нМ, тогда как H1H1863N2-7 демонстрировал IC₅₀ 0,8 нМ, исходя из эквивалентов лекарственного средства.

Для сравнения *in vivo* эффективности антител против EGFRvIII, конъюгированных с DM1 и M0026, выполняли исследования на мышах с ослабленной иммунной системой, несущих аллотрансплантаты EGFRvIII-положительной злокачественной опухоли молочной железы.

Вкратце, аллотрансплантаты опухолей устанавливали подкожной имплантацией $0,5 \times 10^6$ клеток MMT/EGFRvIII в левый бок самок мышей CB17 SCID (Taconic, Hudson, NY). Как только опухоли достигали среднего объема 140 мм³ (~ день 8), мышей рандомизировали на группы из семи особей и вводили ADC против EGFRvIII с использованием формата либо MCC-DM1, либо M0026 линкер-лекарственное средство. Также оценивали контрольные реагенты, в том числе не связывающие ADC, с использованием формата либо MCC-DM1, либо M0026 линкер-лекарственное средство и среду PBS. ADC вводили при 1 и 5 мг/кг три раза в течение одной недели и после этого контролировали до достижения среднего размера опухоли приблизительно 2000 мм³ в группе, которой вводили только среду. Для этого момента вычисляли ингибирование роста опухоли, как описано ниже.

Средний размер опухоли в отношении обработанной средой группы вычисляли следующим образом: опухоли измеряли штангенциркулями дважды в неделю до

достижения среднего размера 1000 мм³ в обработанной средой группе; размер опухоли вычисляли с использованием формулы (длина x ширина²)/2. Ингибирование роста опухоли вычисляли по следующей формуле: $(1 - ((T_{\text{конечная}} - T_{\text{начальная}})/(C_{\text{конечная}} - C_{\text{начальная}}))) * 100$, в которой Т (группа с обработкой) и С (контрольная группа) представляют среднюю массу опухоли в день достижения обработанной средой группы 1000 мм³. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15

Группа с обработкой	Конечный размер опухоли в день 8, мм ³ (среднее ± SD)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Среда PBS	2253 ± 217	0
Контроль-MCC-DM1, 1 мг/кг	2827 ± 278	- 27
Контроль-MCC-DM1, 5 мг/кг	2402 ± 256	- 7
Контроль-M0026, 1 мг/кг	2729 ± 470	- 22
Контроль-M0026, 5 мг/кг	2787 ± 503	- 25
H1H1863N2-MCC-DM1, 1 мг/кг	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1, 5 мг/кг	471 ± 227	84
H1H1863N2-M0026, 1 мг/кг	679 ± 265	74
H1H1863N2-M0026, 5 мг/кг	96 ± 34	102

Как представлено в таблице 15, наибольшее ингибирование опухоли наблюдали у мышей, которым вводили 5 мг/кг H1H1863N2-M0026, при этом наблюдали регрессию исходной опухоли. Ингибирование роста опухоли 102% в результате обработки с помощью 5 мг/кг H1H1863N2-M0026 существенно превышало наблюдаемое после обработки опухоли с помощью 5 мг/кг H1H1862N2-MCC-DM1 (83%). Преимущество ингибирования роста опухоли, индуцированной H1H1863N2-M0026, по сравнению с H1H1863N2-mcc-DM1 сохранялось также при дозе 1 мг/кг. Никакого противоопухолевого эффекта не наблюдали в группах, обработанных контрольным ADC, с использованием MCC-DM1 или M0026.

Таким образом, в данном примере продемонстрировано, что антитела против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением при введении в форме конъюгатов антитело-лекарственное средство являются высоко эффективными при ингибировании роста опухоли. Кроме того, данный пример подтверждает роль ADC в соответствии с

настоящим изобретением в фактическом обеспечении регрессии опухоли, особенно в контексте антител против EGFRvIII в соответствии с настоящим изобретением (например, H1H1863N2), конъюгированных с молекулой новый линкер/лекарственное средство M0026.

Настоящее изобретение не ограничивается объемом конкретных вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе. Более того, различные модификации настоящего изобретения вдобавок к описываемым в настоящем документе станут очевидными специалистам в данной области из вышеизложенного описания и прилагаемых графических материалов. Такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 13: Антитела против EGFRvIII-DM1 демонстрируют специфичность по отношению к экспрессирующим EGFRvIII клеткам, а также демонстрируют сильную активность киллинга клеток

В данном примере определяли способность антитела против человеческого EGFRvIII, конъюгированного с майтанзиновым токсином DM1, снижать жизнеспособность клеток с использованием *in vitro* клеточных анализов.

Непроцессированный человеческий EGFRvIII (SEQ ID NO: 147) или человеческий EGFR дикого типа (SEQ ID NO: 146) стабильно вводили в клеточные линии HEK293 (293/hEGFRvIII, 293/hEGFRwt), U251 (U251/hEGFRvIII) и MMT 060562 (MMT/hEGFRvIII). Все клетки получали методиками с использованием LIPOFECTAMINE 2000 и культивировали в полной ростовой среде в присутствии G418.

Экспрессию на клеточной поверхности EGFRwt или EGFRvIII измеряли анализом FACS. Вкратце, 1×10^6 клеток инкубировали с 10 мкг/мл антитела против EGFRvIII H1H1863N2, контрольного mAb против EGFRwt (контроля IV) или изотипического контроля в течение 30 минут на льду в буфере для разбавления антител. После двух промываний буфером для разбавления антител клетки инкубировали с 10 мкг/мл конъюгированного с PE вторичного антитела против человеческого антитела в течение 30 минут на льду. После двух дополнительных промываний образцы прогоняли на цитометре Accuri C6 (BD) или Hypercyt (Intellicyt), а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Результаты представлены в таблице 16. Н.о. = не определяли.

Таблица 16: Экспрессия на клеточной поверхности в клеточных линиях

EGFRwt и сконструированных EGFRvIII

Клеточная линия	Оцениваемое с помощью FACS связывание (превышение MFI относительно изотипического контроля)				
	Неокрашенные	Н1Н1863N2 (антитело против EGFRvIII)	Контроль IV (антитело против EGFRwt)	Только вторичное	Изотипический контроль
HEK293	1x	1x	49x	1x	1x
HEK293/hEGFRwt	1x	н.о.	332x	1x	1x
HEK293/hEGFRvIII	1x	264x	н.о.	1x	1x
U251	1x	1x	н.о.	1x	1x
U251/hEGFRvIII	1x	13x	н.о.	1x	1x
MMT/	1x	1x	н.о.	1x	1x
MMT/hEGFRvIII	1x	280x	н.о.	1x	1x

Данные результаты демонстрируют, что экспрессия на поверхности EGFRvIII была сравнима в клеточных линиях HEK293/hEGFRvIII и MMT/hEGFRvIII, тогда как уровни экспрессии U251/EGFRvIII были в приблизительно 20 раз ниже, чем в клеточных системах HEK293/hEGFRvIII и MMT/hEGFRvIII. Связывание EGFRvIII посредством Н1Н1863N2 не выявляли в родительских клеточных линиях. В отличие от этого, контрольное антитело против EGFRwt (контроль IV) связывалось с родительскими клетками HEK293 с уровнем, в 49 раз превышающим таковой изотипического контроля. Приемлемое введение вектора экспрессии EGFRwt в клетки HEK293 повышало экспрессию в 332 раза по сравнению с фоновым значением, которая была сравнима с экспрессией в клетках HEK293/hEGFRvIII и MMT/hEGFRvIII.

Селективное связывание антитела против EGFRvIII Н1Н1863N2 с EGFRvIII оценивали посредством FACS с использованием клеточных линий родительской HEK293, HEK293/hEGFRwt, HEK293/hEGFRvIII и A431. Результаты показаны в таблице 17.

Таблица 17: Специфичность связывания антитела против EGFRvIII с экспрессирующими EGFRvIII клеточными линиями

mAb	Оцениваемое с помощью FACS связывание (превышение MFI относительно изотипического контроля)			
	HEK293	HEK293/ EGFRwt	HEK293/ EGFRvIII	A431
Контроль IV (антитело против EGFRwt)	83	251	855	621
H1H1863N2 (антитело против EGFRvIII)	1	3	662	13
Изотипический контроль	1	1	1	1
Только вторичное Ab	1	1	1	1
Неокрашенные клетки	1	1	1	1

Как показано в таблице 17, как H1H1863N2, так и контрольное антитело против EGFR wt (контроль IV) демонстрировали сильное связывание (превышение фонового значения в > 650 раз) с клетками HEK293/EGFRvIII по сравнению с изотипическим контролем. В отличие от этого, H1H1863N2 слабо связывалось с клеточной линией wt-EGFR HEK293 (превышение фонового значения в три раза) и эндогенно экспрессирующей EGFR клеточной линией A431 (в 13 раз выше контроля). Контрольное антитело против EGFR wt сильно связывалось с экспрессирующими EGFR-wt клетками, подтверждая селективность H1H1863N2 по отношению к EGFRvIII, а не к EGFR дикого типа.

Затем определяли способность антитела против человеческого EGFRvIII, конъюгированного с майтанзиновым токсином DM1, снижать жизнеспособность клеток с использованием *in vitro* клеточных анализов. Клетки высевали в покрытые PDL 96-луночные планшеты при 250-2000 клеток на лунку на полную ростовую среду и обеспечивали рост в течение ночи. Для кривых жизнеспособности клеток добавляли ADC или свободное лекарственное средство (DM1-SMe) в клетки при конечных концентрациях, варьирующих от 500 нМ до 5 пМ и инкубировали в течение 3 дней. Клетки инкубировали с CCK8 (Dojindo) окончательно в течение 1-3 часов и определяли поглощение при 450 нм (OD₄₅₀) на устройстве FlexStation 3 (Molecular Devices). Для

всех лунок отнимали фоновые уровни OD₄₅₀ от обработанных дигитонином (40 нМ) клеток и жизнеспособность выражали как процентное отношение необработанных контролей. Значения IC₅₀ определяли по четырех-параметровому логистическому уравнению по 10-точечной кривой ответа (GraphPad Prism). Результаты показаны в таблицах 18А и 18В. Значения IC₅₀ выражены в нМ и нормализованы для отношения конкретное лекарственное средство/антитело (DAR).

Таблица 18А: Эффективность киллинга клеток для конъюгатов антител против EGFRvIII-DM1-лекарственное средство

Клеточная линия	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		HEK293/ hEGFRwt		U251	
ADC	IC ₅₀ (нМ)	% килли нга	IC ₅₀ (нМ)	% киллин га	IC ₅₀ (нМ)	% киллин га	IC ₅₀ (нМ)	% киллин га
H1H1863N2-MCC-DM1	> 100	90	1	97	> 100	91	48	77
Антитело против EGFRwt- MCC-DM1	76	94	0,2	97	~ 1,0	94	ND	ND
DM1-SMe	0,31	97	0,6	99	0,57	95	1,8	81
Изотипическ ий контроль- MCC-DM1	> 100	92	> 100	96	> 100	91	40	77

Таблица 18В: Эффективность киллинга клеток для конъюгатов антител против EGFRvIII-DM1-лекарственное средство

Клеточная линия	U251/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC	IC ₅₀ (нМ)	% киллинга	IC ₅₀ (нМ)	% киллинга	IC ₅₀ (нМ)	% киллинга
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	> 150	40	3	100
Антитело	ND	ND	ND	ND	ND	ND

против EGFRwt-MCC- DM1						
DM1-SMe	1,2	83	0,6	96	0,7	100
Изотипический контроль- MCC-DM1	35	76	> 150	66	NK	72

Как показано в таблицах 18A и 18B, H1H1863N2-MCC-DM1 снижает жизнеспособность клеточных линий HEK293/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII и MMT/hEGFRvIII со значениями IC_{50} , варьирующими от 1,0 до 4,0 нМ. В отличие от этого, изотипический контроль, конъюгированный с DM1, снижает жизнеспособность клеток 293/EGFRvIII и MMT/hEGFRvIII со значениями IC_{50} , превышающими 100 нМ, и клетки U251/hEGFRvIII со значениями IC_{50} 35 нМ. H1H1863N2-MCC-DM1 не оказывал влияния на клетки HEK293, экспрессирующие EGFR дикого типа (293/hEGFRwt), или на контрольные родительские клеточные линии, подтверждая специфичность по отношению к экспрессирующим EGFRvIII клеткам.

Таким образом, данный пример демонстрирует, что антитело против EGFRvIII H1H1863N2 обладает специфичностью по отношению к экспрессирующим EGFRvIII клеточным линиям и демонстрирует способность специфического киллинга клеток при конъюгировании с токсином DM1.

Пример 14: Улучшенная эффективность киллинга клеток достигается при введении конъюгата связывающегося с конформационным эпитопом EGFRvIII антитело-лекарственное средство в комбинации с конъюгатом связывающегося с соединительным пептидом EGFRvIII антитело-лекарственное средство

В данном примере определяли способность усиливать киллинг клеток путем совместного введения двух различных типов конъюгатов антитело против EGFRvIII-лекарственное средство. Для данного примера тестируемые комбинации состояли из двух разных антител против EGFRvIII: (1) специфического антитела против EGFRvIII, которое не распознавало ADC против соединительного пептида EGFRvIII (называемого в настоящем документе «конформационным связующим»); и (2) специфического антитела против EGFRvIII, которое распознавало соединительный пептид EGFRvIII (называемого в настоящем документе «связующим пептида»). Как показано в примере 6, антитело против EGFRvIII H1H1863N2 не связывается с соединительным пептидом EGFRvIII или остатками 311-326 человеческого EGFR и, поэтому, называется «конформационным связующим».

Перекрестная конкуренция *in vitro*

Сначала определяли способность H1H1863N2 перекрестно конкурировать с антителом, которые связывается с соединительным пептидом EGFRvIII, с помощью анализа конкуренции за связывание. В данном примере в качестве связывающегося с соединительным пептидом антитела против EGFRvIII использовали контроль V.

Перекрестную конкуренцию определяли с использованием анализа не требующей метки биослойной интерферометрии (BLI) в режиме реального времени на биосенсоре Octet HTX (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences). Весь эксперимент выполняли при 25°C в буфере, состоящем из 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества P20, 1,0 мг/мл BSA (буфера Octet HBST), в планшете, встряхиваемом при скорости 1000 оборотов в минуту. Для оценки наличия перекрестной конкуренции между двумя антителами за связывание с рекомбинантным человеческим EGFRvIII (hEGFRvIII.mmh; SEQ ID:152) приблизительно ~ 0,35 нм hEGFRvIII.mmh захватывали на покрытые антителом против пента-His биосенсоры Octet. Затем биосенсоры с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным антителом против EGFRvIII (далее называемым «mAb-1») путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, на 5 минут. Затем биосенсоры последовательно погружали в лунки,

содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела против EGFRvIII (далее называемого «mAb-2»), на 3 минут. Все биосенсоры промывали буфером Octet HBST между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени контролировали в ходе эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Сравнивали ответ связывания mAb-2 с hEGFRvIII, предварительного объединенного в комплекс с mAb-1, и определяли конкурирующее/неконкурирующее поведение разных моноклональных антител против EGFRvIII.

С использованием данного экспериментального формата перекрестной конкуренции выяснили, что H1H1863N2 не демонстрирует перекрестную конкуренцию с тестируемым связующим соединительного пептида EGFRvIII, равно как и не конкурирует перекрестно за связывание EGFRvIII с контролем II или контролем IV. Таким образом, результаты данного анализа перекрестной конкуренции указывают на то, что для H1H1863N2 имеется эпитоп связывания, отличный от такового для связующего соединительного пептида EGFRvIII, а также контролей II и IV.

Активность киллинга клеток отдельных конъюгатов антител против EGFRvIII-лекарственное средство

Затем оценивали способность H1H1863N2-MCC-DM1 и связывающегося с антителом против пептида EGFRvIII ADC снижать жизнеспособность клеток при введении в комбинации. Способность контроля V индуцировать киллинг клеток при конъюгировании с SMCC-DM1 (т.е. контроль V-MCC-DM1) определяли с использованием *in vitro* клеточного анализа, описываемого в примере 13. Результаты представлены в таблице 19.

Таблица 19: Эффективность киллинга клеток для конъюгатов антител против EGFRvIII-DM1-лекарственное средство

Клеточная линия	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII (высокий)		MMT		MMT/ hEGFRvIII (высокий)	
	IC ₅₀	% киллинга	IC ₅₀	% киллинга	IC ₅₀	% киллинга	IC ₅₀	% киллинга
ADC								
DM1-SMe (свободный)	0,19	98	0,25	99	0,15	100	0,18	99

DM1)								
Изотипический контроль- MCC-DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2- MCC-DM1	80	97	0,37	99	200	95	3,25	97
Контроль V- MCC-DM1	90	95	0,25	100	200	89	0,35	97

Как приводится в таблице 19, ADC против EGFRvIII снижали жизнеспособность клеток различных надэкспрессирующих EGFRvIII клеточных линий со значениями IC₅₀, варьирующими от 0,25 нМ до 3,25 нМ.

Активность киллинга клеток попарных комбинаций конъюгатов антител против EGFRvIII-лекарственное средство

Затем тестировали эффективность киллинга клеток для H1H1863N2-MCC-DM1, спаренного со связывающимся с антителом против пептида EGFRvIII ADC на надэкспрессирующих EGFRvIII клеточных линиях в отношении 1:1. Результаты показаны в таблице 20.

Таблица 20: Эффективность киллинга клеток попарных комбинаций ADC антитело против EGFRvIII-DM1

Клеточная линия		HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	IC ₅₀ (нМ)	% килл инга	IC ₅₀ (нМ)	% килл инга	IC ₅₀ (нМ)	% килл инга	IC ₅₀ (нМ)	% килл инга
H1H1863N2- MCC-DM1	отсутств ие	250	87	1,52	95	250	59	11,1	98
Контроль V- MCC-DM1	отсутств ие	100	85	0,14	98	100	67	0,7	95
H1H1863N2- MCC-DM1	Контроль V-MCC- DM1	100	91	0,19	99	200	98	0,58	100

DM1-SMe (свободный DM1)	отсутств ие	0,21	96	0,28	97	0,19	100	0,19	100
Изотипичес кий контроль- MCC-DM1	отсутств ие	200	93	95	93	150	32	100	36

Как приводится в таблице 20, комбинация H1H1863N2-MCC-DM1 (связующего конформационного эпитопа) и контроля V-MCC-DM1 (связующего соединительного пептида) в результате давала эффективность киллинга клеток, которая была по меньшей мере эквивалентной таковой при обработках только ADC или в определенных случаях сильнее таковой при обработках только ADC. Отсутствие взаимодействия между двумя типами антител предполагает эффективное применение двух неконкурирующих антител с различными цитотоксинами или различными классами цитотоксинов с разными механизмами действия.

Таким образом, данный пример демонстрирует, что H1H1863N2 не конкурирует перекрестно с контрольным связывающимся с пептидом EGFRvIII антителом. Этот уникальный эпитоп позволяет комбинировать его со связывающимися пептид EGFRvIII ADC для повышения эффективности киллинга клеток. Эта новая комбинация ADC против EGFRvIII может обеспечивать более высокую терапевтическую эффективность.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК.

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ EGFRvIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> A0020WO01

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/950,963

<151> 2014-03-11

<160> 165

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

```

caggtgcagc tggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtaaaagtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
actggacagg ggcttgagtg gatgggatgg attaacccta acagtgatta cacaggctat 180
gtacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cctccataag tacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacatcacgg 300
tggtctgaac acttcacca ctggggccag ggcaccctgg tcaactgtctc ctca      354
    
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Gln Lys Phe
 50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile 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 Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 3

<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 3
 ggatacacct tcaccagtta tgat 24

 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 4
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp
 1 5

 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 5
 attaacccta acagtgatta caca 24

 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 6
 Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr
 1 5

 <210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 7
 gcgacatcac ggtggtctga acattccac cac 33

 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

<400> 8
Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His
1 5 10

<210> 9
<211> 342
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 9
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagc acaaaccagg acagcctcct aacctactca tttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac ga 342

<210> 10
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 11
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 11
cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac

36

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 13
tgggcatct

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 14
Trp Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 15
caccaatatt atagtactcc attcact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 16
His Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 17
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 17
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc ccggagactc 60
tcctgtgtag tgtctggatt catcttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atattttatg atggaagtaa tgaatactat 180
gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctccaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagagggc 300
tacagtcagc ggtacaagta ttacttcggg atggacgtct gggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Leu Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 19
ggattcatct tcagtagcta tggc 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 20
Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 21
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 21

atattttatg atggaagtaa tgaa

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 22

Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu

1

5

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 23

gcgcgagagg gctacagtca gcggtacaag tattacttcg gtatggacgt c

51

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 24

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 25

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagcaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tcccgcacac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 26

<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Thr Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 27
cagggtatta gcagctgg 18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 28
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 29
gctgcatcc 9

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 30
Ala Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 31
caacagacta acagtttccc gctcact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 32
Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 33
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 33
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcactgggt ccgccaagct 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgccac atactatcca 180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggggattac 300
gtttggggga cttatcgtcc cctctttgac tactgggggc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 34
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 Pro Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85					90						95	
Arg	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Gly	Thr	Tyr	Arg	Pro	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 35
 ggattcccct tcagtagcta cgac 24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 36
 Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Asp
 1 5

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 37
 attggtactg ctggtgccac a 21

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 38
 Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 39
gcaagagggg attacgtttg ggggacttat cgtcccctct ttgactac 48

<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 40
Ala Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 41
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 41
gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtca gggcattaac aattatttag cctggtatca acaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaactgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcagcag cttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 42
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 43

cagggcatta acaattat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 44

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 45

gctgcatcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 46

Ala Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 47

cagcagctta atagttaccc gctcact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 48
Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 372
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 49
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agatatggca tacactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggcatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga ccagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300
ctggagatac gagatcacta ctactacggt atggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 51
ggattcacct tcagtagata tggc

24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 53
atttggcatg atggaagtaa taaa 24

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 54
Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 55
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 55
gcgagagatg gactggagat acgagatcac tactactacg gtatggacgt c 51

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 56
Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 57
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 57
gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat cggtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtactagt agttgggtgg cctgggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctacgctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aaattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacgtatta ctgccaacag tataacaggt attctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaattaa a 321

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Thr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 59
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 59
cagagtacta gtagttgg 18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 60
Gln Ser Thr Ser Ser Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 61
aaggcgtct

9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 62
Lys Ala Ser
1

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 63
caacagtata acaggtattc tcggacg

27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 64
Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 65
<211> 378
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 65
gaagtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tctgtgtcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt ccggcaagtt 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttaga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataga atagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatatc 300
catgactacg gaaaagatta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 66
<211> 126
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 66

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ala	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	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Lys	Asp	Ile	His	Asp	Tyr	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
			100					105					110		
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 67

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 68

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala
1				5			

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 69

attagttgga atagtggtag cata

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 70
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 71
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 71
gcaaaagata tccatgacta cggaaaagat tactactact actacggtat ggacgtc 57

<210> 72
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 72
Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 73
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 73
gaaattgcgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcacctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gttcaccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 74
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 74
Glu Ile Ala Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

		35					40				45								
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser				
	50					55					60								
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu				
65					70					75					80				
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Ser	Ser	Pro				
			85						90					95					
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys								
			100					105											

<210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 75
 cagagtgtta gcagcaccta t 21

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 76
 Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 77
 ggtgcatcc 9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 78
 Gly Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 79
cagcagtatg atagttcacc gatcacc

27

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 80
Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 81
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 81
caggtgcagc tgggtggaatc tgggggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gcctatgcc a tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaaaattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcta 300
atggctcgag ttactaacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc caca 354

<210> 82
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 82
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Thr
115

<210> 83
<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 83
ggattcacct tcagtgccta tgcc

24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 84
Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
1 5

<210> 85
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 85
atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 86
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 87
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 87
gcgagagatc taatggtcgg agttactaac tat

33

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 88
 Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 89
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 89
 gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtcg cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacactgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataagggttc taaccgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt caccggcagt gggtcaggca ctgatttcac actaaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttggggtc ttttactgca tgcaaggttc aactggcct 300
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 90
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 90
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Phe Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 91
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 91
 caaagcctcg tatacactga tggaaacacc tac 33

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 92
Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 93
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 93
aaggtttct

9

<210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 94
Lys Val Ser
1

<210> 95
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 95
atgcaagggtt cacactggcc tccgtacact

30

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 96
Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 97
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 97
cagggttcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc ctgcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtaactact ggagctggat ccgccagtcc 120
ccagggaagg ggttgagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaactc caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagg caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttatccctg 240
aagctgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gccatgtatt attgtgtgag aggggggtggg 300
gactactact tcggcatgga cgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 98
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Gly Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val
85 90 95
Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 99
ggtggatcct tcagtggtaa ctac 24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 100
Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr
1 5

<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 101
atcaatcatc gtggaaactc c 21

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 102
Ile Asn His Arg Gly Asn Ser
1 5

<210> 103
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 103
gtgagagggg gtgggggacta ctacttcggc atggacgtc 39

<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 104
Val Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 105
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 105
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gctgagacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct acatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt atccgtggac gttcgggcaa 300
gggaccaagg tggaatcaa g 321

<210> 106
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 106

Ala	Ile	Gln	Leu	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	Gly	Ile	Gly	Asn	Asp
			20					25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Leu	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Thr	Ser	Ser	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	Leu	Gln	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Trp
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 107
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 107

cagggcattg gaaatgat

18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 108

Gln	Gly	Ile	Gly	Asn	Asp
1				5	

<210> 109
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 109

gctacatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 110
Ala Thr Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 111
ctacaagatt acaattatcc gtggacg 27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 112
Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 113
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 113
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggagg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagtc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagttgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtatatt tctgtgagag aggggggtggg 300
acctactact acggtatgga cgtttggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 114
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 114
Gln Val Gln Leu Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 115
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 115
 ggaggggtcct tcagtgggta ctac

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 116
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 117
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 117
 atcaatcata gtggaagcac c

21

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 118
 Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 119
gcgagagggg gtgggaccta ctactacggt atggacggt

39

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 120
Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 121
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 121
gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga tatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tgatatcaa a 321

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 122
Ala 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 Gly Ile Gly Tyr Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 123
cagggcattg gatatgat 18

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 124
Gln Gly Ile Gly Tyr Asp
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 125
gctgcatcc 9

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 126
Ala Ala Ser
1

<210> 127
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 127
ctacaggatt acaattaccc gtggacg 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 128
Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 129
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 129
cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtgactact ggagctggat tcgccagtcc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaactgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggaggcggg 300
gactactact acggtatgga cgtctggggc ctagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 130
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 130
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Leu Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 131
ggtggatcct tcagtgggtga ctac

24

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 132

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp Tyr
1 5

<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 133
atcaatcata gtggaagcac c 21

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 134
Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 135
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 135
gcgagaggag gcgggggacta ctactacggt atggacgtc 39

<210> 136
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 136
Ala Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 137
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 137
gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct acatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 138
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 138
Ala 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 Gly Ile Gly Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Thr Ser Ser 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 Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 139
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 139
cagggcattg gaaatgat 18

<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 140
Gln Gly Ile Gly Asn Asp
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 141
gctacatcc 9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 142
Ala Thr Ser
1

<210> 143
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 143
ctacaagatt acaattaccc gtggacg

27

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 144
Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 145
<211> 3633
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 145
atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctccctggcg tgctggctgc gctctgcccg 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgagggtg 180
gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300
ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccac gagaaattta 420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcaagtgtcc 660
gggcgctgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtggtg tgcaggctgc 720
acaggccccc gggagagcga ctgctgtgct tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgctctac aacccaccca cgtaccagat ggatgtgaac 840
cccaggggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgctc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020
ggtattgtgt aatttaaaga ctcaactctc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacata ctctctctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaaggaa 1200
atcacagggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260

```

gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgagtc 1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
gtgataatth caggaaacaa aaattttgtgc tatgcaaata caataaaactg gaaaaaactg 1440
tttgggacct ccggtcagaa aacccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
gccacaggcc aggtctgcc tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgctgga caagtgaac 1620
cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca 1680
gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
cagtgtgccc actacattga cggccccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcacg 1800
ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtggggggccc tctcttctgct gctgggtggtg 1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040
aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgctgtcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aagggtgagaa agttaaaatt 2220
cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtagc tgcacactg gtgtgtgcag 2460
atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgtcttg tgcaccgcca cctggcagcc 2520
aggaacgtac tgggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagatttttg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
gggggtgact tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccccaaag 2880
ttcgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccag acccccagcg ctacctgtgc 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catccacag 3060
cagggtctct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tctgagctc tctgagtga 3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcat gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgtgggct ctgtgcagaa tctgtgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cgcgcccagc 3360
agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggtctc acagctgaaa atgcagaata cctaaggggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

```

<210> 146

<211> 1210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1           5           10           15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20           25           30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35           40           45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50           55           60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65           70           75           80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85           90           95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100          105          110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115          120          125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

```

	130					135				140					
His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu
145					150					155					160
Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met
				165					170					175	
Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro
			180					185					190		
Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln
		195					200					205			
Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg
	210					215					220				
Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys
225					230					235					240
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp
				245					250					255	
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro
			260					265					270		
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly
	275					280						285			
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His
	290					295					300				
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu
305					310					315					320
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val
				325					330					335	
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn
			340					345					350		
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp
		355					360					365			
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr
	370					375					380				
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu
385					390					395					400
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp
				405					410					415	
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln
		420						425					430		
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	
	435						440				445				
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser
	450					455				460					
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu
465					470					475					480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu
				485					490					495	
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro
			500					505					510		
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn
		515					520					525			
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly
	530					535					540				
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro
545					550					555					560
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro
				565					570					575	
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val
			580					585					590		
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp
		595					600					605			
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys
	610					615					620				
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly
625					630					635					640
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu

				645					650					655				
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Arg	Arg	His			
			660					665					670					
Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu			
		675					680					685						
Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu			
	690					695					700							
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser			
705					710					715					720			
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu			
			725						730					735				
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser			
			740					745					750					
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser			
		755					760					765						
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser			
	770					775					780							
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp			
785					790					795					800			
Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn			
				805					810					815				
Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg			
			820					825					830					
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Pro			
		835					840					845						
Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Ala			
	850					855					860							
Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp			
865					870					875					880			
Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp			
				885					890					895				
Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser			
			900					905					910					
Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu			
		915					920					925						
Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr			
	930					935					940							
Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys			
945					950					955					960			
Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln			
				965					970					975				
Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro			
			980					985					990					
Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp			
		995					1000											

385					390								400				
Met	Arg	Arg	Arg	His	Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu		
				405					410					415			
Gln	Glu	Arg	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro		
				420					425					430			
Asn	Gln	Ala	Leu	Leu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile		
				435					440					445			
Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp		
				450					455					460			
Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu		
465					470					475					480		
Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala		
				485					490					495			
Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly		
				500					505					510			
Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe		
				515					520					525			
Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser		
				530					535					540			
Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Tyr		
545					550					555					560		
Leu	Glu	Asp	Arg	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val		
				565					570					575			
Leu	Val	Lys	Thr	Pro	Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala		
				580					585					590			
Lys	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys		
				595					600					605			
Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr		
				610					615					620			
Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu		
625					630					635					640		
Met	Thr	Phe	Gly	Ser	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile		
				645					650					655			
Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys		
				660					665					670			
Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala		
				675					680					685			
Asp	Ser	Arg	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met		
				690					695					700			
Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met		
705					710					715					720		
His	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp		
				725					730					735			
Glu	Glu	Asp	Met	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro		
				740					745					750			
Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu		
				755					760					765			
Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp		
				770					775					780			
Arg	Asn	Gly	Leu	Gln	Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln		
785					790					795					800		

			900					905				910			
Glu	Ala	Lys	Pro	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala
		915					920					925			
Glu	Tyr	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala	
	930					935					940				

<210> 148
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 148
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 1 5 10

<210> 149
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 149
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Lys

<210> 150
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 150
 Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
 1 5 10 15
 Asp His

<210> 151
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 151
 Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 20

<210> 152
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 152
 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
 35 40 45
 Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
 50 55 60
 Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
 85 90 95
 Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
 100 105 110
 Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
 115 120 125
 Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
 130 135 140
 Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
 145 150 155 160
 Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
 165 170 175
 Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
 180 185 190
 Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
 195 200 205
 Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
 210 215 220
 Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
 225 230 235 240
 Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
 245 250 255
 Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
 260 265 270
 Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
 275 280 285
 Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
 290 295 300
 Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
 305 310 315 320
 Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
 325 330 335
 Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
 340 345 350
 Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
 355 360 365
 Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Gln Lys Leu
 370 375 380
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 385 390 395 400
 Asp Leu His His His His His His
 405

<210> 153
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 153

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5				10					15		
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr
			20				25						30		
Val	Val	Thr	Asp	His	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser
		35				40						45			
Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly
	50				55					60					
Pro	Cys	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp
65				70				75							80
Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr
				85				90						95	
Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp
			100					105						110	
Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu
		115					120					125			
Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro
		130				135					140				
Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg
145					150					155					160
Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu
				165				170						175	
Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly
			180				185						190		
Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile
	195					200						205			
Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile
	210					215					220				
Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His
225					230				235						240
Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys
				245				250						255	
Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys
			260					265					270		
Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys
	275					280						285			
Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys
	290					295					300				
Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp
305					310					315					320
Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn
				325					330					335	
Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu
			340					345					350		
Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly
		355					360					365			
Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly
	370					375					380				
Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu
385					390					395					400
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val
				405					410					415	
Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			420					425					430		
Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val

Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp	
				245					250					255		
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro	
			260					265						270		
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly	
		275					280					285				
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His	
	290					295					300					
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	
305					310					315					320	
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val	
				325					330					335		
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	
			340					345						350		
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	
		355					360							365		
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	
	370					375					380					
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	
385					390					395					400	
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	
			405					410							415	
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln		
		420						425						430		
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu		
		435					440					445				
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	
	450					455					460					
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	
465					470					475					480	
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	
				485				490						495		
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	
			500					505						510		
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	
		515					520							525		
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	
	530					535					540					
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro	
545					550					555					560	
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	
				565					570					575		
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	
			580					585						590		
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp	
		595					600							605		
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	
	610					615						620				
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	
625					630						635				640	
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	
				645					650					655		
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	
			660					665						670		
Leu	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly					
		675					680									

<210> 155

<211> 880

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 155

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5				10					15		
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln
			20					25					30		
Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe
		35					40					45			
Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				
Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys
65					70					75					80
Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val
				85					90					95	
Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn
		115					120					125			
Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu
	130					135					140				
His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu
145					150					155					160
Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met
				165					170					175	
Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro
			180					185					190		
Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln
		195					200					205			
Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg
	210					215					220				
Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys
225					230					235					240
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp
				245					250					255	
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro
			260					265					270		
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly
		275					280					285			
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His
	290					295					300				
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu
305					310					315					320
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val
				325					330					335	
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn
			340					345					350		
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp
		355					360					365			
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr
	370					375					380				
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu
385					390					395					400
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp
				405					410					415	
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	
			420					425				430			
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	
			435				440				445				
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser
	450					455					460				
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu
465					470					475					480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu

				485					490					495			
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro		
			500					505					510				
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn		
		515					520					525					
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly		
	530					535					540						
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro		
545					550					555					560		
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro		
				565					570					575			
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val		
			580					585					590				
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp		
		595				600						605					
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys		
	610					615					620						
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly		
625					630					635					640		
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro		
				645					650					655			
Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser		
			660					665					670				
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu		
		675					680					685					
Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro		
	690					695					700						
Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala		
705					710				715						720		
Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val		
				725					730					735			
Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe		
			740					745					750				
Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr		
		755					760					765					
Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu		
	770					775					780						
Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys		
785					790					795					800		
Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn		
				805					810					815			
Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp		
			820					825					830				
Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys		
		835					840					845					
Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly		
	850					855					860						
Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys		
865					870					875					880		

<210> 156

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 156

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys		
1				5				10						15			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
			20					25					30				

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	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	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	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> 157

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 157

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Lys	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys

Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
210						215					220				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310				315						320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											

<210> 159
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Arg or Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Gly or Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asp, Gly, Ile or absent

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Tyr, Leu, His or absent

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Val, Glu, Asp, Met or absent

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Trp, Ile, Tyr, Val or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Gly or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = Thr, Asp, Lys, Gly or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = His, Asp, Thr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)...(11)
<223> Xaa = Tyr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Tyr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)...(13)
<223> Xaa = Tyr or Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)...(14)
<223> Xaa = Arg or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Pro, Tyr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Leu, Gly or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)...(17)
<223> Xaa = Phe, Met or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (18)...(18)

<223> Xaa = Asp or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (19)...(19)

<223> Xaa = Tyr, Val or absent

<400> 159

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10						15	
Xaa	Xaa	Xaa														

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln, Leu or Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Leu, Tyr, Asp or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asn, Asp, Tyr or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, Arg, Asn or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Tyr, Ser or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Pro or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Pro or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)...(9)
<223> Xaa = Leu, Arg, Ile, Trp or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Thr

<400> 160
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 161
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)...(2)
<223> Xaa = Phe or Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = Pro, Thr or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Phe

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Ser or Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = Ser, Arg, Asp, Gly or Ala

<220>

<221> VARIANT
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Tyr or Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Asp, Gly, Ala or Tyr

<400> 161
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)...(2)
<223> Xaa = Gly, Trp, Ser or Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = His, Trp, Tyr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Thr, Asp, Asn or His

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Ala, Gly or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = Gly or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Ala, Asn or Ser

<220>
<221> VARIANT

<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Thr, Lys or Ile

<400> 162
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)...(2)
<223> Xaa = Gly or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = Ile, Thr, Val or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Asn, Ser, Gly or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Asn, Ser or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = Thr or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Asp or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Gly or absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Asn or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Thr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Tyr, Trp or Asp

<400> 163

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 164

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ala, Lys or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ala, Thr or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ser

<400> 164

Xaa Xaa Xaa
1

<210> 165

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 165

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
1 5 10 15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим EGFRvIII, при этом антитело или его фрагмент не связывается ни с

(i) соединительным пептидом SEQ ID NO: 148, ни с

(ii) пептидом SEQ ID NO: 165.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом антитело или его фрагмент характеризуются равновесной константой диссоциации (K_D) для димера человеческого EGFRvIII приблизительно 50 нМ или меньше, приблизительно 20 нМ или меньше, приблизительно 10 нМ или меньше, приблизительно 5,0 нМ или меньше, приблизительно 1,0 нМ или меньше или приблизительно 0,5 нМ или меньше, как измерено анализом поверхностного плазмонного резонанса.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, при этом антитело или его фрагмент характеризуются K_D в отношении димера человеческого EGFRvIII, превышающей таковую димера EGFRvIII по меньшей мере в приблизительно 4 раза, по меньшей мере в приблизительно 10 раз, по меньшей мере в приблизительно 50 раз, по меньшей мере в приблизительно 100 раз, по меньшей мере в приблизительно 500 раз, по меньшей мере в приблизительно 1000 раз, по меньшей мере в приблизительно 2000 раз или по меньшей мере в приблизительно 3000 раз, как измерено анализом поверхностного плазмонного резонанса.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, при этом антитело или его фрагмент не связываются с димером EGFR при уровне, выявляемом анализом поверхностного плазмонного резонанса.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), и при этом HCVR содержит три определяющие комплементарность области (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, а LCVR содержит три CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, в которых HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36, 38 и 40, соответственно.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп. 5 или 6, при этом LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46 и 48, соответственно.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим EGFRvIII, при этом антитело или его фрагмент содержит комбинацию HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128 и 132/134/136/140/142/144.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114 и 130.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122 и 138.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122 и 130/138.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 34/42.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом в EGFRvIII, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 12.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с EGFRvIII с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по п. 12.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, при этом цитотоксин выбран из группы, состоящей из биотоксинов, химиотерапевтических средств и радиоизотопов.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, при этом цитотоксин выбран из группы, состоящей из майтанзиноидов, ауристатинов, томаймицинов,

дуокармицинов, ^{225}As , ^{227}Th и каких-либо их производных.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных терапевтических средств, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтического средства, противовоспалительных средств и анальгетиков.

20. Способ лечения злокачественной опухоли или опухоли, экспрессирующей EGFRvIII, предусматривающий введение субъекту при необходимости этого терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 18.

21. Способ по п. 20, при этом злокачественная опухоль или опухоль выбрана из группы, состоящей из глиобластомы, протоковой или внутрипротоковой карциномы молочной железы, немелкоклеточных карцином легкого, карцином яичника, злокачественной опухоли предстательной железы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

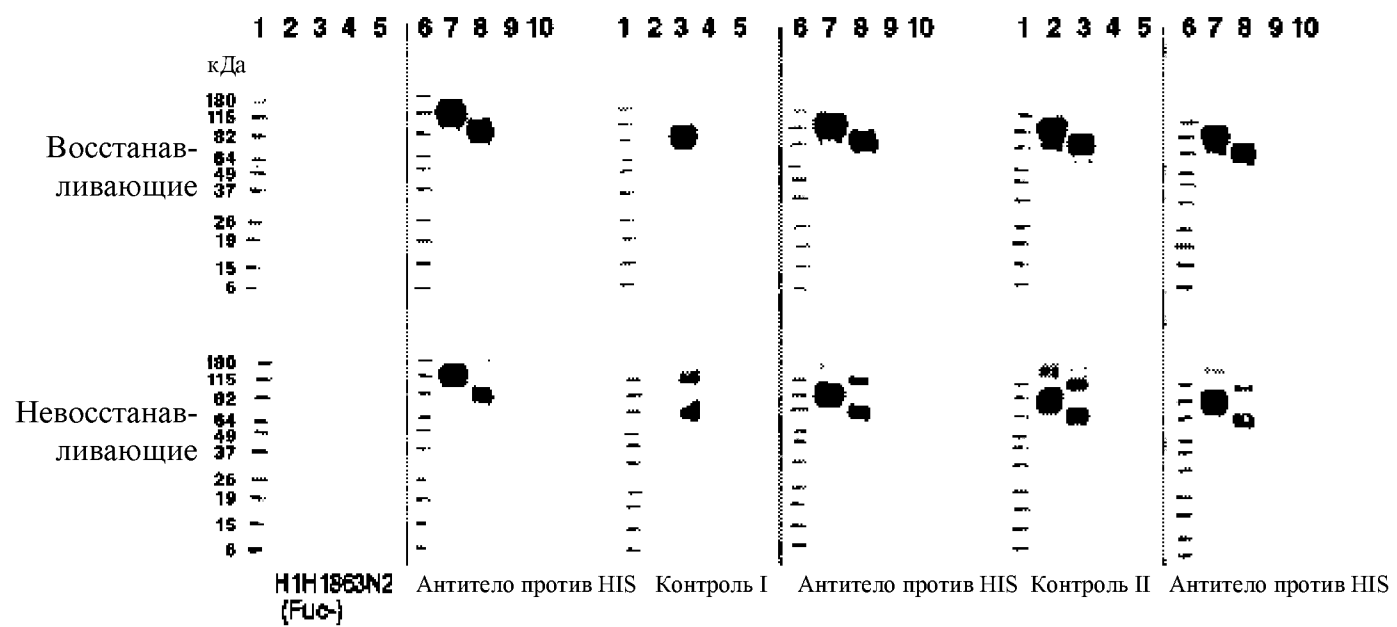
22. Способ лечения злокачественной опухоли со снижением роста опухоли и/или обеспечением регрессии опухоли у больного, при этом способ предусматривает введение больному при необходимости этого первого конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксин, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого ADC специфично связывается с EGFRvIII, но не связывается с соединительным пептидом SEQ ID NO: 148 или пептидом SEQ ID NO: 165.

23. Способ по п. 22, при этом способ дополнительно предусматривает введение больному второго ADC, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксин, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент второго ADC специфично связывается с EGFRvIII, а также связывается с соединительным пептидом SEQ ID NO: 148 и/или пептидом SEQ ID NO: 165.

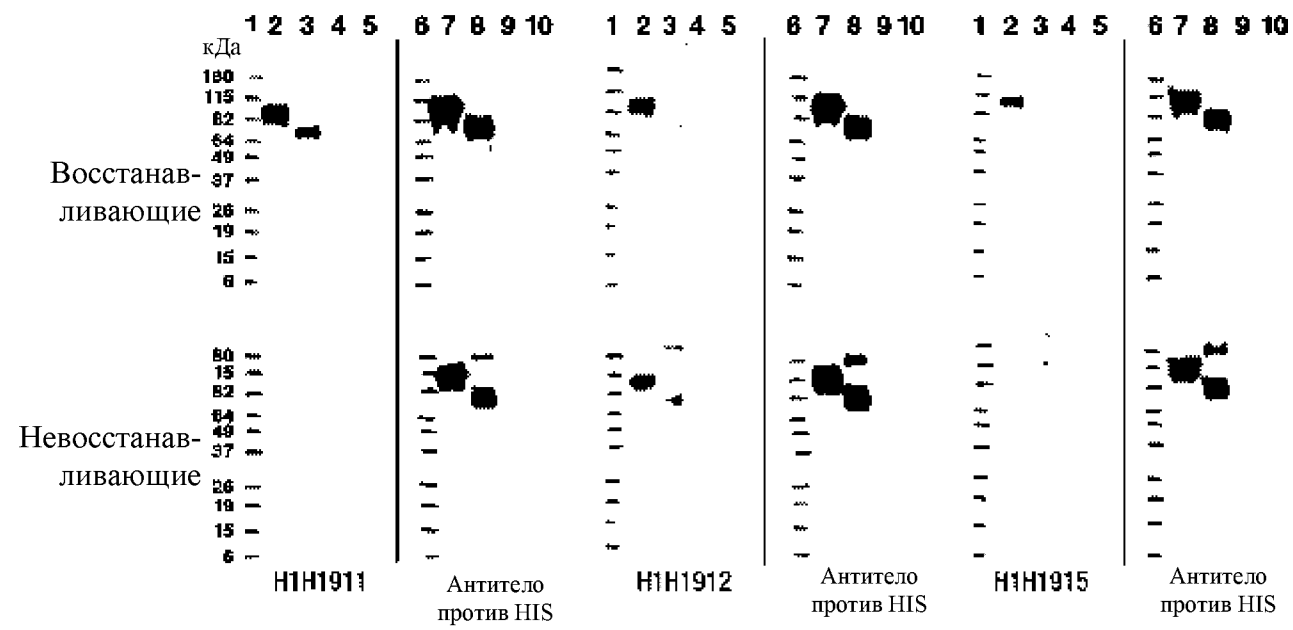
24. Способ по п. 22, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого ADC содержит определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 и 48.

25. Способ по п. 24, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент первого ADC содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 42.

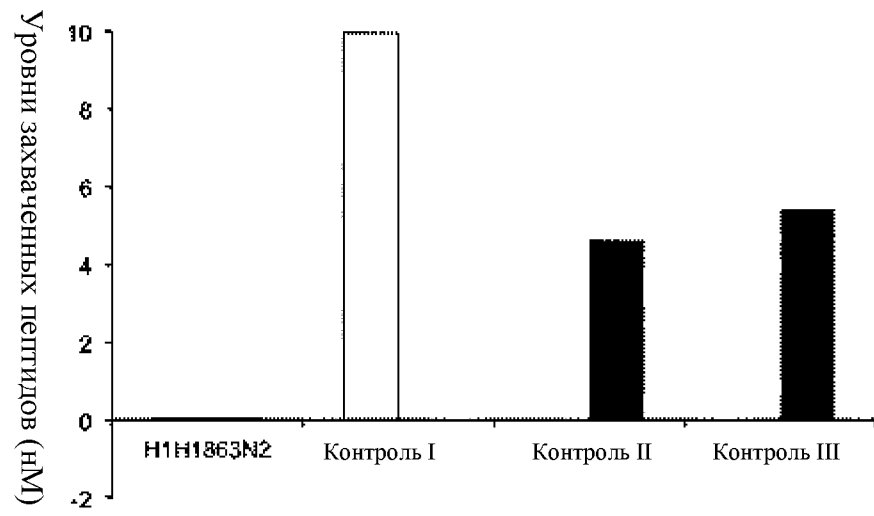
Фиг. 1А

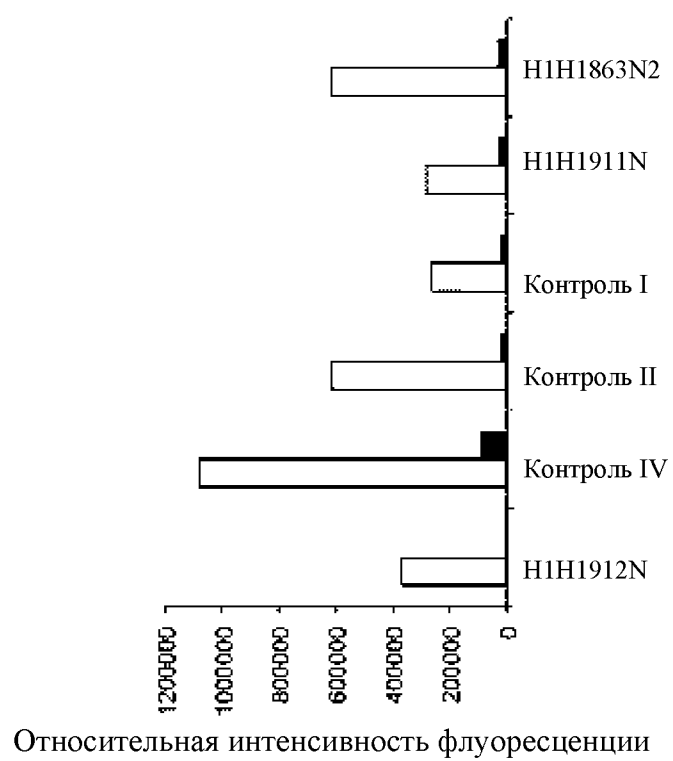


Фиг. 1В



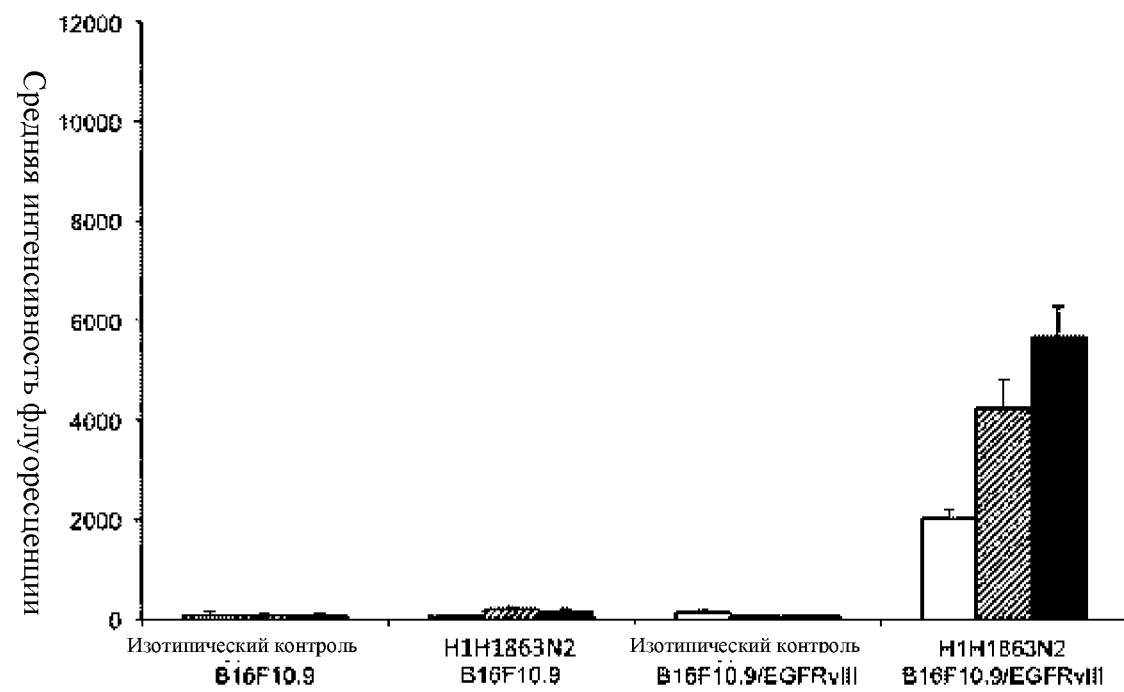
Фиг. 2



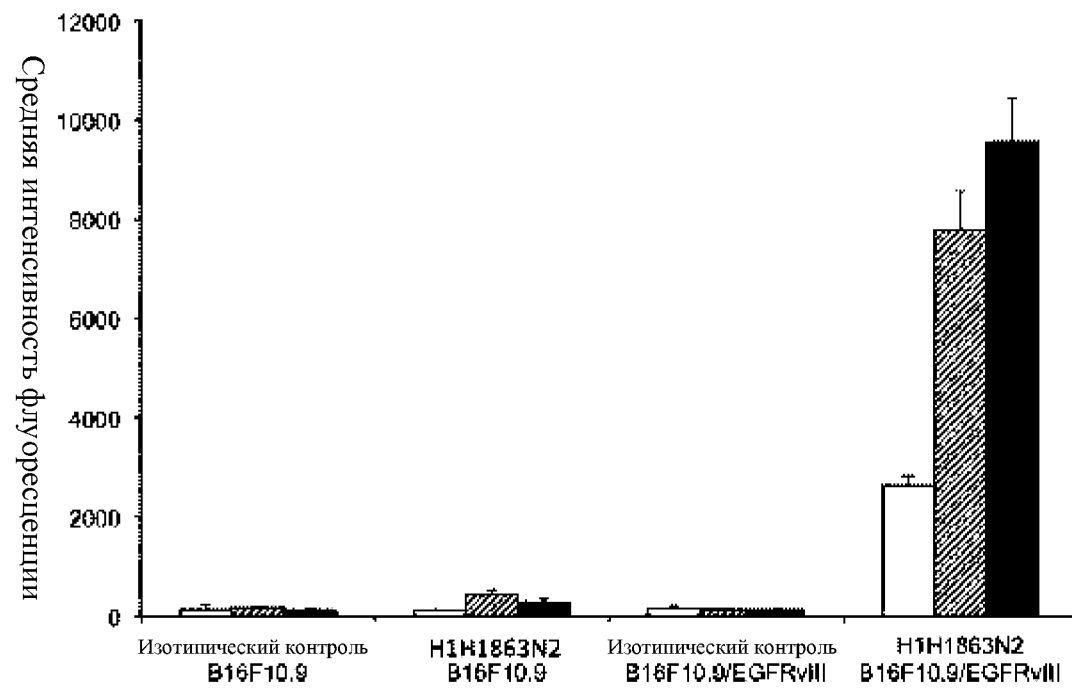


Фиг. 3

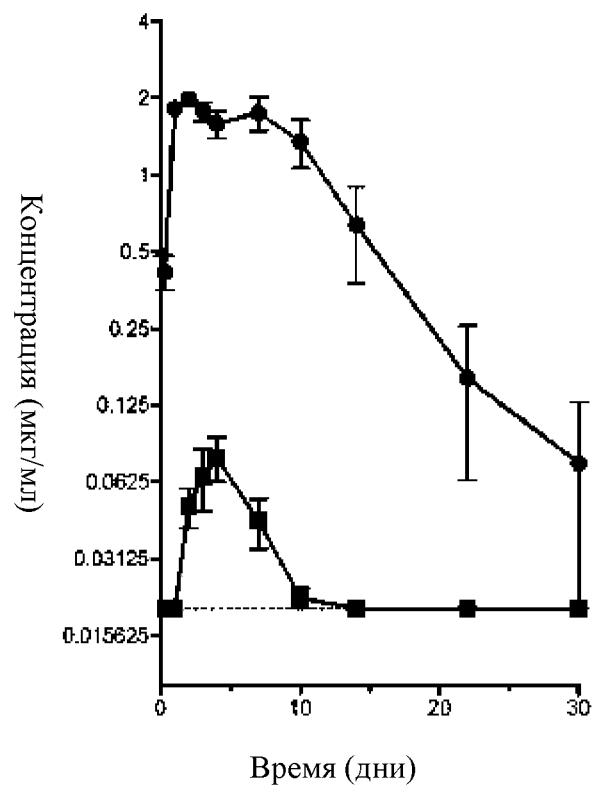
Фиг. 4А



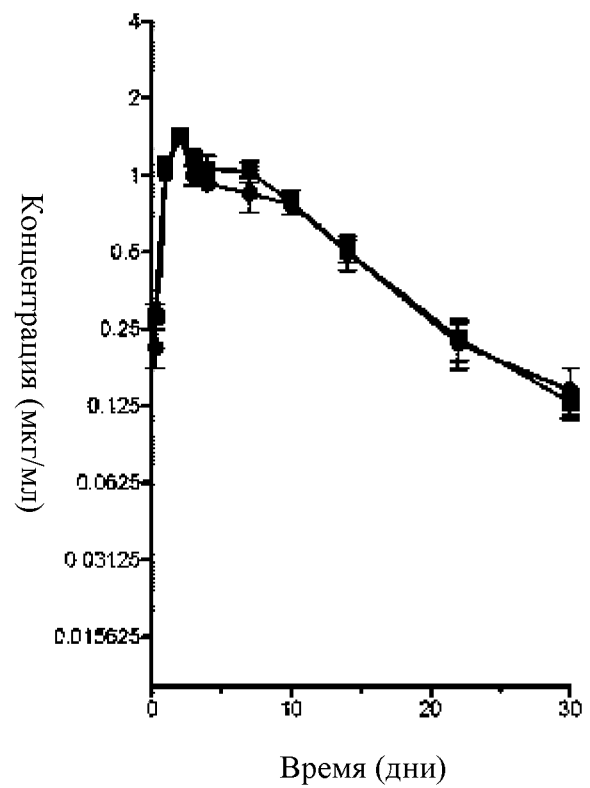
Фиг. 4В



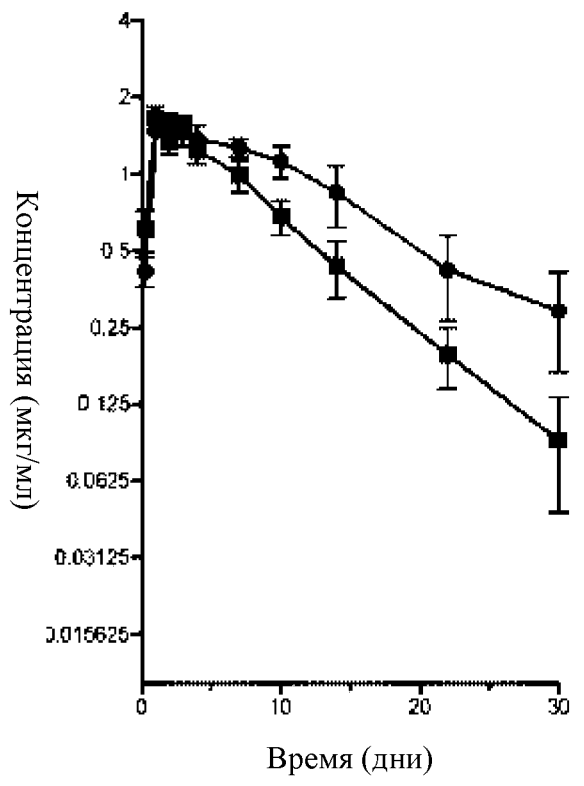
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 5D

