

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201900312 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2017.11.28

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 31/565 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРОЛАКТИН-РЕЦЕПТОР ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) 62/427,534

(32) 2016.11.29

(33) US

(86) PCT/US2017/063476

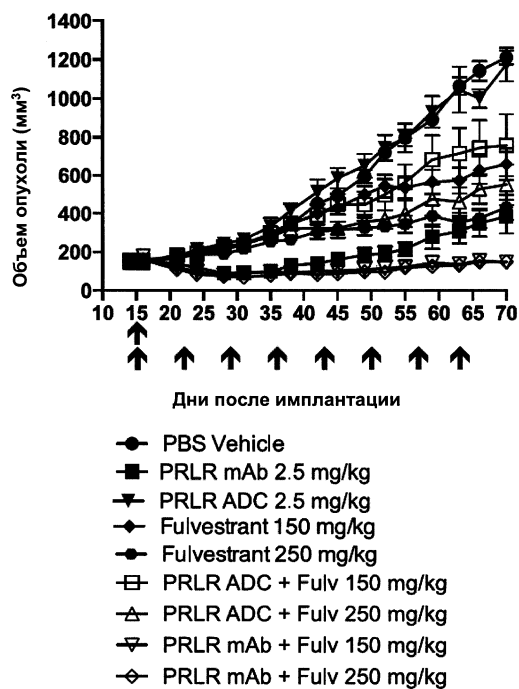
(87) WO 2018/102304 2018.06.07

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Келли Маркус, Киршнер Джессика Р.,
Терстон Гэвин (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(57) В настоящем документе представлены способы лечения рака молочной железы, положительного по отношению к рецептору пролактина, с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело к рецептору пролактина или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с цитотоксическим агентом. В некоторых вариантах осуществления антитело к рецептору пролактина или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с майтанзиноидом. В определенных вариантах осуществления способ лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы включает введение конъюгата АЛС в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами.



A1

201900312

201900312

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРОЛАКТИН-РЕЦЕПТОР ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к способам лечения пролактин-рецептор положительных опухолей молочной железы с использованием (а) конъюгата антитело-лекарственное средство, включающего антитела к рецептору анти-пролактина, конъюгированные с цитотоксическим средством, и (b) фулвестранта.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей представляется одновременно со спецификацией в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «10314P1-US_SeqListing.txt», дата создания которого 29 ноября 2016 года, и размер около 144 КБ. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном документе ASCII, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ в виде ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Пролактин представляет собой полипептидный гормон роста, который проявляет свою активность, взаимодействуя с рецептором пролактина (PRLR). Рецептор пролактина представляет собой один трансмембранный рецептор, принадлежащий к суперсемейству цитокиновых рецепторов класса 1. Связывание пролактина с рецептором пролактина приводит к димеризации рецептора и внутриклеточной передаче сигналов. Передача сигналов через рецептор пролактина связана с различными процессами, такими как развитие молочной железы, лактация, репродукция и иммуномодуляция. Кроме того, высокие уровни экспрессии рецептора пролактина были обнаружены в молочной железе, простате и других типах опухолей.

[0004] Блокада передачи сигналов рецепторов пролактина предложена в качестве средства для лечения рака молочной железы и простаты (См., например, Damiano and Wasserman, Apr. 2013, Clin. Cancer Res. 19(7):1644-1650). Антитела к рецептору анти-пролактина упоминаются, например, патентах США № 9,302,015, 7,867,493, и 7,422,899. Тем не менее, в данной области существует потребность в новых способах лечения рака и других расстройств, связанных с экспрессией и/или передачей сигналов рецепторов пролактина.

[0005] Данное изобретение направлено на преодоление одной или нескольких проблем, обсуждаемых выше.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем документе представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие полностью человеческие моноклональные антитела к рецептору антипролактина и их антигенсвязывающие фрагменты, конъюгированные с цитотоксическим агентом. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть полезны для лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы, и особенно полезны при использовании в качестве комбинированной терапии с фулвестрантом.

[0007] В одном аспекте предложен способ лечения PRLR-положительного рака молочной железы, включающий совместное введение пациенту терапевтически эффективного количества: (a) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или антигенсвязывающий фрагмент его конъюгированный с цитотоксическим агентом, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR) и (b) фулвестранта.

[0008] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид.

[0009] В другом аспекте предложен способ лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы у пациента, включающий совместное введение пациенту терапевтически эффективного количества: (a) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с майтанзиноидом, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR), и (b) фулвестранта.

[0010] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой DM1 или DM4.

[0011] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство убивает клетки, которые экспрессируют рецептор пролактина при уровне экспрессии менее чем в 30 раз выше фонового, например, при уровне экспрессии менее чем в 20 раз выше фонового. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство убивает клетки, которые экспрессируют рецептор пролактина на уровне экспрессии, более чем в 12 раз выше фонового, но менее чем в 30 раз выше фонового.

[0012] В другом аспекте предложен способ лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы у пациента, включающий совместное введение пациенту терапевтически эффективного количества: (a) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с DM1 через линкер MCC,

при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR), и (b) фулвестранта.

[0013] В некоторых вариантах осуществления пациент ранее лечился ингибитором рецептора эстрогена.

[0014] Описанное здесь лечение пролактин-рецептор положительного рака молочной железы с помощью конъюгата антитело-лекарственное средство может иметь один или несколько из следующих эффектов, среди прочего: конъюгат антитело-лекарственное средство может ингибировать опосредованную пролактином активность STAT5; конъюгат антитело-лекарственное средство может вызывать митотическую остановку в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина; и/или конъюгат антитело-лекарственное средство может ингибировать рост клеток, экспрессирующих рецептор пролактина.

[0015] В другом аспекте в настоящем документе представлен способ уничтожения опухолевых клеток, которые экспрессируют низкие уровни рецептора пролактина, причем способ включает контактирование клеток: (a) с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с цитотоксическим агентом, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR) и (b) с фулвестрантом. В некоторых вариантах осуществления опухолевые клетки экспрессируют менее 1 миллиона копий рецептора пролактина на клетку. В некоторых вариантах осуществления опухолевые клетки экспрессируют от 300 до 500000 копий рецептора пролактина на клетку.

[0016] В другом аспекте в настоящем документе представлен способ уничтожения опухолевых клеток, которые экспрессируют низкие уровни PRLR, причем способ включает контактирование клеток с: (a) конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент его конъюгированный с майтанзиноидом, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR) и (b) фулвестрант.

[0017] Антитела, используемые в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, могут быть полноразмерными, например, антитела IgG1 или IgG4, или могут содержать только антигенсвязывающую часть, например, Fab, F(ab')₂, или фрагмент scFv, и могут быть изменены с тем, чтобы воздействовать на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., (2000), J. Immunol. 164: 1925-1933).

[0018] В настоящем документе предлагаются способы использования конъюгата антитело-лекарственное средство, включающего антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают рецептор пролактина человека (PRLR). Конъюгаты антитело-лекарственное средство

полезны, среди прочего, для направленного воздействия на опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор пролактина

[0019] Описанные здесь полезные типичные антитела к рецептору анти-пролактина перечислены в Таблицах 1 и 2. В Таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) типичных антител к рецептору анти-пролактина. В Таблице 2 приведены идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 типичных антител к рецептору анти-пролактина.

[0020] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие последовательности переменных областей тяжелой цепи, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0021] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие последовательности переменных областей легкой цепи, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0022] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие пару аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи (HCVR/LCVR), включающую любую из аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи, перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство, применимые в настоящем документе, включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включающие пару аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи/переменных

областей легкой цепи, содержащуюся в любом из антител к рецептору анти-пролактина, приведенных в качестве примера в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи/переменных областей легкой цепи выбрана из группы, состоящей из 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378.

[0023] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0024] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0025] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0026] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR1 легкой цепи (LCDR1), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0027] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR2 легкой цепи (LCDR2), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0028] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие CDR3 легкой цепи (LCDR3), включающие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1, или их по существу схожую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0029] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), включающих любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из примеров антител к рецептору анти-пролактина, перечисленных в Таблице 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, включающей 24/32; 72/80; 280/288; 296/304; и 376/384.

[0030] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие набор из шести областей, определяющих комплементарность (*m.e.*, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из примеров антител к рецептору анти-пролактина, перечисленных в Таблице 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, включающей 20-22-24-28-30-32; 68-70-72-76-78-80; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304; и 372-374-376-380-382-384.

[0031] В связанном варианте осуществления описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включающие набор из шести областей, определяющих комплементарность (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой любым из типичных антител к рецептору анти-пролактина, перечисленных в Таблице 1. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают рецептор пролактина, включают набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, включающей 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378. Методы и способы идентификации областей, определяющих комплементарность в аминокислотных последовательностях переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации переменных областей цепи в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Примерные соглашения, которые могут быть использованы для идентификации границ областей, определяющих комплементарность, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является компромиссом между подходами 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). Имеются также общедоступные базы данных для идентификации областей, определяющих комплементарность в антителе.

[0032] Также предоставлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к рецептору анти-пролактина, или их части, которые полезны в описанных здесь способах. Например, предоставлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из переменных участков аминокислотных последовательностей, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей областей тяжелой цепи нуклеиновой кислоты, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности. В другом Примере представлены молекулы нуклеиновой кислоты,

кодирующие любую из аминокислотных последовательностей областей легкой цепи нуклеиновой кислоты, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей областей легкой цепи нуклеиновой кислоты, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0033] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0034] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0035] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0036] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую

последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0037] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0038] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности.

[0039] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи включает набор из трех вариабельных областей цепи (*т.е.*, HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 определяется любым из типичных антител рецептора анти-пролактина, перечисленных в Таблице 1.

[0040] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи включает набор из трех областей, определяющих комплементарность (*т.е.*, LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 определяется любым из типичных антител рецептора анти-пролактина, перечисленных в Таблице 1.

[0041] В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие и вариабельную область тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи включает любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 1, и вариабельная область легкой цепи включает любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи, перечисленных в Таблице 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную

последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты вариабельной области легкой цепи, перечисленных в Таблице 2, или их по существу схожую последовательность, имеющую в по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность их последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует и вариабельную область тяжелой цепи, и вариабельную область легкой цепи, причем и вариабельная область тяжелой цепи, и вариабельная область легкой цепи получены из одного и того же антитела к рецептору анти-пролактина, указанного в Таблице 1.

[0042] Здесь также представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела рецептору анти-пролактина. Например, рекомбинантные экспрессирующие векторы могут содержать любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, то есть молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи и/или области, определяющей комплементарность, как указано в Таблице 1. В настоящем документе также представлены клетки-хозяева в какие такие векторы были введены, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и извлечения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

[0043] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела к рецептору анти-пролактина, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых аспектах может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, в котором отсутствует фукозная составляющая, присутствующая в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC). 277: 26733). В других вариантах осуществления может выполняться модифицирование галактозилирования, для того чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

[0044] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, в которой конъюгат

антитело-лекарственное средство содержит рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфически связывает рецептор пролактина, конъюгированный с цитотоксическим агентом, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте композиция представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий комбинацию антитела к рецептору анти-пролактина, конъюгированного с цитотоксическим агентом, и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируется с антителом к рецептору анти-пролактина, например, фулвестрант. Конъюгаты антитело-лекарственное средство могут содержать антитело к рецептору анти-пролактина, конъюгированное с цитотоксическим агентом, например, с майтанзиноидом. В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой DM1 или DM4. Примерные варианты комбинированной терапии, совместные составы и конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие антитела к рецептору анти-пролактина, используемые в способах, представленных в настоящем документе, раскрыты в другом месте настоящего изобретения.

[0045] В еще одном аспекте предоставлены терапевтические способы уничтожения опухолевых клеток или ингибирования или ослабления роста опухолевых клеток с использованием антитела к рецептору анти-пролактина или антигенсвязывающей части антитела, как предоставлено в настоящем документе. Терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества описанной здесь фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, пациенту, страдающему пролактин-рецептор положительным раком молочной железы, в дополнение к лечению фулвестрантом.

[0046] Описанные здесь полезные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают антитела к рецептору анти-пролактина, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в последовательности MNECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMM (SEQ ID NO: 405, что соответствует аминокислотам с 72 по 102 из SEQ ID NO: 404).

[0047] В данном документе представлен пептид, который содержит аминокислотную последовательность, аналогичную последовательности фрагмента, имеющего не более 102 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ. ID NO: 404. В связанном аспекте фрагмент находится в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 из SEQ ID NO: 404). Также предоставлен пептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности, аналогичной последовательности фрагмента, имеющего не более 102 аминокислот аминокислотной

последовательности SEQ. ID NO: 404. В связанном аспекте фрагмент находится в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 из SEQ ID NO: 404). Кроме того, представлен пептид, который состоит из аминокислотной последовательности, аналогичной последовательности фрагмента, имеющего не более 102 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ. ID №: 404. В связанном аспекте фрагмент находится в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 из SEQ ID NO: 404). В другом связанном аспекте фрагмент выбран из группы, состоящей из (a) аминокислот с 72 по 94 SEQ ID NO: 404; (b) аминокислот с 72 по 95 SEQ ID NO: 404; (c) аминокислот с 96 по 101 из SEQ ID NO: 404; и (d) аминокислоты 96 по 102 из SEQ ID NO: 404. Пептид может быть изготовлен синтетическим способом или выделен.

[0048] В настоящем документе также предоставлена композиция, включающая пептид, который содержит аминокислотную последовательность, аналогичную последовательности фрагмента, содержащего не более 102 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ. ID NO: 404. В связанном аспекте фрагмент находится в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 из SEQ ID NO: 404). Здесь также представлены способы обнаружения присутствия и/или количества специфических антител к пептиду в образце, причем способ включает контакт образца с композицией и обнаружение присутствия и/или измерение количества специфических антител, связанных с композицией. В связанном аспекте пептид связан с твердой подложкой. В другом связанном аспекте пептид метят, например, ферментной, флуоресцентной, биотиновой или радиоактивной меткой.

[0049] В данном документе также представлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, аналогичную последовательности фрагмента, имеющего не более 102 аминокислот аминокислотной последовательности SEQ. ID NO: 404. В связанном аспекте фрагмент находится в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 из SEQ ID NO: 404).

[0050] Также в настоящем документе представлен пептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ. ID №: 405 Также предоставлен пептид, который состоит по существу из аминокислотной последовательности SEQ. ID NO: 405 Далее предоставлен пептид, который состоит из аминокислотной последовательности SEQ. ID NO: 405 Пептид может быть изготовлен синтетическим способом или выделен.

[0051] Другие варианты осуществления станут понятны из обзора последующего подробного описания

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

[0052] ФИГ. 1А и 1В демонстрируют антитела H1H6958N2 и H1H6958N2-DM1, блокирующие связывание рецептора пролактина с пролактином (PRL). Рецепторы пролактина человека (А) или обезьяны (В) связывали с захваченным пролактином со значениями EC_{50} 4,9 нмоль и 5,7 нмоль соответственно (сплошные квадраты во вставках в А и В). Антитела H1H6958N2-DM1 (сплошные кружки) и H1H6958N2 (незакрашенные кружки) блокировали связывание рецептора пролактина человека и обезьяны с пролактином. В частности, антитела H1H6958N2-DM1 и H1H6958N2 блокировали связывание 10 нмоль рецептора пролактина человека с пролактином со значениями IC_{50} 4,4 нмоль и 5,0 нмоль соответственно (А). Аналогично, антитела H1H6958N2-DM1 и H1H6958N2 блокировали связывание 10 нмоль рецептора пролактина обезьяны с пролактином со значениями IC_{50} 4,2 нмоль и 5,8 нмоль соответственно (В). Как контрольный конъюгат АЛС (сплошные треугольники), так и контрольный mAb (открытые треугольники) не выявили блокады при идентичных условиях анализа (А, В). Молярность указывает концентрацию антител для ADC и mAb. Столбики ошибок представляют стандартное отклонение.

[0053] ФИГ. 1С показывает клетки HEK293/PRLR/STAT5-Luc, обработанные увеличивающимися концентрациями пролактина (звездочки), что приводит к увеличению люминесценции (обозначено как RLU), что указывает на опосредованную передачей сигнал рецептора пролактина индукцию экспрессии люциферазы (С). В присутствии постоянной концентрации 2 нмоль пролактина увеличивающиеся концентрации (от 3,3 до 200 нмоль) антитела H1H6958N2-DM1 (заштрихованные кружки) или антитела H1H6958N2 (закрашенные кружки) блокировали управляемую рецептором пролактина экспрессию люциферазы со значениями IC_{50} 0,4 нмоль для обоих антител. Не связывающий контрольный конъюгат АЛС (закрытые треугольники) и неконъюгированный контрольный mAb (серые открытые треугольники) не блокировали опосредованную пролактином передачу сигналов рецептора пролактина в идентичных условиях анализа. Показаны данные по среднему значению и стандартному отклонению. RLU: относительные световые единицы. Ось х указывает молярную концентрацию конъюгата АЛС или mAb, за исключением кривой реакции на дозу пролактина, где указана молярная концентрация пролактина.

[0054] ФИГ. 2А, 2В, 2С и 2D демонстрируют активность антитела H1H6958N2-DM1 против опухолей MCF7 и опухолей MCF7/PRLR *in vivo*. Голые мыши NCr с установленными

опухолями MCF7 или MCF7/PRLR получали антитела H1H6958N2-DM1 и контроли. Линейные графики отображают динамику среднего объема опухоли $\pm$ стандартная погрешность среднего на группу. Стрелка указывает на день дозирования. Результаты исследования с однократной дозой опухоли MCF7 (A) и результаты исследования с многократными дозами опухоли MCF7 (q7dx3) (B). Результаты исследования с одной дозой MCF7/PRLR (C) и результаты исследования с многократными дозами MCF7/PRLR (q7dx3) (D).

[0055] ФИГ. 3А, 3В и 3С демонстрируют, что антитело H1H6958N2-DM1 эффективно против опухолей T47Dv11 и обладает комбинированной активностью с фулвестрантом. Мыши SCID с установленными опухолями T47Dv11 получали антитела H1H6958N2-DM1 и контроли. Опухоль T47Dv11 представляет собой онкогенный вариант родительских клеток T47D, полученных путем пассирования *in vivo*. Линейные графики отображают динамику среднего объема опухоли $\pm$ стандартная погрешность среднего на группу. Результаты исследования с однократной дозой (A) и результаты исследования с многократными дозами (q7dx3) (B). Результаты исследования с однократной дозой комбинации антитела H1H6958N2-DM1 и фулвестранта (C).

[0056] На ФИГ. 4 показана активность еженедельного лечения фулвестрантом ксенотрансплантатов опухоли T47DvII.

[0057] ФИГ. 5 демонстрирует, что антитело H1H6958N2-DM1 опосредует остановку митоза при опухолях T47Dv11. ИHC для фосфо-гистона H3 (PHN3) использовали в качестве маркера клеток, накапливающихся в митотическом состоянии. Процент PHN3-положительных ядер определяли количественно для каждой обработки.

[0058] ФИГ. 6А и 6В демонстрируют, что антитело H1H6958N2-DM1 активно в опухолях TM00107 PDX (Jackson Labs). Мышей NSG с установленными опухолями TM00107 лечили PRLR-конъюгатами АЛС и контролями. Линейные графики отображают динамику среднего объема опухоли $\pm$ стандартная погрешность среднего на группу. Стрелка указывает на день дозирования. Результаты многодозового (q7dx4) исследования (A) и изменения объема опухоли на 30-й день в многодозовом исследовании (B).

ОПИСАНИЕ

[0059] Прежде чем описывать настоящие композиции и способы, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными композициями и способами, и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы, композиции и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не является

ограничивающей, так как объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой Формулой изобретения.

[0060] Если не дано иное определение, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это изобретение. Используемый здесь термин «около» при употреблении в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[0061] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны здесь, могут использоваться на практике или при тестировании раскрытого здесь объекта изобретения, в настоящее время описаны примерные способы и материалы.

Определения

[0062] Выражение «рецептор пролактина» (PRLR) и т.п., используемое в настоящем документе, относится к человеческому рецептору пролактина, содержащему аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 404. Выражение «рецептор пролактина» включает как мономерные, так и мультимерные молекулы рецептора пролактина. Используемое здесь выражение «мономерный рецептор пролактина человека» означает белок рецептора пролактина или его часть, который не содержит или не имеет мультимеризирующих доменов и который существует в нормальных условиях в виде одной молекулы рецептора пролактина без прямой физической связи с другой молекулой рецептора пролактина. Примерной мономерной молекулой рецептора пролактина является молекула, обозначенная здесь как «hPRLR.mmh», содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 401 (см., например, Пример 3 в данном документе). Используемое здесь выражение «димерный рецептор пролактина человека» означает конструкцию, содержащую две молекулы рецептора пролактина, соединенные друг с другом через линкер, ковалентную связь, нековалентную связь или через мультимеризирующий домен, такой как домен Fc антитела. Примерной димерной молекулой рецептора пролактина является молекула, обозначенная в данном документе как «hPRLR.mFc», содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402 (см., например, Пример 3 в данном документе).

[0063] Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в настоящем документе обозначают ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к нечеловеческим видам. Таким образом, выражение «рецептор пролактина» означает рецептор пролактина человека, если не

указано, что оно относится к нечеловеческому виду, например, «рецептор пролактина мыши», «рецептор пролактина обезьяны» и т.д.

[0064] Используемое здесь выражение «экспрессируемый на клеточной поверхности рецептор пролактина» означает один или несколько белков рецептор пролактина или их внеклеточный домен, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, таким образом, что по меньшей мере часть белка рецептора пролактина экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. «Экспрессируемый на клеточной поверхности рецептор пролактина» может включать белок рецептора пролактина, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок рецептора пролактина. В альтернативном варианте «экспрессируемый на клеточной поверхности рецептор пролактина» может включать белок экспрессируемого на поверхности клетки рецептора пролактина, который обычно не экспрессирует рецептор пролактина человека на своей поверхности, но был искусственно создан для экспрессии рецептора пролактина на своей поверхности.

[0065] Используемое здесь выражение «антитело к рецептору анти-пролактина» включает как одновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифичные антитела, содержащие первое плечо, которое связывает рецептор пролактина, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, при этом плечо рецептора анти-пролактина содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в Таблице 1 в настоящем документе. Выражение «антитело к рецептору анти-пролактина» также включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (АЛС), содержащие антитело к рецептору анти-пролактина или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксическим агентом). Выражение «антитело к рецептору анти-пролактина» также включает конъюгаты антитело-радионуклид (АРН), содержащие антитело к рецептору анти-пролактина или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с радионуклидом.

[0066] Используемый здесь термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, рецептора пролактина). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь

содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную здесь 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 далее подразделяться на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая из областей V_H и V_L состоит из трех определяющих комплементарность областей и четырех каркасных областей, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления каркасные области антитела к рецептору пролактина (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны человеческой последовательности зародышевого типа или могут быть модифицированы естественным или искусственным способом. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более определяющих комплементарность областей.

[0067] Используемый здесь термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полных антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативным, синтетическим или генно-инженерным способом полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген для образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с использованием любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление или способы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию переменных и необязательно константных доменов, кодирующих ДНК. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

[0068] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные Fv(scFv)-молекулы; (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, изолированную определяющую комплементарность область (CDR), такую

как CDR3-пептид), или ограниченный FR3-CDR3-FR4-пептид. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в данном документе.

[0069] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну определяющую комплементарность область, которая находится рядом или в каркасе с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[0070] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть в том числе обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела, включают: (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 переменного и константного доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, переменный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны 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 более) аминокислот, что приводит к наличию гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела, представленного в настоящем документе, может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, дисульфидной связью(ями)).

[0071] Как и в случае молекул полных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая примеры форматов биспецифичных антител, раскрытых в данном документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методик, доступных в данной области.

[0072] Используемые здесь антитела могут функционировать через комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) или антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). «Комплементзависимая цитотоксичность» (CDC) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом в присутствии комплемента. «Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки Natural Killer (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени, что приводит к лизису клетки-мишени. Комплементзависимая цитотоксичность и антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты США № 5,500,362 и 5,821,337 и Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95: 652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

[0073] В некоторых вариантах осуществления антитела к рецептору анти-пролактина, представленные в настоящем документе, означают антитела человека. Предполагается, что термин «антитело человека» в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческого зародышевого иммуноглобулина. Антитела человека могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого зародышевого иммуноглобулина (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в определяющей комплементарности области, в частности, CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в данном документе, не включает антитела, в которых последовательности определяющей комплементарности области,

полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

[0074] Антитела в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Термин «человеческое рекомбинантное антитело», используемый в данном документе, включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано далее ниже), антитела, выделенные от животного (например, мыши), которые трансгенны для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids. Res. 20: 6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческого зародышевого иммуноглобулина. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для человеческих Ig-последовательностей животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L человеческой зародышевой линии и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

[0075] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи между цепями. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула с массой около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[0076] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, помимо прочего, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области петли человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:

105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение относится к антителам, имеющим одну или несколько мутаций в шарнирной области, области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[0077] Антитела, представленные в настоящем документе, могут быть выделенными антителами. Используемое здесь понятие «выделенное антитело» означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0078] Антитела к рецептору анти-пролактина, применимые в способах, раскрытых в данном документе, могут включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или определяющих комплементарность областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых здесь аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее раскрытие включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или определяющих комплементарность областях мутированы в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем документе совместно как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области, начиная с описанных здесь последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые

содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркасной и/или определяющей комплементарности области в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах области FR1 или в последних 8 аминокислотах области FR4, или только мутированные остатки, обнаруживаемые в областях CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков каркасной и/или определяющей комплементарности области мутируют в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (то есть последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной и/или определяющей комплементарности областей, например, областей, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее раскрытие.

[0079] В настоящем изобретении также предлагаются способы лечения с использованием конъюгатов АЛС, включающих антитела к рецептору анти-пролактина, при этом антитела включают варианты любой из аминокислотных последовательностей областей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, антитела к рецептору анти-пролактина могут иметь аминокислотные последовательности областей HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно

любых аминокислотных последовательностей областей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в Таблице 1 в настоящем документе.

[0080] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0081] Термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный», когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности, по меньшей мере примерно на 95% и, что более предпочтительно, по меньшей мере примерно на 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как может быть измерено по любому известному алгоритму идентификации последовательности, например, FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0082] Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или «по существу сходный» означает, что две пептидные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих штраф за делецию по умолчанию, имеют идентичность нуклеотидной последовательности, по меньшей мере примерно на 95%, а в предпочтительном варианте реализации, по меньшей мере примерно на 98 или 99%. В предпочтительном варианте реализации положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (такими как, заряд или гидрофобность). В

целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, чтобы скорректировать консервативный характер замены, процентную идентичность последовательности или степень сходства можно скорректированы в сторону увеличения. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, источник Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной здесь в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие 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) серосодержащие 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 альтернативном варианте консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в работе Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной здесь в качестве ссылки. «Умеренно консервативная» замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0083] Сходство последовательности для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательности, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать, используя формат FASTA, с применением стандартных или рекомендуемых параметров. Программа в формат FASTA в программе GCG версии 6.1. (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между

искомой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, работы Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, каждая из которых включен сюда посредством ссылки.

РН-ЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

[0084] Настоящее изобретение относится к антителам к рецептору анти-пролактина с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, описываемое здесь антитело к рецептору анти-пролактина, может проявлять пониженное связывание с рецептором пролактина при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН. В альтернативном варианте антитела к рецептору анти-пролактина могут проявлять усиленное связывание с рецептором пролактина при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение «кислотный рН» включает значения рН менее чем около 6,2, например, около 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 менее. Используемое здесь выражение «нейтральный рН» означает рН от около 7,0 до около 7,4. Выражение «нейтральный рН» включает значения рН около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[0085] В некоторых случаях «пониженное связывание с рецептором пролактина при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН» выражается через отношение значения K_D антитела, связывающегося с рецептором пролактина при кислотном рН, к значению K_D антитела, связывающегося с рецептором пролактина при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующее «пониженное связывание с рецептором пролактина при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН» для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют кислотный/нейтральный коэффициент K_D около 3,0 или выше. В некоторых примерных вариантах осуществления отношение кислотной/нейтральной K_D для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять примерно 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 выше.

[0086] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на пониженное (или усиленное) связывание с конкретным антигеном при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того,

модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в программе CDR) остатком гистидина может быть получено антитело с пониженным антигенсвязывающим действием при кислотном рН относительно нейтрального рН.

АНТИТЕЛА К РЕЦЕПТОРУ АНТИ-ПРОЛАКТИНА, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ВАРИАНТЫ Fc

[0087] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антитела к рецептору пролактина, содержащие домен Fc, включающий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном рН по сравнению с нейтральным рН. Например, используемые здесь антитела представляют собой антитела к рецептору пролактина, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, где мутация(и) увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН колеблется от примерно 5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в позиции 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 модификация в позиции 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификации в позиции 250 и/или 428; или модификация в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация содержит 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); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0088] Например, антитела, пригодные для использования в настоящем документе, включают антитела к рецептору пролактина, содержащие домен Fc, включающий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, включающей 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрытых в данном документе, рассматриваются в объеме настоящего раскрытия.

Биологические характеристики антител

[0089] В способах, представленных в настоящем документе, полезны конъюгаты АЛС, содержащие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный рецептор пролактина человека с высокой аффинностью. Например, эти антитела включают антитела к рецептору анти-пролактина, которые связывают мономерный PRLR человека (например, hPRLR.mmh) с K_D менее чем приблизительно 4,0 нмоль, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 3, или по существу аналогичного анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены антитела к рецептору анти-пролактина, которые связывают мономерный рецептор пролактина человека при 37°C с K_D менее чем около 4 нмоль, менее чем около 3 нмоль, менее чем около 2 нмоль, менее чем около 1 нмоль, менее чем около 900 пмоль, менее чем примерно 800 пмоль, менее чем примерно 700 пмоль, менее чем примерно 600 пмоль, менее чем примерно 500 пмоль, менее чем примерно 400 пмоль или менее чем примерно 300 пмоль, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формат анализа, определенного в Примере 3, или по существу аналогичного анализа.

[0090] Здесь также полезны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный рецептор пролактина человека (например, hPRLR.mmh) с диссоциативным периодом полувыведения ($t_{1/2}$), превышающим примерно 5 минут, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенным здесь в Примере 3, или по существу аналогичного анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены антитела к рецептору анти-пролактина, которые связывают мономерный рецептор пролактина человека при 37°C с $t_{1/2}$, превышающим примерно 5 минут, превышающим примерно 6 минут, превышающим примерно 8 минут, превышающим примерно 10 минут, превышающим примерно 12 минут, превышающим примерно 14 минут, превышающим примерно 16 минут, превышающим примерно 18 минут, превышающим примерно 20 минут, превышающим примерно 30 минут, превышающим примерно 40 минут или более, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного здесь в Примере 3, или по существу аналогичного анализа.

[0091] Здесь также полезны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный PRLR человека (например, hPRLR.mFc) с высокой аффинностью. Например, такие антитела к рецептору анти-пролактина могут связывать димерный рецептор пролактина человека с K_D менее чем приблизительно 250 пмоль, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с использованием формата

анализа, определенного в Примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены антитела к рецептору анти-пролактина, которые связывают димерный рецептор пролактина человека при 37°C с K_D менее чем около 250 пмоль, менее чем около 200 пмоль, менее чем около 180 пмоль, менее чем около 160 пмоль, менее чем около 140 пМ, менее чем около 120 пмоль, менее чем около 100 пмоль, менее чем около 80 пмоль, менее чем около 70 пМ или менее чем около 60 пмоль, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 3, или по существу аналогичного анализа.

[0092] Здесь также полезны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный рецептор пролактина человека (например, hPRLR.mFc) с диссоциативным периодом полувыведения ($t_{1/2}$), превышающим примерно 55 минут, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенным здесь в Примере 3, или по существу аналогичного анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения предусмотрены антитела к рецептору анти-пролактина, которые связывают димерный рецептор пролактина человека при 37°C с $t_{1/2}$, составляющим более чем около 55 минут, более чем около 60 минут, более чем около 65 минут, более чем около 70 минут, более чем около 75 минут, более чем около 80 минут, более чем около 85 минут, более чем около 90 минут, более чем около 95 минут, более чем около 100 минут, более чем около 120 минут, более чем около 140 минут, более чем около 160 минут, или больше, измеренным способом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

[0093] Здесь также полезны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают рецептор пролактина и блокируют опосредованную пролактином передачу сигналов в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина человека. Например, такие антитела включают антитела к рецептору антипролактина, которые блокируют опосредованную пролактином передачу сигналов в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина человека, с IC_{50} менее чем около 1,3 нмоль, измеренным с использованием анализа блокирования передачи пролактина, например, с использованием формата анализа, определенного здесь в Примере 5, или по существу аналогичного анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены антитела к рецептору пролактина, которые блокируют опосредованную пролактином передачу сигналов в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина человека, с IC_{50} менее чем около 1,3 нмоль, менее чем около 1,2 нмоль, менее чем

около 1,0 нмоль, менее чем около 900 пмоль, менее чем около 800 пмоль, менее чем около 600 пмоль, менее чем около 400 пмоль, менее чем около 200 пмоль, менее чем около 100 пмоль, менее чем около 80 пмоль, менее чем около 60 пмоль, менее чем около 40 пмоль, менее чем около 20 пмоль, измеренным с использованием анализа блокирования передачи сигнала пролактина, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

[0094] Здесь также полезны антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают рецептор пролактина, но не блокируют опосредованную пролактином передачу сигналов в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина человека. В данном раскрытии антитело или его антигенсвязывающий фрагмент "не блокирует" опосредованную пролактином передачу сигнала, если при тестировании способом анализа блокирования передачи пролактина, таком как анализ, определенный в Примере 5 в настоящем документе, или по существу сходном анализе, антитело не проявляет или проявляет только незначительную блокирующую активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент «не блокирует» опосредованную пролактином передачу сигнала, если антитело проявляет значение IC_{50} более чем около 10 нмоль или более чем около 100 нмоль при тестировании способом анализа на блокирование передачи сигнала пролактина, таком как анализ, определенный здесь в Примере 5, или по существу аналогичный анализ.

[0095] Используемые здесь антитела могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Приведенный выше список биологических характеристик антител по настоящему изобретению не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области техники из обзора настоящего раскрытия, в том числе из приведенных здесь действующих образцов.

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (КОНЬЮГАТЫ АЛС)

[0096] В соответствии со способами, представленными в настоящем документе, полезными являются конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к рецептору анти-пролактина или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксический агент, химиотерапевтическое лекарственное средство или радиоизотоп.

[0097] Цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для роста, жизнеспособности или размножения клеток. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов, которые могут быть конъюгированы с антителами к рецептору

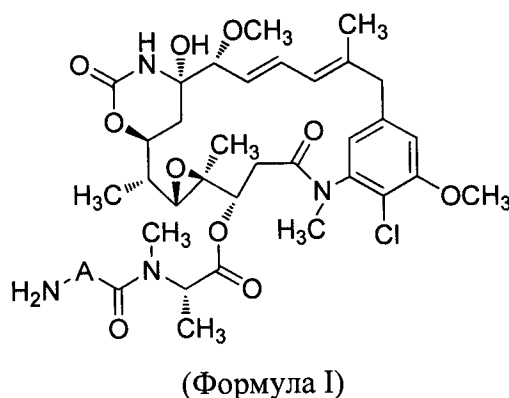
пролактина в соответствии с этим аспектом раскрытия, включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, аманидины, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (АМС), ауристатины, блеомицин, бусульфан, масляную кислоту, калихеамицины, камптотецин, карминомицины, кармустин, цемадотины, цисплатин, колхицин, комбретастины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин В, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубицин, диброманнитол, дигидроксиантрациндион, дисоразолы, доластатин (например, доластатин 10), доксорубицин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эсперамицин, эстрамустины, этидия бромид, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, ингибиторы белка кинезинового веретена (KSP), лептомицины, лейрозины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, мехлоретамин, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пуромицин, пирролобензодиазепины (PBDs), ризоксины, стрептозотоцин, таллисомицины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиозпа хлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины и производные вышеперечисленных соединений. Дополнительно цитотоксические агенты включают производное томаймицина или производное доластатина. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксический агент, конъюгированный с антителом к рецептору пролактина, представляет собой ауристатин, такой как MMAE, MMAF, или его производные. В объеме настоящего раскрытия рассматриваются другие цитотоксические агенты, известные в данной области, включая, например, белковые токсины, такие как риксин, токсин *C. difficile*, экзотоксин синегнойной палочки, риксин, дифтерийный токсин, ботулинический токсин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса (т.е. фитолаккатоксин и фитолаксигенин) и другие, например, приведенные в работе *Sapra et al., Pharmacol. & Therapeutics, 2013, 138:452-469*.

МАЙТАНЗИНОИДЫ

[0098] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цитотоксический агент, конъюгированный с антителом к рецептору пролактина, представляет собой майтанзиноид.

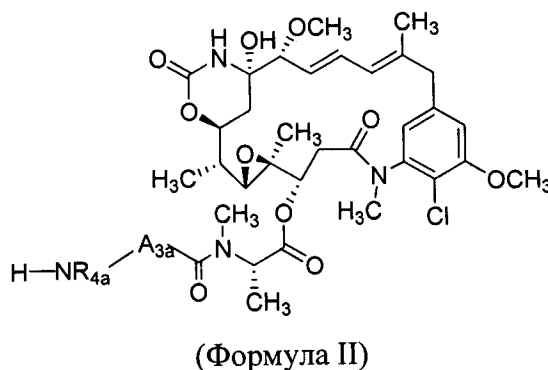
[0099] Майтанзиноиды являются аналогами майтанзина, мощного средства, целенаправленно воздействующего на микротрубочки, которое вызывает остановку митоза. Подходящие майтанзиноиды для описанных здесь конъюгатов включают, в том числе, DM1 и

DM4. Подходящие майтанзиноиды также включают, в том числе, майтанзиноиды, которые имеют структуру Формулы (I):



где А означает арилен или гетероарил.

[00100] Подходящие майтанзиноиды также включают, в том числе, майтанзиноиды, которые имеют структуру Формулы (II):



где:

A_{3a} означает аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)- или -O-C(=O)-NR₄-, при этом алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил являются необязательно замещенными; и

p₁, p₂ и p₃ в каждом случае независимо равны 0 или целому числу от 1 до 100;

x составляет 0, 1 или 2;

R₄, R₅, R₆ и R₈ в каждом случае независимо означает H или замещенный либо незамещенный алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил;

R_{4a} означает замещенный или незамещенный алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил.

[00101] Другие подходящие майтанзиноиды включают майтанзиноиды, которые представлены в патентных заявках WO 2014/145090, WO 2016/160615 и WO 2015/031396, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

[00102] В некоторых вариантах осуществления конъюгат АЛС, полезный в представленных в настоящем документе способах, включает Формулу М-[L-D]*n*, где М означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с рецептором пролактина человека (PRLR), L означает линкер, D означает цитотоксический агент, *n* означает целое число от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления L означает 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (MCC), D означает DM1. В некоторых вариантах осуществления *n* означает целое число от 2 до 5. В определенных вариантах осуществления *n* означает 3 или 4.

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-РАДИОНУКЛИД

[00103] Здесь также представлены конъюгаты антитело-радионуклид (конъюгаты APN), содержащие антитела к рецептору анти-пролактина, конъюгированные с одним или несколькими радионуклидами, например, хелатирующей группой. Типичные радионуклиды, которые можно использовать в контексте этого аспекта раскрытия, включают, в том числе, ²²⁵Ac, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ²²⁷Th, ²²²Rn, ²²³Ra, ²²⁴Ra и ⁹⁰Y.

ЛИНКЕРЫ

[00104] В некоторых вариантах осуществления используемые в настоящем документе конъюгаты АЛС включают рецептор анти-пролактина, конъюгированный с цитотоксическим агентом (например, любым из цитотоксических агентов, описанных выше) через молекулу линкера. Используемое здесь выражение «линкер» относится к любой двухвалентной группе или фрагменту, который связывает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с указанным здесь соединением полезной нагрузки (например, цитотоксическим агентом). Как правило, подходящие линкеры для описанных здесь конъюгатов антител представляют собой линкеры, которые являются достаточно стабильными, чтобы использовать период полужизни антитела в кровотоке, и в то же время способны высвободить его полезную нагрузку после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомальной деградации антитела после интернализации.

[00105] Подходящие линкеры включают, в том числе, кислотолабильные линкеры, гидролизно-лабильные линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, катепсиновые расщепляемые линкеры, восстановительные лабильные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и β -глюконуридные линкеры. Подходящие линкеры также включают, в том числе, линкеры, которые представляют собой или включают глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликолевые (ПЭГ) звенья, гидразоны, малькапролил (mc) звенья, дисульфидные звенья (например, -S-S-, -S-C(R¹R²)-, где R¹ и R² независимо представляют собой водород или гидрокарбил), карбаматные звенья, пара-амино-бензильные звенья (ПАБ; например, полученные из п-аминобензилового спирта), фосфатные звенья, например, моно-, би- или трифосфатные звенья и пептидные звенья, например, пептидные звенья, содержащие две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более аминокислот, включая, в том числе, звенья Val-Cit и Phe-Lys. Подходящие линкеры также включают MCC (4-[малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат), SPDB, mc-val-cit и mc-val-cit-PAB.

[00106] Линкеры могут быть связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через любую подходящую аминокислоту антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Такие аминокислоты включают, в том числе, лизин, цистеин, селеноцистеин, неприродные аминокислоты и кислые аминокислоты. Линкеры также могут быть конъюгированы с глутамином посредством химио-ферментативного конъюгирования на основе трансглутаминазы (см., например, Dennler et al., *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 569–578). Линкеры могут быть связаны с остатками цистеина, например, путем взаимодействия антитела с линкером, содержащим подходящую реакционноспособную группу, например малеимидогруппу. Линкеры могут быть связаны с остатками лизина, например, путем взаимодействия антитела с линкером, содержащим активированную эфирную или галогенангидридную группу.

[00107] Антитела также могут быть конъюгированы посредством химической клик-реакции. В некоторых вариантах осуществления указанной химической клик-реакции линкер содержит реакционноспособную группу, например, алкин, которая способна подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы включают, в том числе, напряженные алкины, например, алкины, которые подходят для облегченных напряжением азид-алкиновых циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензанилированные алкины и алкины, способные подвергаться реакциям 1,3-циклоприсоединения с азидами в отсутствие медных катализаторов. Подходящие алкины также включают, в том числе, DIBAC, DIBO, BARAC, DIFO, замещенные, например, фторированные алкины, азациклоалкины, BCN и их производные. Линкеры, содержащие такие

реакционноспособные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализированы азидогруппами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные азидо-полиэтиленгликолевыми группами. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают путем взаимодействия антитела, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина, например, тяжелую цепь Q295, с соединением по Формуле $H_2N-LL-N_3$, где LL означает двухвалентную группу полиэтиленгликоля, при наличии фермента трансглутаминазы.

[00108] Любой известный в данной области способ конъюгирования химического фрагмента с пептидом, полипептидом или другой макромолекулой может быть использован в контексте настоящего изобретения для получения конъюгата АЛС с рецептором анти-пролактина, описанного в настоящем документе. Примерный способ конъюгации антитело-лекарственное средство через линкер изложен в Примере 6 в данном документе. Изменения в данном иллюстративном способе будут понятны специалистам в данной области техники и рассматриваются в объеме настоящего раскрытия.

ЦЕЛЕВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ КОНЪЮГАТОВ АЛС НА КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ НИЗКИЕ УРОВНИ РЕЦЕПТОРА ПРОЛАКТИНА

[00109] Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что конъюгаты АЛС, содержащие антитело к рецептору анти-пролактина, конъюгированное с цитотоксическим агентом, обладают определенной направленностью и способны убивать клетки, которые экспрессируют относительно низкие уровни рецептора пролактина на клеточной поверхности. Например, в приведенном здесь Примере 7 показано, что конъюгат АЛС, включающий антитело к рецептору анти-пролактина H1N6953N, конъюгированное с DM1, способен ингибировать рост клеток T47D (экспрессирующих рецептор пролактина на уровне всего в 12 раз выше фонового) с IC_{50} 1,3 нмоль и показал 78% киллинга. Напротив, конъюгаты АЛС с другими ассоциированными с опухолью антигенами, такими как ErbB2, обычно требуют гораздо более высоких уровней экспрессии целевого антигена в клетках для обеспечения сопоставимой эффективности киллинга. Например, цитотоксический эффект в субнаномолярном диапазоне IC_{50} был получен с помощью конъюгата АЛС анти-ErbB2-DM1 только в отношении клеток, экспрессирующих ErbB2 на уровнях примерно в 200-400 раз выше фонового (см., например, Таблицы 14-17 в настоящем документе). Способность уничтожать опухолевые клетки, которые экспрессируют относительно низкие уровни ассоциированного с опухолью антигена, такого как рецептор пролактина, означает, что конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина по настоящему изобретению могут обеспечить значительные

терапевтические преимущества при более низкой дозе и/или менее частом дозировании, чем требуется для конъюгатов АЛС, направленных на другие опухолевые антигены, такие как ErbB2.

[00110] Соответственно, настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (конъюгатам АЛС), содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает рецептор пролактина человека, конъюгированный с цитотоксическим агентом, при этом конъюгаты АЛС эффективно убивают клетки (например, опухолевые клетки), которые экспрессируют низкий уровень рецептора пролактина. В связанных вариантах осуществления настоящее раскрытие включает способы эффективного уничтожения клеток, которые экспрессируют низкие уровни рецептора пролактина. Способы по этому аспекту раскрытия включают (1) контактирование клеток с конъюгатом антитело-лекарственное средство (конъюгатом АЛС), содержащим антитело к рецептору анти-пролактина, конъюгированное с цитотоксическим агентом, и (2) контактирование клеток с фулвестрантом. «Контактирование с клетками» может быть осуществлено *in vitro* или *in vivo*, например, путем введения конъюгата АЛС к рецептору анти-пролактина нуждающемуся в этом субъекту, при этом введение вызывает контакт конъюгата АЛС и фулвестранта с клетками, экспрессирующими рецептор пролактина.

[00111] Согласно определенным контекстам, предусмотренным в объеме настоящего раскрытия, «низкий уровень рецептора пролактина» означает уровень экспрессии менее чем примерно в 30 раз выше фонового. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина, которые эффективно убивают клетки, экспрессирующие рецептор пролактина при уровне экспрессии выше фонового менее чем примерно в 30 раз, в 25 раз, в 20 раз, в 18 раз, в 16 раз, в 14 раз, 12 раз, 10 раз, 8 раз или менее. Используемый здесь термин «фоновый» означает (неспецифический) сигнал, генерируемый при обработке клеток антителом изотипического контроля (т.е. не специфичным для рецептора пролактина).

[00112] В некоторых других контекстах «низкий уровень рецептора пролактина» может быть выражен через количество молекул рецептора пролактина на клетку. Например, используемая в данном изобретении клетка, которая выражает «низкий уровень» рецептора пролактина, экспрессирует менее чем около 1 миллиона копий рецептора пролактина на ячейку. В конкретных вариантах осуществления «низкий уровень» рецептора пролактина означает менее чем около 900 000 копий, менее чем около 800 000 копий, менее чем около 700 000 копий, менее чем около 600 000 копий, менее чем около 500 000 копий, менее чем около 400 000 копий, менее чем около 300 000 копий, менее чем около 200 000 копий, менее чем

около 100 000 копий, менее чем около 90 000 копий, менее чем около 80 000 копий, менее чем около 70 000 копий, менее чем около 60 000 копий, менее чем около 50 000 копий, менее чем около 40 000 копий, менее чем около 30 000 копий, менее чем около 20 000 копий, менее чем около 10 000 копий рецептора пролактина на ячейку, менее чем около 5 000 копий рецептора пролактина на ячейку, менее чем около 3000 копий рецептора пролактина на ячейку или менее чем около 1000 копий рецептора пролактина на клетку. Например, как показано в приведенных здесь иллюстративных примерах, что конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина по данному изобретению эффективно убивают клетки MCF7, экспрессирующие всего около 3 000 копий рецептора пролактина на клетку.

[00113] Используемый здесь термин «эффективное уничтожение» означает, что конъюгат АЛС проявляет IC_{50} менее чем около 20 нмоль или менее чем около 1 нмоль (например, менее чем около 0,9 нмоль, менее чем около 0,8 нмоль, менее чем около 0,7 нмоль, менее чем около 0,6 нмоль, менее чем около 0,5 нмоль, менее чем около 0,4 нмоль или менее чем около 0,3 нмоль) в анализе цитотоксического эффекта, таком как анализ, определенный здесь в Примере 7, или по существу аналогичный анализ. Согласно этому аспекту раскрытия компонент антитела к рецептору анти-пролактина в конъюгате АЛС может представлять собой любое антитело к рецептору анти-пролактина, включая антитела к рецептору анти-пролактина, содержащие любую из аминокислотных последовательностей областей CDR или HCVR/LCVR, как указано здесь в Таблице 1. Кроме того, компонент цитотоксического агента в конъюгате АЛС может представлять собой любой цитотоксический агент, такой как DM1, или любой другой упомянутый здесь цитотоксический агент.

[00114] Конъюгаты АЛС, используемые в способах по настоящему изобретению, способны ингибировать рост опухоли и/или уменьшать размер опухоли у животных, имеющих опухоль PRLR+. Например, как показано в Примере 8 в настоящем документе, конъюгаты АЛС, содержащие PRLR-DM1, уменьшают опухоли до необнаружимых уровней у мышей, несущих ксенотрансплантаты пролактин-рецептор положительной опухоли рака молочной железы. Таким образом, в данном изобретении предложены способы применения антител к рецептору анти-пролактина и конъюгатов АЛС, содержащих такие антитела, где антитела или конъюгаты АЛС при введении в комбинации с фулвестрантом животному, несущему пролактин-рецептор положительную опухоль (например, с частотой приблизительно один раз в неделю, в дозе приблизительно от 1 до 15 мг/кг), ингибируют рост опухоли и/или уменьшают размер опухоли (например, ингибирование роста опухоли на 100% или более) к 52-му дню после введения или раньше.

ЦЕЛЕВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНА КЛАССА I

[00115] Рецептор пролактина относится к семейству рецепторов цитокинов класса I. Как объяснено выше и продемонстрировано в приведенных здесь иллюстративных примерах, было неожиданно обнаружено, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие антитела к рецептору анти-пролактина, могут эффективно целенаправленно воздействовать и убивать клетки, экспрессирующие низкие уровни рецептора пролактина (см. Пример 7 ниже). Кроме того, было показано, что конъюгаты АЛС с другими рецепторами цитокинов класса I (IL-4R и IL-6R) также способны эффективно уничтожать клеточные линии, экспрессирующие относительно низкие уровни антигена-мишени (см. Пример 9 ниже). Это свойство отличается от конъюгатов АЛС, содержащих другие белки, экспрессируемые на клеточной поверхности, таких как ErbB2, где эффективное уничтожение клеток требует высокого уровня экспрессии мишени. Кроме того, также было неожиданно обнаружено, антитела к рецептору анти-пролактина усваиваются значительно быстрее, чем антитела к рецептору Her2 на опухолевых клетках (например, опухолевых клетках T47D), и что это свойство коррелирует с более быстрой интернализацией и деградацией рецептора пролактина на клеточной поверхности по сравнению с клеточной поверхностью рецептора Her2.

[00116] Также было неожиданно обнаружено, что обработка пролактин-рецептор положительных опухолевых клеток селективным понижающим регулятором рецептора эстрогена (SERD), фулвестрантом, не снижала экспрессию рецептора пролактина. Это противоречит предыдущим данным о том, что лечение тамоксифеном, который блокирует связывание эстрогена с рецептором эстрогена, вызвало снижение мРНК рецептора пролактина через семь дней после лечения. Swaminathan et al., 2009, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 13(1): 81-91.

[00117] Принимая во внимание изложенные здесь результаты, авторы настоящего изобретения предполагают, что способность целенаправленно воздействовать и убивать клетки, экспрессирующие низкие уровни антигена клеточной поверхности, может быть общим свойством, присущим конъюгатам АЛС, направленным против рецепторов цитокинов класса I в целом, и в частности, рецепторов цитокинов класса I, которые быстро усваиваются. Таким образом, настоящее раскрытие включает способы нацеливания на рецепторы цитокинов класса I (например, быстро интернализирующие рецепторы цитокинов класса I) и способы уничтожения клеток, экспрессирующих рецепторы цитокинов класса I, таких как клетки, экспрессирующие низкие уровни рецепторов цитокинов класса I.

[00118] Способы по этому аспекту раскрытия включают контактирование клетки, экспрессирующей рецептор цитокинов класса I, с конъюгатом АЛС, содержащим антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с рецептором цитокинов класса I. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, клетка-мишень экспрессирует низкие уровни (согласно приведенному здесь определению экспрессии) рецептора цитокинов класса I и/или рецептора цитокинов класса I, который быстро интернационализируется и деградирует (например, интернационализируется быстрее, чем эталонная молекула клеточной поверхности, такая как рецептор Her2). В настоящее изобретение также включены конъюгаты АЛС, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с рецептором цитокинов класса I, конъюгированным с цитотоксическим агентом. Любой из цитотоксических агентов, линкеров и/или технологий, связанных с конъюгатами АЛС, описанными в другом месте данного документа, может быть использован в контексте этого аспекта раскрытия.

[00119] Используемый здесь термин «рецептор цитокинов класса I» (также иногда называемый «рецептором цитокинов типа I») означает трансмембранный рецептор, экспрессируемый на поверхности клеток, который распознает и реагирует на цитокины с помощью четырех альфа-спиральных цепей. Как объясняется ниже, рецепторы цитокинов класса I могут быть гетеродимерными или гомодимерными. Используемый здесь термин «рецептор цитокинов класса I» включает как гетеродимерные, так и гомодимерные рецепторы.

[00120] Гетеродимерные рецепторы цитокинов класса I состоят из цитокин-специфической цепи и «общей цепи». Соответственно, такие гетеродимерные рецепторы цитокинов класса I могут быть классифицированы на основе типа общей цепи, используемой рецептором для передачи сигналов. Типичные категории гетеродимерных рецепторов цитокинов класса I включают: (i) распространенные гетеродимерные рецепторы, содержащие гамма-цепь, такие как IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R и IL-15R; (ii) распространенные гетеродимерные рецепторы, содержащие бета-цепь, такие как рецептор GM-CSF, IL-3R и IL-5R; и (iii) gp130-содержащие гетеродимерные рецепторы, такие как IL-6R, IL-11R, рецептор цилиарного нейротрофического фактора, рецептор ингибиторного фактора лейкемии (LIF), рецептор онкостатина M (OSM) и рецептор IL-12.

[00121] Гомодимерные рецепторы цитокинов класса I включают рецептор гормона роста (GH), рецептор эритропоэтина (EPO), рецептор G-CSF, рецептор лептина и рецептор пролактина.

[00122] В определенных вариантах осуществления этого аспекта изобретения конъюгат АЛС содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гетеродимерным рецептором цитокинов класса I. В соответствии с другими вариантами осуществления этого аспекта изобретения конъюгат АЛС содержит антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с гомодимерным рецептором цитокинов класса I.

[00123] Настоящее раскрытие включает способы уничтожения клетки, экспрессирующей низкие уровни гетеродимерного рецептора цитокинов класса I. Способы согласно этому аспекту раскрытия включают в себя контактирование клетки, которая экспрессирует низкий уровень гетеродимерного рецептора цитокинов класса I, с ADC, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает гетеродимерный рецептор цитокинов класса I.

[00124] В альтернативном варианте настоящее раскрытие включает способы уничтожения клетки, экспрессирующей низкие уровни гомодимерного рецептора цитокинов класса I. Способы по этому аспекту раскрытия включают контактирование клетки, экспрессирующей низкий уровень гомодимерного рецептора цитокинов класса I, с ADC, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает гомодимерный рецептор цитокинов класса I.

КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ И СОПУТСТВУЮЩИЕ ТЕХНОЛОГИИ

[00125] Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, 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 более) аминокислот белка рецептора пролактина. В альтернативном варианте эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления эпитоп расположен на пролактин-связывающем домене рецептора пролактина или рядом с ним. В других вариантах осуществления эпитоп расположен вне пролактин-связывающего домена рецептора пролактина, например, в месте на поверхности рецептора пролактина, в котором антитело, будучи связанным с таким эпитопом, не препятствует связыванию пролактина с рецептором пролактина.

[00126] Внеклеточный домен рецептора пролактина состоит из двух фибронектиноподобных доменов типа III, обозначаемых здесь как «Домен 1» и «Домен 2». Домен 1 означает последовательность аминокислот, представленную аминокислотами с 27 по 128 последовательности SEQ ID NO: 404; и Домен 2 означает последовательность аминокислот, представленную аминокислотами от 129 до 229 SEQ ID NO: 404. Настоящее раскрытие включает антитела к рецептору анти-пролактина, которые взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, обнаруженными в Домене 1 внеклеточного домена рецептора пролактина. Эпитоп(ы) может состоять из одной или нескольких смежных последовательностей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более)

аминокислот, расположенных в Домене 1 рецептора пролактина. В альтернативном варианте эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в Домене 1 рецептора пролактина. Как показано в Примере 10 в данном документе, эпитоп рецептора пролактина, с которым взаимодействует иллюстративное антитело по изобретению H1H6958N2, определяется аминокислотной последовательностью MHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMM (SEQ ID NO: 405), которая соответствует аминокислотам 72-102 SEQ ID NO: 404. Соответственно, настоящее раскрытие включает в себя антитела к рецептору анти-пролактина, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в аминокислотном сегменте Домена 1, состоящем из аминокислот 72-102 SEQ ID NO: 404 (то есть последовательности MHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMM [SEQ ID NO: 405]).

[00127] Различные способы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы, чтобы определить, «взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами» в полипептиде или белке. Типичные способы включают, например, рутинный эпитоп перекрёстный конкурентный анализ, такой как описан в работе Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ с аланиновым сканированием, блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, Methods Mol Biol. 248: 443-463) и анализ с расщеплением пептидов. Кроме того, могут быть использованы такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водород/дейтерий, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ обмена водород/дейтерий включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить обмен водород-дейтерий по всем остаткам, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, See, e.g., Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00128] Здесь представлены антитела к рецептору анти-пролактина, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных типичных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей,

указанных в Таблице 1 в настоящем документе). Аналогичным образом, также предусмотрены антитела к рецептору анти-пролактина, которые конкурируют за связывание с рецептором пролактина с любым из описанных здесь специфических приводимых в качестве примера антител (например с антителами, содержащими любую из аминокислотных последовательностей, как указано в Таблице 1 в настоящем документе).

[00129] Можно легко определить, связывается ли антитело или конкурирует за связывание с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к рецептору анти-пролактина, используя рутинные способы, известные в данной области и приведенные в качестве примера в настоящем документе. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к рецептору анти-пролактина по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком рецептора пролактина. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой рецептора пролактина. Если тестируемое антитело способно связываться с рецептором пролактина после связывания насыщением с эталонным антителом к рецептору анти-пролактина, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, нежели эталонное антитело к рецептору анти-пролактина. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой рецептора пролактина после связывания насыщения с эталонным антителом к рецептору анти-пролактина, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным антителом к рецептору анти-пролактина по данному изобретению. Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, пептидные мутации и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела происходит из-за связывания с тем же эпитопом, что и у эталонного антитела, либо за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает пространственное блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области. В соответствии с некоторыми вариантами 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%, а в предпочтительных вариантах осуществления на 75%, 90% или даже на 99%, по данным конкурентно-связывающего анализа (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990: 50: 1495-1502). В альтернативном варианте считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание

другого. Считается, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00130] Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или cross-competes) с эталонным антителом к рецептору анти-пролактина, описанная выше методика связывания реализуется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу разрешено связываться с белком рецептора пролактина в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой рецептора пролактина. Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой рецептора пролактина в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой рецептора пролактина. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой рецептора пролактина, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с рецептором пролактина. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, конкурирующее 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 участка или соседнего эпитопа.

ПРЕПАРАТЫ ИЗ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА

[00131] Антитела к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Способы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области. Любые такие известные способы могут использоваться в контексте настоящего раскрытия для получения антител человека, которые специфически связываются с рецептором пролактина человека.

[00132] Используя, например, технологию VELOCIMMUNE™ или любой другой аналогичный известный способ получения полностью человеческих моноклональных антител, сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к рецептору пролактина, содержащие переменную область человека и константную область мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают с учетом желательных характеристик, включая аффинность, блокирующую активность лиганда, селективность, эпитоп и т.д. При необходимости константные области мыши заменяются желаемой константной областью человека, например, дикого типа или модифицированной IgG1 или IgG4 для генерации полностью человеческого антитела к рецептору анти-пролактина. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и целевой специфичности находятся

в вариабельной области. В некоторых случаях полностью человеческие антитела к рецептору анти-пролактина выделяют непосредственно из антиген-позитивных В-клеток.

БИОЭКВИВАЛЕНТЫ

[00133] Описанные здесь антитела к рецептору анти-пролактина и фрагменты антител, охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать рецептор пролактина человека. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к рецептору анти-пролактина или фрагмент антитела, который является по существу, биоэквивалентен анти-PRLR-антителу или фрагменту антитела по изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных и ДНК-последовательностей обсуждаются выше.

[00134] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента с введением одной дозы или многократных доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[00135] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

[00136] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переключать один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных

эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

[00137] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия в отношении состояния или условий применения в той степени, в которой такие механизмы известны.

[00138] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными о биодоступности человека *in vivo* и является достаточно прогнозным; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) в строго контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность либо биоэквивалентность антитела.

[00139] Биоэквивалентные варианты антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не необходимых для биологической активности. Например, остатки цистеина, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к рецептору анти-пролактина, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ВИДОВ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИДОВ

[00140] Способы, предоставленные в настоящем раскрытии, в соответствии с определенными вариантами осуществления, используют антитела к рецептору анти-пролактина, которые связываются с рецепторами пролактина человека, но не с рецепторами пролактина других видов. Настоящее раскрытие также включает антитела к рецептору анти-пролактина, которые связываются с рецептором пролактина человека и с рецептором пролактина одного или нескольких видов, отличных от человека. Например, антитела к рецептору анти-пролактина по изобретению могут связываться с рецептором пролактина человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или

несколькими рецепторами пролактина мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, резуса или шимпанзе. В соответствии с некоторыми примерными вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антитела к рецептору анти-пролактина, которые специфически связывают рецептор пролактина человека и яванского макака (например, *Macaca flavicularis*). Другие антитела к рецептору анти-пролактина по изобретению связываются с рецептором пролактина человека, но не связываются или слабо связываются с рецептором яванского макака.

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

[00141] Антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Полиспецифичные антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147: 60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244. Антитела к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

[00142] В настоящем документе также представлены биспецифичные антитела, в которых одна часть иммуноглобулина связывает рецептор пролактина человека, а другая часть иммуноглобулина является специфичной для второго антигена. PRLR-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей областей HCVR/LCVR или CDR, как указано здесь в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления PRLR-связывающее плечо связывает рецептор пролактина человека и блокирует связывание пролактина с рецептором пролактина. В других вариантах осуществления PRLR-связывающее плечо связывает рецептор пролактина человека, но не блокирует связывание пролактина с рецептором пролактина.

[00143] Приведенный в качестве примера формат биспецифических антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает использование первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, при этом первый и второй домены C_H3 Ig

отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и по меньшей мере одно различие аминокислот снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует различие аминокислот. В одном варианте осуществления первый домен Ig C_H3 связывает белок А, второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание белка А, такую как модификация Н95R (путем нумерации экзонов по IMGT; Н435R посредством нумерации по EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по ЕС). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором C_H3, включают: 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 (IMGT; N384S, K392N и V422I от EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Вариации формата биспецифического антитела, описанные выше, рассматриваются в объеме настоящего раскрытия.

[00144] Другие примерные биспецифичные форматы, которые можно использовать в контексте настоящего раскрытия, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, DVD (двойной вариабельный домен) - Ig, обычную легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступом во впадину и т. д.), форматы, полученные по технологии Quadroma, Knobs-into-Holes (выступ во впадину), CrossMab, CrossFab, SEEDbody, «лейциновая молния», Duobody, IgG1/IgG2, Fab(DAF)-IgG двойного действия и биспецифичные форматы Mab² (см., например, обзор вышеупомянутых форматов в работе Klein *et al.* 2012, mAbs 4: 6, 1-11 и цитируемых в них ссылках). Биспецифичные антитела также конструироваться с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, в которой неприродные аминокислоты с ортогональной химической активностью используются для генерирования сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самоорганизуются в мультимерные комплексы с определенной композицией, валентностью и геометрией (См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

ЛЕКАРСТВЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ВВЕДЕНИЕ

[00145] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгаты АЛС с рецептором пролактина или их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в настоящем изобретении. Фармацевтические композиции по изобретению составлены с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих

составов можно найти в формулах, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, г. Истон, штат Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) пузырьки (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), 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.

[00146] Доза вводимого пациенту антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Взрослому пациенту может быть предпочтительно вводить антитело по настоящему изобретению внутривенно, обычно в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, в наиболее предпочтительных вариантах осуществления от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. Частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы в зависимости от тяжести состояния. Эффективные дозы и схемы введения антител к рецептору анти-пролактина определяться опытным путем; например, улучшение состояния пациента может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, может быть выполнено межвидовое масштабирование доз с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti *et al.*, 1991, Pharmaceut. Res. 8: 1351).

[00147] Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтических композиций, представленных в данном изобретении, например, для инкапсуляции в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, в том числе, введение через внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и оральные пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

[00148] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается

подкожного способа введения, при введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению легко находит применение устройство «шприц-ручка». Шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Когда вся фармацевтическая композиция из картриджа введена, и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручка может быть использован повторно. В одноразовом шприце-ручке нет сменного картриджа. Одноразовый шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

[00149] Многочисленные многоразовые ручки и автоинжекторные устройства для введения находят применение при подкожном введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, в том числе, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., г. Вудсток, Великобритания), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, г. Бергдорф, Швейцария), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., г. Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, г. Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, г. Франкфурт, Германия). Примеры одноразовых шприц-ручек, имеющих применение для подкожного введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, в том числе, ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, г.Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, г.Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

[00150] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может вводиться в системе доставки с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201). В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система доставки с контролируемым высвобождением может размещаться в непосредственной близости к мишени композиции, таким образом требуется только доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, см. выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы доставки с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

[00151] Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию в предпочтительных вариантах осуществления помещают в соответствующую ампулу.

[00152] В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в дозированных формах в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от примерно 5 мг до примерно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекций, предпочтительно, чтобы указанное антитело содержалось в количестве от около 5 мг до около 100 мг и от около 10 мг до около 250 мг для других лекарственных форм.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ

[00153] Настоящее раскрытие включает способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее антитело к рецептору анти-пролактина (например, конъюгат АЛС, содержащий любую из последовательностей областей HCVR/LCVR или CDR, приведенных здесь в Таблице 1) и одновременное введение тому же субъекту фулвестранта. Терапевтическая композиция может содержать любой из конъюгатов антитело-лекарственное средство с рецептором к анти-пролактину или их антигенсвязывающие фрагменты или конъюгаты АЛС, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00154] Конъюгаты АЛС, полезные в соответствии с представленными здесь способами, можно использовать, помимо прочего, для лечения, профилактики и/или улучшения состояния любого заболевания или расстройства, связанных или опосредованных экспрессией или активностью рецептора пролактина или излечимых путем блокирования взаимодействия между рецептором пролактина и пролактином, или иным образом ингибирующих активность и/или передачу сигналов рецептора пролактина, и/или способствующих интернализации рецепторов и/или уменьшающие количество рецепторов на клеточной поверхности. Например, конъюгаты АЛС по настоящему изобретению полезны для лечения опухолей, которые экспрессируют рецепторы пролактина и/или которые отвечают на опосредованную пролактином передачу сигналов, например, опухолей молочной железы. Конъюгаты АЛС по настоящему изобретению также могут быть использованы для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в мозге и мозговых оболочках, ротоглотке, легких и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских половых путях, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также в специальных органах чувств, таких как глаз. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты АЛС используются для лечения одного или нескольких из следующих видов рака: почечно-клеточный рак, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественные глиомы, остеосаркома, колоректальный рак, рак желудка (например, рак желудка с амплификацией Met), злокачественная мезотелиома, множественная миелома, рак яичников, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальная саркома, рак щитовидной железы, рак молочной железы или меланомы. В некоторых вариантах осуществления рак означает пролактин-рецептор положительный рак молочной железы.

[00155] Антитела к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению также полезны для лечения или профилактики одного или нескольких заболеваний или расстройств, выбранных из группы, состоящей из эндометриоза, аденомиоза, негормональной контрацепции женской фертильности, доброкачественных заболеваний молочной железы и масталгии, ингибирования лактации, доброкачественной гиперплазии предстательной железы, миомы, гипер- и нормопролактинемической потеря волос, а также в рамках гормональной терапии для ингибирования пролиферации эпителиальных клеток молочной железы.

[00156] В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антитело к рецептору анти-пролактина можно вводить в виде монотерапии (то есть в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или несколькими

дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны здесь в другом разделе). Одним из особенно полезных примеров является фулвестрант.

[00157] Настоящее раскрытие включает способы идентификации пациентов, которых можно лечить с помощью конъюгатов АЛС по настоящему изобретению, путем анализа высоких уровней экспрессии рецептора пролактина в одной или нескольких тканях пациента, таких как опухолевая ткань. В связанном варианте осуществления настоящее раскрытие включает способы лечения рака, характеризующегося высоким уровнем экспрессии рецептора пролактина. Например, настоящее раскрытие включает в себя способы лечения, включающие введение антитела к рецептору анти-пролактина по изобретению или его конъюгата АЛС (например, любого из конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина, описанных здесь в другом разделе) субъекту с опухолью, когда опухоль была идентифицирована как опухоль, экспрессирующая высокие уровни рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления опухоль идентифицируется как экспрессирующая высокие уровни рецептора пролактина посредством иммуногистохимии образца биопсии или других способов визуализации, таких как, например, иммуно-ПЭТ-визуализации и т.д.

КОМБИНИРОВАННЫЕ СПОСОБЫ ТЕРАПИИ И СОСТАВЫ

[00158] Настоящее раскрытие включает композиции и терапевтические составы, применимые в способах, представленных в настоящем документе, где композиции и составы содержат любой из конъюгатов антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина, описанных в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающее введение таких комбинаций нуждающимся в этом пациентам.

[00159] Конъюгаты антитело-лекарственное средство к рецептору анти-пролактина, описанные здесь, могут комбинироваться и/или вводиться в комбинации с терапевтически эффективным количеством фулвестранта. Лечение и конъюгатом антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина, и фулвестрантом называется «совместным введением».

[00160] Антитела к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению могут комбинироваться и/или вводиться в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из антагониста рецептора эпидермального фактора роста (например, антитела к рецептору эпидермального фактора роста) [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор рецептора эпидермального фактора роста [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагониста

другого члена семейства рецепторов эпидермального фактора роста, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2 [например, трастузумаб или T-DM1 {KADCYLA®}], антитело к анти-ErbB3 или анти-ErbB4 или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагониста EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагониста cMET (например, антитело к cMET), антагониста IGF1R (например, антитело к IGF1R), ингибитора B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитора PDGFR-α (например, антитело к PDGFR-α, ингибитор PDGFR-β (например, антитело к PDGFR-β или низкомолекулярный ингибитор киназы, такой как, например, мезилат иматиниба или малат сунитиниба), ингибитора лиганда фактора роста тромбоцитов (например, антитело к анти-PDGF-A, -B, -C или -D, аптамер, миПНК и т.д.), антагониста фактора роста сосудистого эндотелия (например, ловушка VEGF, такая как афлиберцепт, см., например, US 7,087,411 (также называемый в настоящем документе «VEGF-ингибирующий слитый белок»), антитела к фактору роста сосудистого эндотелия (например, бевацизумаб), низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагониста DLL4 (например, антитело к DLL4, раскрытое в US 2009/0142354, такое как REGN421), антагониста Ang2 (например, антитело к Ang2, раскрытое в US 2011/0027286, например, как H1H685P), антагониста FOLH1 (например, антитело к FOLH1), антагониста STEAP1 или STEAP2 (например, антитело к STEAP1 или антитело к STEAP2), антагониста Tmprss2 (например, антитело к Tmprss2) антагониста MSLN (например, антитело к MSLN), антагониста CA9 (например, антитело к CA9), антагонист уроплакина (например, антитело к уроплакина [например, антитело к UPK3A]), антагониста MUC16 (например, антитело анти-MUC16), антагониста Tn-антигена (например, антитело к анти-Tn-), антагониста CLEC12A (например, антитело к CLEC12A), антагониста TNFRSF17 (например, антитело к TNFRSF17), антагониста LGR5 (например, антитело к LGR5), моновалентного антагониста CD20 (например, моновалентное антитело к CD20, такое как ритуксимаб) и т. д. Другие агенты, которые предпочтительно вводить в комбинации с конъюгатами АЛС, описанными в настоящем документе, включают например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такие 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 их соответствующие рецепторы.

[00161] Композиции и терапевтические составы, содержащие любой из конъюгатов антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина, описанных в настоящем документе, можно вводить в комбинации (совместно) с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами. Примеры химиотерапевтических агентов включают

алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид окиси мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; вещества, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазикивон; 2,2', 2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например паклитаксел (Taxol™, Bristol-MyersSquibbOncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (Taxotere™; AventisAntony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; Кселода; ибандронат; СРТ-11;

ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

[00162] Конъюгаты антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина по изобретению также можно вводить в комбинации (совместно) с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами ЦОГ, кардиопротекторами, хелаторами металлов, IFN-гамма и/или НПВП.

[00163] Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например, любой из перечисленных выше агентов или их производных, может вводиться непосредственно до, во время или сразу после введения антитела к рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением антитела к рецептору анти-пролактина «в сочетании с» дополнительным терапевтически активным компонентом, то есть «совместным введением»). Настоящее раскрытие включает фармацевтические композиции, в которых антителок рецептору анти-пролактина по настоящему изобретению комбинировано с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, которые описаны здесь в другом разделе.

РЕЖИМЫ ВВЕДЕНИЯ

[00164] «Совместное введение» в контексте настоящего описания относится к введению конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором пролактина в комбинации с фулвестрантом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина (или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию конъюгат антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина плюс фулвестрант, могут вводиться субъекту одновременно или в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы в течение определенного времени). Способы согласно этому аспекту раскрытия включают в себя последовательное введение субъекту одной дозы или нескольких доз конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина по изобретению и одной дозы или нескольких доз фулвестранта. Кроме того, конъюгат антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина можно вводить до или после введения фулвестранта.

[00165] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, помимо введения фулвестранта, многократные дозы конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина (или фармацевтической композиции, содержащей

комбинацию конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в данном документе), могут вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту раскрытия включают в себя последовательное введение субъекту множества доз конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина по изобретению и/или последовательное введение субъекту множества доз фульвестранта. Используемый здесь термин «последовательное введение» означает, что каждая доза конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина и/или фульвестранта вводится субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее раскрытие включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина с последующими одной или несколькими вторичными дозами конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина и, необязательно, с последующей одной или несколькими третичными дозами конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина. Настоящее раскрытие дополнительно включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы фульвестранта с последующей одной или несколькими вторичными дозами фульвестранта и, необязательно, с последующей одной или несколькими третичными дозами фульвестранта.

[00166] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения терапевтических агентов, представленных в настоящем документе. Таким образом, «начальная доза» означает дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «базовой дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина или одинаковое количество фульвестранта, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина, содержащегося в начальных, вторичных и/или третичных дозах, варьируется (например, корректируется в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз», и последующих доз, которые вводят реже (например, «поддерживающие дозы»).

[00167] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего раскрытия каждая вторичная и/или третичная доза вводится 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 более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», используемая в настоящем документе, означает в последовательности многократных введений дозу конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина или фулвестранта, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00168] Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз конъюгата антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина или фулвестранта. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Схема введения может проводиться в течение неопределенного времени в течение жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение является терапевтически необходимым или предпочтительным.

[00169] В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[00170] Настоящее раскрытие включает схемы введения, в которых от 2 до 6 нагрузочных доз вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т. д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз реже. Например, согласно этому

аспекту раскрытия, если нагрузочные дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца, и т.п.

[00171] Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на ряд вариантов осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в различные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, могут быть внесены изменения в форме и деталях, без отступления от сущности и объема раскрытия, и что различные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, не предназначены для действия в качестве ограничения объема Формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[00172] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание способов изготовления и использования способов и композиций, представленных в настоящем документе, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части означают части по массе, молекулярная масса означают среднюю молекулярную массу, температура указывается в градусах Цельсия, давление равно атмосферному или близко к нему.

ПРИМЕР 1: ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ АНТИ-ПРОЛАКТИНА

[00173] Антитела к рецептору анти-пролактина получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. мыши, сконструированной с использованием ДНК, кодирующей переменные области тяжелой и каппа-легкой цепи человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, содержащим растворимый димерный экто-домен рецептора пролактина человека. Иммунный ответ антител контролировали с помощью PRLR-специфического иммуноанализа. После достижения желаемого иммунного ответа спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и сформировать клеточные линии гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, продуцирующих PRLR-специфические антитела. Используя эту методику, получали несколько химерных антител к рецептору пролактина (то есть антител, обладающих переменными доменами человека и константными доменами мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к рецептору анти-пролактина выделяли

непосредственно из антиген-позитивных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

[00174] Некоторые биологические свойства типичных антител к рецептору анти-пролактина, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в приведенных ниже примерах.

ПРИМЕР 2. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот с вариательной областью тяжелой и легкой цепей

[00175] В Таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариательных областей тяжелой и легкой цепей и определяющих комплементарность областей выбранных описанных здесь антител к рецептору анти-пролактина. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в Таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NOs:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H6762P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H6765P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H6774P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H6781P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H6782P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H6783P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H6785P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H6790P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H6792P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H6793P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H6795P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H6797P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H6800P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H6801P	210	212	214	216	218	220	222	224

Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H6803P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H6804P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H6807P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1M6953N	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M6958N2	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M6959N2	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M6960N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M6966N	338	340	342	344	346	348	350	352
H2M6967N	354	356	358	360	362	364	366	368
H2M6975N	370	372	374	376	378	380	382	384
H2M6976N	386	388	390	392	394	396	398	400

Таблица 2: Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот

	SEQ ID NOs:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H6762P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H6765P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H6774P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H6781P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H6782P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H6783P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H6785P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H6790P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H6792P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H6793P	145	147	149	151	153	155	157	159

Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H6795P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H6797P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H6800P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H6801P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H6803P	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H6804P	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H6807P	257	259	261	263	265	267	269	271
H1M6953N	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M6958N2	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M6959N2	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M6960N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M6966N	337	339	341	343	345	347	349	351
H2M6967N	353	355	357	359	361	363	365	367
H2M6975N	369	371	373	375	377	379	381	383
H2M6976N	385	387	389	391	393	395	397	399

[00176] Антитела обычно упоминаются в данном документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, «H1H», «H1M», «H2M» и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, «6762», «6953»), «6958» и т.д.), за которым следует суффикс «P» или «N», как показано в Таблицах 1 и 2. Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело может упоминаться в данном документе как, например, «H1H6762P» «H1M6953N», «H2M6958N» и т.д. Префиксы H1H, H1M и H2M на обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H1H" имеет Fc человеческого IgG1, антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1, а антитело "H2M" имеет Fc мышинового IgG2 (все переменные области полностью человеческие, как обозначено первым 'H' в обозначении антител). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc мышинового IgG1 может быть превращено в антитело

с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая определяющие комплементарность области), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в Таблицах 1 и 2, останутся прежними, и ожидается, что свойства связывания будут идентичными или существенно похожи, независимо от природы домена Fc.

КОНТРОЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СЛЕДУЮЩИХ ПРИМЕРАХ

[00177] Контрольные конструкции были включены в следующие эксперименты для сравнительных целей: Контроль I: человеческое антитело к рецептору анти-пролактина с переменными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющее аминокислотные последовательности соответствующих доменов "he.06.642-2", как изложено в патентной заявке WO2008/02295A2; и Контроль II: человеческое антитело к ErbB2 с переменными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющее аминокислотные последовательности соответствующих доменов "4D5v8", как указано в работе Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289.

ПРИМЕР 3. Аффинность связывания на основе поверхностного плазмонного резонанса и кинетические константы человеческих моноклональных антител к рецептору анти-пролактина

[00178] Аффинность связывания и кинетические константы человеческих моноклональных антител к рецептору анти-пролактина определяли поверхностным плазмонным резонансом при 25°C и 37°C. Антитела, экспрессируемые в виде человеческого Fc IgG1 (то есть обозначенные «H1H»), захватывались на поверхности сенсора человеческого Fc (формат «иммобилизация антитела») и инъецировали на поверхность сенсора растворимые мономерный (hPRLR.mmh; SEQ ID NO: 401 или masaca flavicularis). (mf) PRLR.mmh; SEQ ID NO: 403) или димерный (hPRLR.mFc; SEQ ID NO: 402) белок рецептора пролактина. Измерения проводили на приборе T200 Biacore. Константы скорости кинетической ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1: 1 с использованием программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и периоды полураспада диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали из констант кинетической скорости как: $K_D (M) = k_d/k_a$; и $t_{1/2} (мин) = (\ln 2)/(60 * k_d)$. Результаты сведены в Таблицы 3 и 4.

Таблица 3: Аффинность связывания с Biacore человеческих mcb Fc при 25°C

Связывание при 25°C/Формат «иммобилизация антитела»					
Антитело	Аналит	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_d (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
H1H6953N	hPRLR.mmh	7.92E+05	2.12E-04	2.68E-10	54,5
	hPRLR.mFc	7.11E+05	4.77E-05	6.70E-11	242,2
	mfPRLR.mmh	7.27E+05	3.19E-04	4.38E-10	36,3
H1H6958N2	hPRLR.mmh	2.33E+05	2.72E-04	1.17E-09	42,5
	hPRLR.mFc	4.22E+05	3.66E-05	8.67E-11	315,8
	mfPRLR.mmh	1.95E+05	2.80E-04	1.44E-09	41,3
H1H6959N2	hPRLR.mmh	1.79E+05	3.60E-02	2.02E-07	0,3
	hPRLR.mFc	3.59E+05	5.18E-04	1.45E-09	22,3
	mfPRLR.mmh	1.29E+05	1.67E-02	1.29E-07	0,7
H1H6960N	hPRLR.mmh	1.08E+05	7.29E-04	6.74E-09	15,8
	hPRLR.mFc	2.52E+05	3.56E-05	1.41E-10	324,4
	mfPRLR.mmh	9.40E+04	5.83E-04	6.20E-09	19,8
H1H6966N	hPRLR.mmh	8.52E+05	2.57E-04	3.02E-10	44,9
	hPRLR.mFc	9.31E+05	4.08E-05	4.39E-11	282,9
	mfPRLR.mmh	7.82E+05	3.25E-04	4.16E-10	35,6
H1H6967N	hPRLR.mmh	2.46E+05	3.32E-04	1.35E-09	34,8
	hPRLR.mFc	4.07E+05	4.45E-05	1.10E-10	259,3
	mfPRLR.mmh	1.90E+05	5.85E-04	3.08E-09	19,7
H1H6975N	hPRLR.mmh	1.50E+05	7.35E-05	4.90E-10	157,1
	hPRLR.mFc	2.87E+05	1.97E-05	6.84E-11	587,8
	mfPRLR.mmh	1.15E+05	1.31E-04	1.14E-09	88,2
H1H6976N	hPRLR.mmh	5.44E+05	8.64E-04	1.59E-09	13,4
	hPRLR.mFc	1.12E+06	1.01E-04	9.06E-11	114,4
	mfPRLR.mmh	4.66E+05	8.14E-04	1.75E-09	14,2
H1H6762P	hPRLR.mmh	6.92E+05	1.79E-04	2.59E-10	64
	hPRLR.mFc	6.51E+05	6.45E-05	9.92E-11	179
	mfPRLR.mmh	4.08E+05	2.08E-04	5.11E-10	55
H1H6765P	hPRLR.mmh	9.07E+05	1.13E-04	1.24E-10	102
	hPRLR.mFc	8.69E+05	3.41E-05	3.92E-11	339
	mfPRLR.mmh	5.27E+05	1.34E-04	2.54E-10	86
H1H6774P	hPRLR.mmh	7.15E+05	8.18E-04	1.14E-09	14

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_d (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
	hPRLR.mFc	7.98E+05	8.94E-05	1.12E-10	129
	mfPRLR.mmh	4.95E+05	8.75E-04	1.77E-09	13
H1H6781P	hPRLR.mmh	2.08E+05	1.27E-04	6.10E-10	91
	hPRLR.mFc	2.57E+05	6.05E-05	2.36E-10	191
	mfPRLR.mmh	1.43E+05	1.41E-04	9.86E-10	82
H1H6782P	hPRLR.mmh	3.60E+05	2.47E-04	6.85E-10	47
	hPRLR.mFc	3.17E+05	7.13E-05	2.25E-10	162
	mfPRLR.mmh	2.66E+05	2.79E-04	1.05E-09	41
H1H6783P	hPRLR.mmh	2.88E+05	4.13E-04	1.43E-09	28
	hPRLR.mFc	2.64E+05	8.77E-05	3.32E-10	132
	mfPRLR.mmh	1.89E+05	3.41E-04	1.81E-09	34
H1H6785P	hPRLR.mmh	3.01E+05	1.71E-04	5.67E-10	68
	hPRLR.mFc	2.63E+05	6.07E-05	2.31E-10	190
	mfPRLR.mmh	2.27E+05	1.67E-04	7.38E-10	69
H1H6790P	hPRLR.mmh	5.65E+05	7.99E-04	1.41E-09	14
	hPRLR.mFc	5.42E+05	1.04E-04	1.92E-10	111
	mfPRLR.mmh	3.89E+05	7.93E-04	2.04E-09	15
H1H6792P	hPRLR.mmh	3.24E+05	7.94E-04	2.45E-09	15
	hPRLR.mFc	3.03E+05	9.48E-05	3.13E-10	122
	mfPRLR.mmh	2.36E+05	9.83E-04	4.17E-09	12
H1H6793P	hPRLR.mmh	2.35E+05	3.32E-04	1.41E-09	35
	hPRLR.mFc	2.29E+05	7.57E-05	3.31E-10	153
	mfPRLR.mmh	1.77E+05	3.93E-04	2.22E-09	29
H1H6795P	hPRLR.mmh	1.17E+06	1.77E-03	1.52E-09	7
	hPRLR.mFc	1.54E+06	8.41E-05	5.45E-11	137
	mfPRLR.mmh	8.44E+05	1.97E-03	2.33E-09	6
H1H6797P	hPRLR.mmh	1.13E+06	1.96E-03	1.73E-09	6
	hPRLR.mFc	9.82E+05	1.19E-04	1.22E-10	97
	mfPRLR.mmh	6.70E+05	2.09E-03	3.12E-09	6
H1H6800P	hPRLR.mmh	4.21E+05	4.09E-04	9.72E-10	28
	hPRLR.mFc	4.73E+05	8.69E-05	1.84E-10	133

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
	mfPRLR.mmh	3.03E+05	3.80E-04	1.25E-09	30
H1H6801P	hPRLR.mmh	8.46E+05	7.56E-04	8.94E-10	15
	hPRLR.mFc	6.75E+05	1.09E-04	1.61E-10	106
	mfPRLR.mmh	6.57E+05	1.23E-03	1.88E-09	9
H1H6803P	hPRLR.mmh	8.24E+04	1.37E-04	1.67E-09	84
	hPRLR.mFc	1.04E+05	6.29E-05	6.07E-10	184
	mfPRLR.mmh	6.21E+04	2.09E-04	3.37E-09	55
H1H6804P	hPRLR.mmh	4.53E+05	6.34E-04	1.40E-09	18
	hPRLR.mFc	4.51E+05	8.69E-05	1.93E-10	133
	mfPRLR.mmh	3.31E+05	6.57E-04	1.99E-09	18
H1H6807P	hPRLR.mmh	7.61E+05	1.44E-04	1.89E-10	80
	hPRLR.mFc	6.80E+05	5.46E-05	8.03E-11	212
	mfPRLR.mmh	4.37E+05	1.51E-04	3.46E-10	76
Control I	hPRLR.mmh	5.11E+05	7.44E-04	1.46E-09	15,5
	hPRLR.mFc	4.72E+05	7.53E-05	1.59E-10	153,5
	mfPRLR.mmh	2.38E+05	6.14E-03	2.59E-08	1,9

NB= При использованных условиях связывание не наблюдалось

Таблица 4: Аффинность связывания с Вiasore человеческих mcb Fc при 37°C

Связывание при 25°C/Формат «иммобилизация антитела»					
Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
H1H6953N	hPRLR.mmh	1.10E+06	1.22E-03	1.11E-09	9,4
	hPRLR.mFc	1.47E+06	1.70E-04	1.16E-10	68,0
	mfPRLR.mmh	9.47E+05	2.56E-03	2.71E-09	4,5
H1H6958N2	hPRLR.mmh	4.13E+05	1.31E-03	3.16E-09	8,8
	hPRLR.mFc	8.29E+05	1.39E-04	1.67E-10	83,3
	mfPRLR.mmh	3.28E+05	1.34E-03	4.08E-09	8,6
H1H6959N2	hPRLR.mmh	4.06E+04	2.77E-02	6.81E-07	0,4
	hPRLR.mFc	5.09E+05	2.30E-03	4.51E-09	5,0
	mfPRLR.mmh	4.46E+04	1.65E-02	3.70E-07	0,7
H1H6960N	hPRLR.mmh	1.22E+05	1.98E-03	1.62E-08	5,8

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_d (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
	hPRLR.mFc	2.94E+05	1.47E-04	5.00E-10	78,7
	mfPRLR.mmh	8.64E+04	1.28E-03	1.49E-08	9,0
H1H6966N	hPRLR.mmh	1.58E+06	9.60E-04	6.07E-10	12,0
	hPRLR.mFc	1.88E+06	1.27E-04	6.72E-11	91,3
	mfPRLR.mmh	1.22E+06	1.20E-03	9.82E-10	9,6
H1H6967N	hPRLR.mmh	4.24E+05	9.33E-04	2.20E-09	12,4
	hPRLR.mFc	9.07E+05	9.73E-05	1.07E-10	118,8
	mfPRLR.mmh	3.56E+05	1.62E-03	4.54E-09	7,1
H1H6975N	hPRLR.mmh	2.11E+05	2.73E-04	1.29E-09	42,3
	hPRLR.mFc	3.86E+05	7.09E-05	1.84E-10	163,0
	mfPRLR.mmh	1.40E+05	3.17E-04	2.27E-09	36,4
H1H6976N	hPRLR.mmh	7.77E+05	3.14E-03	4.04E-09	3,7
	hPRLR.mFc	1.37E+06	1.40E-04	1.02E-10	82,6
	mfPRLR.mmh	6.03E+05	3.16E-03	5.24E-09	3,7
H1H6762P	hPRLR.mmh	9.48E+05	4.55E-04	4.80E-10	25
	hPRLR.mFc	8.01E+05	1.03E-04	1.28E-10	112
	mfPRLR.mmh	6.79E+05	5.58E-04	8.23E-10	21
H1H6765P	hPRLR.mmh	1.25E+06	3.66E-04	2.92E-10	32
	hPRLR.mFc	8.01E+05	1.03E-04	1.28E-10	112
	mfPRLR.mmh	1.06E+06	5.37E-05	5.04E-11	215
H1H6774P	hPRLR.mmh	1.07E+06	3.17E-03	2.95E-09	4
	hPRLR.mFc	1.41E+06	1.94E-04	1.38E-10	60
	mfPRLR.mmh	7.23E+05	3.61E-03	5.00E-09	3
H1H6781P	hPRLR.mmh	3.39E+05	3.09E-04	9.10E-10	37
	hPRLR.mFc	4.36E+05	9.84E-05	2.26E-10	117
	mfPRLR.mmh	2.47E+05	2.67E-04	1.08E-09	43
H1H6782P	hPRLR.mmh	5.57E+05	7.16E-04	1.28E-09	16
	hPRLR.mFc	5.98E+05	1.30E-04	2.17E-10	89
	mfPRLR.mmh	3.85E+05	7.67E-04	1.99E-09	15
H1H6783P	hPRLR.mmh	4.11E+05	1.61E-03	3.91E-09	7
	hPRLR.mFc	4.91E+05	1.38E-04	2.82E-10	83

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
	mfPRLR.mmh	2.73E+05	1.30E-03	4.74E-09	9
H1H6785P	hPRLR.mmh	4.26E+05	4.84E-04	1.14E-09	24
	hPRLR.mFc	4.56E+05	1.17E-04	2.56E-10	99
	mfPRLR.mmh	2.97E+05	4.50E-04	1.52E-09	26
H1H6790P	hPRLR.mmh	9.40E+05	3.29E-03	3.50E-09	4
	hPRLR.mFc	6.46E+05	1.98E-04	3.06E-10	58
	mfPRLR.mmh	6.15E+05	3.21E-03	5.22E-09	4
H1H6792P	hPRLR.mmh	4.35E+05	2.29E-03	5.27E-09	5
	hPRLR.mFc	4.99E+05	1.76E-04	3.52E-10	66
	mfPRLR.mmh	3.05E+05	2.86E-03	9.37E-09	4
H1H6793P	hPRLR.mmh	3.39E+05	1.02E-03	3.02E-09	11
	hPRLR.mFc	4.10E+05	1.42E-04	3.47E-10	81
	mfPRLR.mmh	2.33E+05	1.07E-03	4.59E-09	11
H1H6795P	hPRLR.mmh	1.36E+06	5.20E-03	3.81E-09	2
	hPRLR.mFc	1.94E+06	7.77E-05	4.02E-11	149
	mfPRLR.mmh	9.73E+05	5.99E-03	6.16E-09	2
H1H6797P	hPRLR.mmh	1.29E+06	8.22E-03	6.37E-09	1
	hPRLR.mFc	1.80E+06	1.25E-04	6.91E-11	93
	mfPRLR.mmh	9.14E+05	9.06E-03	9.90E-09	1
H1H6800P	hPRLR.mmh	8.08E+05	1.19E-03	1.47E-09	10
	hPRLR.mFc	6.44E+05	1.47E-04	2.29E-10	79
	mfPRLR.mmh	4.39E+05	1.09E-03	2.48E-09	11
H1H6801P	hPRLR.mmh	9.51E+05	4.41E-03	4.63E-09	3
	hPRLR.mFc	7.93E+05	2.21E-04	2.79E-10	52
	mfPRLR.mmh	7.11E+05	7.71E-03	1.08E-08	1
H1H6803P	hPRLR.mmh	1.29E+05	3.64E-04	2.83E-09	32
	hPRLR.mFc	1.34E+05	6.20E-05	4.61E-10	186
	mfPRLR.mmh	8.73E+04	6.36E-04	7.28E-09	18
H1H6804P	hPRLR.mmh	6.07E+05	3.85E-03	6.34E-09	3
	hPRLR.mFc	5.54E+05	2.05E-04	3.69E-10	56
	mfPRLR.mmh	4.55E+05	4.26E-03	9.35E-09	3

Антитело	Аналит	k_a (Мс ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (молярный)	$T_{1/2}$ (мин.)
H1H6807P	hPRLR.mmh	1.08E+06	3.36E-04	3.10E-10	34
	hPRLR.mFc	1.22E+06	1.10E-04	9.00E-11	105
	mfPRLR.mmh	8.02E+05	3.59E-04	4.48E-10	32
Контроль I	hPRLR.mmh	5.99E+05	2.42E-03	4.04E-09	4,8
	hPRLR.mFc	8.47E+05	2.14E-04	2.53E-10	54,0
	mfPRLR.mmh	1.53E+05	1.54E-02	1.01E-07	0,8

NB= В использованных условиях не наблюдается связывания

[00179] Как показано в Таблицах 3 и 4, несколько антител, описанных в настоящем документе, проявляют субнаномолярное сродство к белку рецептора и пролактина человека и обезьяны и проявляют более высокую аффинность, чем антитело сравнения к рецептору анти-пролактина (Контроль I). Например, при 37°C многие антитела к рецептору анти-пролактина связывались с мономерным рецептором пролактина человека со значениями K_D менее 4 нмоль и в $T_{1/2}$ раз более 5 минут; и с димерным рецептором пролактина человека с K_D менее 250 пмоль и в $T_{1/2}$ раза более 60 минут. Эти характеристики связывания значительно лучше, чем характеристики, которые наблюдалось с контрольным антителом I в тех же экспериментальных условиях.

ПРИМЕР 4А. Антитела к рецептору анти-пролактина связываются с эндогенными и сверхэкспрессированными клеточными линиями рецептора пролактина

[00180] Затем определяли способность антител к рецептору анти-пролактина селективно связывать экспрессирующие рецептор пролактина клеточные линии. Конструкции рецептора пролактина человека, обезьяны *macaca flavigularis* и мыши с меткой НА стабильно вводили в клетки HEK293 с помощью методики трансфекции, опосредованной липофектаминоом 2000. Трансфектанты (HEK293/hPRLR, HEK293/mfPRLR и HEK293/mPRLR) отбирали в течение по меньшей мере 2 недель в полной питательной среде плюс G418.

[00181] Экспрессию клеточной поверхности рецептора пролактина на клетках 293/hPRLR оценивали с помощью способа анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией. Вкратце, 1×10^5 клеток инкубировали с 10 мкг/мл контрольного антитела I или антитела изотипического контроля в течение 30 минут на льду в буфере для разведения антител. После двух промывок буфером для разведения антител клетки инкубировали с 10 мкг/мл PE-конъюгированных вторичных антител человека в течение 30 минут на льду. После двух дополнительных промывок образцы отбирали на цитометре Hypercyt® и анализировали с

помощью программного приложения ForeCyt™ (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико). Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) выражали в виде кратного изменения выше уровней изотипического контроля (фон). Связывание с помощью способа анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией подтвердило, что Контроль I селективно связывался с экспрессирующими клетками 293/hPRLR со значениями средней интенсивности флуоресценции, которые были в 30 раз выше фоновых (изотип ctrl) уровней и менее чем в 2 раза выше значений связи с родительскими клетками.

[00182] Количество копий рецептора пролактина на поверхности клеток также определяли количественно на клеточных линиях со сверхэкспрессией T47D, MCF7 и MCF7/hPRLR. Вкратце, 1×10^5 клеток инкубировали со 100 нмоль антитела к рецептор анти-пролактина H1H6953N-Alexa647 в течение 30 минут на льду в буфере для разведения антител. После двух промывок буфером для разведения антител образцы отбирали на цитометре Hypercyt® (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико), значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) определяли с помощью программного приложения ForeCyt™ (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико). Затем значение средней интенсивности флуоресценции для каждой клеточной линии переводили в молекулы Alexa647 эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF) с помощью набора Quantum Alexa Fluor 647 MESF в соответствии с инструкциями производителя (Bangs Laboratories, Inc, г. Фишерс, Индиана). Среднее количество флуорофоров на белок H1H6953N-A647 (отношение F/P) определяли с помощью набора Simple Cellular anti-Human IgG в соответствии с инструкциями производителя (Bangs Laboratories, Inc, г. Фишерс, Индиана). Значения молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома делили на отношение F/P для определения числа копий рецептора пролактина на поверхности клеток или способности связывания антигена H1H6953N на каждой клеточной линии. Используя этот способ, определили, что приблизительное число копий рецептора пролактина на поверхности клетки в различных клеточных линиях было следующим: T47D = 27000; MCF7 = 3000; и MCF7/hPRLR = 190 000.

[00183] Затем антитела к рецептору анти-пролактина тестировали с помощью способа анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией на предмет селективного связывания со сконструированными сверхэкспрессирующими рецептор пролактина клеточными линиями HEK293, а также с неэкспрессирующими клетками HEK293 и нативной экспрессирующей рецептор пролактина клеточной линией (T47D). Результаты показаны в Таблице 5.

**Таблица 5: FACS Связывание антител к рецептору анти-пролактина клеточной
поверхностью по данным флуоресцентного сортинга**

Антитело	Связывание клеточной поверхностью по данным флуоресцентного сортинга (раз выше фонового)				
	HEK293	HEK293/hPRLR	HEK293/ mfPRLR	HEK293/ mPRLR	T47D
неокрашенное	1	1	1	1	1
Только вторичное	1	1	1	1	1
Контроль I	1	31	13	7	30
*H1H6762P	1	36	26	2	38
*H1H6765P	2	38	27	1	40
H1H6774P	1	1	29	1	39
*H1H6781P	1	37	26	1	40
H1H6782P	3	41	32	4	43
*H1H6783P	1	37	27	1	38
*H1H6785P	1	37	26	2	40
*H1H6790P	1	37	24	1	34
*H1H6792P	1	37	28	3	37
H1H6793P	2	2	32	2	43
H1H6795P	1	1	22	1	34
H1H6797P	1	1	25	2	38
*H1H6800P	1	35	29	1	41
H1H6801P	7	47	88	56	45
*H1H6803P	1	39	28	1	39
H1H6804P	1	1	29	1	34
*H1H6807P	2	32	27	2	34
*H1H6953N	2	37	29	2	40
*H1H6958N2	1	35	30	1	37
H1H6959N2	1	6	11	2	9
*H1H6960N	1	29	23	1	33
*H1H6966N	1	29	18	1	31
*H1H6967N	1	38	28	2	41

*H1H6975N	1	38	29	1	46
H1H6976N	1	8	29	1	37
Изотип Ctrl I	1	1	1	1	NA
Изотип Ctrl II	1	1	NA	NA	1

NA = Нет данных

* Обозначает антитела со специфическим связыванием с HEK293/hPRLR, HEK293/mfPRLR и T47D и менее чем 2-кратным связыванием с родительскими клетками HEK293.

[00184] Как показано в Таблице 5, большинство антител с человеческим рецептором пролактина специфически связывается с клетками HEK293/PRLR в > 25 раз выше фоновых уровней, с родительскими клетками связывается незначительно. Аналогично было показано, что антитела, которые связываются с рецептором пролактина человека, связываются с рецептором пролактина обезьяны (*macaca flavicularis*) на клетках HEK293/mfPRLR. Антитела, которые были идентифицированы как сильные связывающие вещества в отношении клеток HEK293/hPRLR, аналогично показали, что они являются сильными связывающими по отношению к нативным PRLR-экспрессирующим клеткам T47D. Перекрестная реактивность к рецепторам пролактина грызунов не наблюдалась.

[00185] Таким образом, антитела проявляли сильное связывание с рецептором пролактина человека и обезьяны на сконструированных клеточных линиях, а также эндогенно экспрессируемым рецептором пролактина.

ПРИМЕР 4В. Антитела к рецептору анти-пролактина интернационализируются PRLR-экспрессирующими клетками *in vitro*

[00186] В этом Примере оценивали интернализацию антител к рецептору пролактина клетками, экспрессирующими рецептор пролактина (T47D). Вкратце, 20 000 клеток T47D высевали в покрытые коллагеном 96-луночные планшеты. На следующий день клетки инкубировали с антителами к человеческому рецептору пролактина (10 мкг/мл) в течение 30 минут на льду с последующим двухкратным промыванием фосфатно-солевым буферным раствором. Затем клетки инкубировали с конъюгированными с антителами alexa488 вторичными антителами анти-hFc Fab в течение 30 минут на льду с последующими двумя дополнительными промываниями фосфатно-солевым буферным раствором. Антителам позволяли интернализироваться в течение 1ч при 37°C в буфере для интернализации (буферный раствор PBS + 2% буферный раствор FBS) или оставляли при 4°C. Клетки фиксировали в 4% формальдегиде, ядра окрашивали DRAQ5 (передача сигналов клеток) и получали изображения

с помощью системы микроскопического анализа ImageXpress micro XL (Molecular Devices). Интенсивность целых клеток alexa488 при 37°C (связывание) и интенсивность alexa488 во внутриклеточных везикулах при 37°C (интернализация) определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений Columbus (PerkinElmer). Значения интенсивности выражены в процентах от самого сильного интернализирующего антитела, H1H6975N, и сведены в Таблицу 6.

Таблица 6

Клеточная линия: T47D [mAb] 1 мкг/мл (0,67 пмоль)		
Антитело	% интернализации по отношению к Контролю I	% общего связывания по отношению к Контролю I
к анти-PRLR Контроль I	100,0	100,0
H1H6975N	214,2	225,9
H1H6800P	198,3	186,8
H1H6803P	190,5	205,5
H1H6762P	186,3	176,7
H1H6765P	186,3	191,3
H1H6793P	179,9	177,9
H1H6782P	179,3	209,9
H1H6976N	169,5	180,4
H1H6785P	169,1	168,0
H1H6958N2	169,0	161,5
H1H6967N	168,6	158,6
H1H6781P	165,1	166,2
H1H6774P	162,3	173,7
H1H6783P	160,7	165,8
H1H6792P	155,9	110,6
H1H6953N	153,9	164,2
H1H6795P	150,7	123,4
H1H6801P	148,9	155,7
H1H6807P	147,0	152,7
H1H6790P	146,9	122,8

Антитело	% интернализации по отношению к Контролю I	% общего связывания по отношению к Контролю I
H1H6797P	145,2	151,2
H1H6804P	138,9	149,6
H1H6966N	137,2	111,3
H1H6960N	120,0	89,7
H1H6959N2	15,3	2,0

[00187] За исключением H1H6959N2, все протестированные антитела связывались с T47D, и почти 100% всех связанных mAb интернализировалось в течение 1 часа. Общая интенсивность интернализированного антитела для большинства антител была выше, чем у контрольного антитела к рецептору пролактина человека (Контроль I).

ПРИМЕР 5. Антитела к рецептору анти-пролактина ингибируют пролактин-опосредованную активацию рецептора в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина человека

[00188] Способность антител к рецептору анти-пролактина блокировать опосредованную пролактином (PRL) активацию рецептора, исследовали способом анализа репортерного гена люциферазы. Эндокринный гормон пролактин связывается с внеклеточным доменом его родственного рецептора PRLR, вызывая быструю гомодимеризацию и активируя несколько нижестоящих сигнальных каскадов.

[00189] В этом Примере использовали сконструированную клеточную линию для определения способности антител к рецептору анти-пролактина блокировать активацию лиганда рецептора PRLR. Вкратце, клеточные линии HEK293/hPRLR/STAT5-Luc со стабильным включением экспрессионной кассеты рецептора пролактина человека и STAT5-зависимого люциферазного репортера получали посредством последовательных раундов Lipofectamine® 2000-обеспечиваемой трансфекции (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Клетки отбирали в течение не менее двух недель в присутствии 500 мкг/мл G418 (hPRLR) и 100 мкг/мл гигромицина В (STAT5-Luc). В анализе STAT5-Luc использовали 2×10^5 клеток HEK293/hPRLR/STAT5-Luc, посеянных в полную питательную среду на покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты, выращивали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. Чтобы получить кривые ингибирования антител, клетки инкубировали (6ч при 37°C) с серийно разведенными антителами к рецептору анти-пролактина (от 100 нмоль до 24 пмоль) в присутствии 5 нмоль постоянного пролактина до регистрации сигнала. Кривые доза-ответ

пролактина получали путем добавления к клеткам серийно разведенного пролактина (от 100 нмоль до 24 пмоль) и регистрации сигнала после 6-часовой инкубации (37°C) в отсутствии антител. Также оценивали способность антител активировать рецептор пролактина в отсутствии лиганда.

[00190] Активность люциферазы измеряли с помощью реагента ONE-Glo™ (Promega, Мэдисон, Висконсин). Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люминометре Victor (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут). Значения EC_{50}/IC_{50} определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 8-точечной кривой отклика с использованием программы GraphPad Prism. Процент блокирования и процент активации сообщается для самой высокой дозы антитела. Результаты приведены в Таблице 7.

Таблица 7: IC_{50} и процентная блокировка опосредованной пролактином передачи сигналов антителами к рецептору анти-пролактина

Антитело	IC_{50} блокирования 5 нмоль пролактина [M]	Процент блокирования при 100 нмоль антитела
H1H6762P	2.19E-11	100
H1H6765P	3.30E-11	100
H1H6774P	NB	0
H1H6781P	2.70E-11	100
H1H6782P	NB	0
H1H6783P	ND	59
H1H6785P	3.45E-10	100
H1H6790P	2.06E-10	100
H1H6792P	5.70E-10	100
H1H6793P	ND	65
H1H6795P	NB	0
H1H6797P	NB	0
H1H6800P	3.55E-10	100
H1H6801P	1.40E-10	100
H1H6803P	6.27E-10	100
H1H6804P	7.89E-09	100
H1H6807P	6.00E-10	100

Антитело	IC ₅₀ блокирования 5 нмоль пролактина [M]	Процент блокирования при 100 нмоль антитела
H1H6953N	1.05E-10	100
H1H6958N2	1.98E-10	100
H1H6959N2	ND	52
H1H6960N	1.58E-09	100
H1H6966N	ND	54
H1H6967N	7.68E-10	100
H1H6975N	2.41E-10	100
H1H6976N	ND	23
Контроль I	1.33E-09	100

NB: блокирование отсутствует; ND: не определено из-за неполного блокирования

[00191] Как указано в Таблице 7, большинство антител ингибировали активацию репортера STAT5 со значениями IC₅₀ в диапазоне от 22 пмоль до 8 нмоль. Все ингибирующие антитела блокировали активацию до базовых уровней (100-процентное блокирование). Кроме того, антитела, протестированные в этом анализе, не активировали STAT5 в отсутствие лиганда пролактина.

[00192] Таким образом, данные этого примера показывают, что большинство антител к рецептору анти-пролактина блокируют опосредованную пролактином активацию рецептора. Кроме того, большинство антител ингибируют активацию рецептора сильнее, чем антитело Контроль I. Например, несколько антител к рецептору анти-пролактина блокировали опосредованную пролактином передачу сигналов со значениями IC₅₀ менее чем около 1,3 нмоль. С другой стороны, некоторые антитела к рецептору анти-пролактина, несмотря на способность связывать рецептор пролактина, не проявляли активности, блокирующей пролактин. Такие неблокирующие антитела к рецептору анти-пролактина могут найти применение в различных терапевтических контекстах, где желательно целевое воздействие рецептора пролактина без вмешательства в нормальную передачу сигнала, опосредованную пролактином.

ПРИМЕР 6. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО С РЕЦЕПТОРОМ АНТИ-ПРОЛАКТИНА

[00193] Отобранные антитела к рецептору анти-пролактина конъюгировали с мейтансиноидом DM1 через линкер SMCC, используя способы, аналогичные тем, которые

изложены в патенте США № 5,208,020 и публикации заявки на патент США № 2010/0129314, раскрытия которых включены здесь в качестве ссылки. Конъюгаты очищали способом эксклюзионной хроматографии и подвергали стерилизующей фильтрации. Все исходные материалы и растворители были приобретены на коммерческой основе и использовались без очистки, если не указано иное.

[00194] Концентрации белка и линкера/полезной нагрузки определяли с помощью УФ-спектрального анализа и масс-спектрометрии MALDI-TOF. ВЭЖХ с исключением по размеру установила, что все использованные конъюгаты были >95% мономерными, и ОФ-ВЭЖХ установила, что полезная нагрузка неконъюгированного линкера была <0,5%. Выходы приведены в Таблице 8 и 9 на основе белка. Все конъюгированные антитела анализировали ультрафиолетовым излучением на предмет значения полезной нагрузки линкера в соответствии с работой Hamblett et al., 2004, Clinical Cancer Research 10 (20): 7063-7070, и по разнице в массе, сравнивая нативную и конъюгированную.

Таблица 8: Концентрации белка для антител, конъюгированных с рецепторами анти-пролактина

Соединение	ϵ_{252} нмоль ($\text{см}^{-1} \text{M}^{-1}$)	ϵ_{280} нмоль ($\text{см}^{-1} \text{M}^{-1}$)
SMCC-DM1	26790	5700
Антитело (неконъюгированное)	ϵ_{252} нмоль ($\text{см}^{-1} \text{M}^{-1}$)	ϵ_{280} нмоль ($\text{см}^{-1} \text{M}^{-1}$)
H1H6958N2	74462	195440
H1H6959N2	77485	209420
H1H6960N	84926	214460
H1H6953N	80673	220420
H1H6975P	81120	199804
Изотипический контроль	84723	218360

Таблица 9: Концентрации линкера/полезной нагрузки антитела для конъюгатов Анти-PRLR-SMCC-DM1

Конъюгат антитела	Молярное соотношение Полезная нагрузка: Антитело (УФ)	Молярное соотношение Полезная нагрузка: Антитело (МС)	Выход %
H1H6958N2-DM1	4,0	3,4	64

H1H6959N2-DM1	3,8	3,3	64
H1H6960N-DM1	3,6	3,0	64
H1H6953N-DM1	3,2	2,7	52
H1H6803P-DM1	ND	3,1	55
H1H6762P-DM1	ND	2,9	70
H1H6765P-DM1	ND	2,3	55
H1H6782P-DM1	ND	2,8	65
H1H6793P-DM1	ND	3,8	55
H1H6975P-DM1	3,0	3,4	60
H1H6800P-DM1	3,0	3,2	50
Изотипический контроль-DM1	3,3	3,3	80

ND: не определялось

[00195] Этот пример иллюстрирует конъюгирование антител к PRLR с DM1 через линкер SMCC. Было рассчитано, что молярное соотношение полезная нагрузка: антитело составляет от примерно 2,3 до примерно 3,8 для конъюгированных антител этого примера. Процентные выходы для антител варьировались от примерно 50% до 70%.

ПРИМЕР 7. Конъюгаты антитело-лекарственное средство с рецептором анти-пролактина эффективно убивают клетки с низкими или умеренными уровнями экспрессии рецептора пролактина, а также клетки с высокими уровнями экспрессии рецептора пролактина

[00196] Чтобы определить относительную активность уничтожения клеток конъюгатами АЛС с рецептором анти-пролактина по сравнению с аналогичными конъюгатами АЛС с рецептором к ErbB2, проводили анализ уничтожения клеток на множестве клеточных линий, экспрессирующих либо PRLR, ErbB2, либо комбинацию обоих рецепторов.

[00197] Для оценки способности антител, конъюгированных с рецептором пролактина, снижать жизнеспособность клеток получали клетки со сверхэкспрессией рецептора пролактина, включая HEK293, PC3, MCF7 и NCI-N87. Для сравнительных целей были также получены клетки PC3 и T47D со сверхэкспрессированным ErbB2, а также клеточная линия MCF7, сверхэкспрессирующая как hPRLR, так и hErbB2. Вкратце, методику трансфекции, опосредованной Lipofectamine® 2000, использовали для получения клеток HEK293, экспрессирующих рецептор пролактина человека (HEK293/hPRLR) или ErbB2 человека (HEK293/hErbB2). Липофектамин LTX с реагентом Plus использовали для создания клеток PC3,

экспрессирующих рецептор пролактина человека (PC3/hPRLR) или ErbB2 человека (PC3/hErbB2). Опосредованную лентивирусами трансдукцию использовали для получения клеток MCF7, экспрессирующих рецептор пролактина человека (MCF7/hPRLR), клеток NCI-N87, экспрессирующих рецептор пролактина человека (NCI-N87/hPRLR), клеток T47D, сверхэкспрессирующих ErbB2 человека (T47D/hErbB2), и клеток MCF7, экспрессирующих как человеческий рецептор пролактина, так и человеческий ErbB2 (MCF7/hPRLR/hErbB2). Все линии отбирали в течение по меньшей мере двух недель в полной среде для выращивания плюс соответствующие реагенты для отбора. Стабильно экспрессирующие популяции обогащали для экспрессии рецептора пролактина способом анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией с использованием контрольного антитела к рецептору анти-пролактина.

[00198] Экспрессию PRLR и ErbB2 клеточной поверхностью анализировали способом анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией с использованием либо антитела Контроль I к рецептору анти-пролактина, либо антитела Контроль II к рецептору HER2 соответственно. Кроме того, также определяли экспрессию эндогенного рецептора пролактина клеточной поверхностью на клеточной линии T47D # 11, вариант линии T47D, выбранной для более агрессивного роста опухоли *in vivo*. Приблизительно 1×10^6 клеток инкубировали с 10 мкг/мл контрольного антитела к рецептору пролактина (контроль I), контрольного антитела к ErbB2 (контроль II) или изотипического контроля в течение 30 минут на льду в буфере для разведения антител. После двух промывок буфером для разведения антител клетки инкубировали с 10 мкг/мл PE-конъюгированных вторичных антител человека в течение 30 минут на льду. После двух дополнительных промывок образцы отбирали на цитометре Accuri C6 (BD) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc., Ашленд, Орегон). Результаты относительного уровня экспрессии приведены в Таблице 10.

Таблица 10: Экспрессирование рецептора пролактина человека на клеточной поверхности (генно-инженерные и эндогенные клеточные линии)

Клеточная линия	Связывание по данным способа FACS (MFI раз выше изотипического контроля)				
	Неокраш.	Только вторичн.	Изотип. контроль	Анти-PRLR (Контроль I)	Анти-ErbB2 (Контроль II)
293	1X	1X	1X	1X	28X
293/hErbB2	1X	1X	1X	1X	215X
293/hPRLR	1X	1X	1X	18X	18X

PC3	1X	1X	1X	1X	41X
PC3/hErbB2	1X	1X	1X	1X	238X
PC3/hPRLR	1X	1X	1X	13X	31X
T47D	1X	1X	1X	12X	87X
T47D#11	1X	1X	1X	10X	ND
T47D/hErbB2	1X	1X	1X	12X	437X
SK-BR-3	1X	1X	1X	1X	600X
MCF7	1X	1X	1X	3X	42X
MCF7/hPRLR	1X	1X	1X	55X	36X
MCF7/hPRLR/hErbB2	1X	1X	1X	55X	349X
NCI-N87	1X	1X	1X	1X	1,400X
NCI-N87/hPRLR	1X	1X	1X	6X	1,400X

[00199] В общем, поверхностная экспрессия экзогенного рецептора PRLR варьировалась от 6 до 55 раз по сравнению с фоном, при этом большинство сконструированных клеток демонстрировали экспрессию рецептора пролактина в 12-18 раз выше по сравнению с фоном. Экспрессия эндогенного рецептора PRLR была в 3 раза выше фоновой в клетках MCF7, но не была обнаружена в родительских линиях HEK293, PC3 и NCI-N87. Экспрессия эндогенного рецептора PRLR была в 12 раз выше фонового уровня в клеточной линии T47D и в 10 раз выше фонового уровня в клеточной линии варианта T47D#11. Экспрессия рецептора ErbB2 была обнаружена во всех линиях клеток, экспрессирующих рецептор пролактина, и находилась в диапазоне от 18 до 1400 раз выше фонового уровня.

[00200] Затем определяли способность конъюгатов АЛС-PRLR-DM1 (то есть антител к рецептору анти-пролактина, конъюгированных с DM1 через нерасщепляемый линкер [SMCC]) снижать жизнеспособность клеток, используя анализ на основе клеток *in vitro*. Клетки высевали в покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты по 1500-10000 клеток на лунку в полной питательной среде и оставляли расти в течение ночи. Для получения кривых жизнеспособности клеток к клеткам добавляли конъюгат АЛС или свободный DM1 (в качестве производного метилдисульфида DM1-SMe) в конечных концентрациях в диапазоне от 500 нмоль до 5 пмоль и инкубировали в течение 3 дней. Клетки 293, PC3 и T47D инкубировали по протоколу CCK8 (Dojindo, Роквилл, Мэриленд) в течение последних 1-3 часов и определяли оптическую плотность при 450 нмоль (OD₄₅₀) на микропланшет-ридере Flexstation3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Клетки MCF7 обрабатывали ядерным красителем Hoechst 33342, а затем фиксировали 4% формальдегидом. Изображения получали на приборе ImageXpress micro

XL (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния), и подсчет ядер вели с помощью программного обеспечения для анализа изображений Columbus (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут). Фоновые значения OD₄₅₀ (PC3, 293 и T47D) или количество ядер (MCF7) из клеток, обработанных дигитонином (40 нмоль), вычитали по всем лункам, жизнеспособность выражали как процент от необработанного контроля. Значения IC₅₀ определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика из 10 точек (GraphPad Prism). Значения IC₅₀ и процент уничтожения клеток показаны в Таблицах 11 и 12.

Таблица 11: Эффективность уничтожения клеток для конъюгатов АЛС-PRLR-DM1

Конъюгат АЛС	293		293/PRLR		PC3		PC3/PRLR	
	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	0,27	98	0,36	97	0,47	91	0,59	80
H1H6953N-DM1	100	88	0,28	95	110	78	0,86	67
H1H6958N2-DM1	75	98	0,10	95	150	83	0,43	83
H1H6959N2-DM1	75	100	4,82	95	150	79	11,6	82
H1H6960N-DM1	75	100	0,38	95	150	80	1,13	82
H1H6975N-DM1	100	87	ND	ND	200	71	2,70	68
H1H6762P-DM1	100	89	ND	ND	250	78	0,98	66
H1H6765P-DM1	100	86	ND	ND	200	70	0,57	70
H1H6782P-DM1	100	86	ND	ND	300	67	0,92	64
H1H6793P-DM1	100	84	ND	ND	200	72	3,65	65
H1H6800P-DM1	150	85	ND	ND	150	72	1,37	68
H1H6803P-DM1	300	7	ND	ND	150	72	2,32	70
Control I-DM1	100	92	0,28	95	>100	79	7,28	80
Изотипич. контроль-DM1	100	60	100	93	125	78	110	63

Значения IC₅₀ даны в нмоль; ND= не определяли; % Kill= процент уничтожения

Таблица 12: Эффективность уничтожения клеток для конъюгатов АЛС Анти-PRLR-DM1 (продолжение)

	T47D	MCF7	MCF7/PRLR
--	------	------	-----------

Конъюгат АЛС	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (free drug)	0,45	86	1,17	83	1,47	88
H1H6953N-DM1	1,64	79	100	55	0,29	76
H1H6958N2-DM1	1,34	71	100	77	0,19	77
H1H6959N2-DM1	48,90	71	100	82	0,47	80
H1H6960N-DM1	5,10	71	100	77	0,29	78
H1H6975N-DM1	6,90	80	150	73	0,49	87
H1H6762P-DM1	12,60	80	110	64	0,46	83
H1H6765P-DM1	1,63	78	150	68	0,18	84
H1H6782P-DM1	4,19	74	120	57	0,65	85
H1H6793P-DM1	11,10	53	125	67	0,54	87
H1H6800P-DM1	3,20	79	150	65	0,40	85
H1H6803P-DM1	8,61	77	150	60	0,44	84
Контроль I-DM1	24,50	65	100	46	0,59	75
Изотипич. контроль-DM1	150	61	120	66	100	84

Значения IC₅₀ даны в нмоль; % Kill= процент уничтожения

[00201] Как показано в Таблицах 11 и 12, несколько конъюгатов АЛС-PRLR-DM1 сильно снижали жизнеспособность клеток во множестве клеточных фонов со значениями IC₅₀ всего 100 пмоль. Иллюстрационное конъюгированное с рецептором анти-пролактина антитело, H1H6958N2-DM1, снижало жизнеспособность клеток HEK293, PC3 и MCF7-PRLR, экспрессирующих клетки со значениями IC₅₀s менее нмоль в диапазоне от 100 пмоль до 460 пмоль, и убивало эндогенные экспрессирующие клетки T47D со значением IC₅₀ 1,3 нмоль. Аналогично конъюгированное с рецептором анти-пролактина антитело контроля I (контроль I-DM1) было в несколько раз менее активным, чем H1H6958N2-DM1 во всех клеточных линиях. Не связывающиеся антитела изотипического контроля и неконъюгированные антитела не влияли на жизнеспособность клеток.

[00202] Кроме того, оценивали влияние лиганда рецептора пролактина, пролактина, на уничтожение клеток PRLR-SMCC-DM1 в отношении клеток T47D. Клетки T47D инкубировали одновременно с пролактином (15 нмоль) и либо неблокирующим антителом к рецептору анти-пролактина (H1H6782P), либо антителом, блокирующим рецептор (H1H6958N2). Результаты сведены в Таблицу 13.

Таблица 13: Эффективность уничтожения клеток конъюгатами АЛС-PRLR-DM1 в присутствии лиганда рецептора пролактина (пролактина)

Обработка	HEK293		T47D	
	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill
Me-SS-May Свободный DM1	0,6	94	0,30	100
Изотипический контроль-SMCC-DM1	100	78	300	94
Изотипический контроль -SMCC-DM1 +15 нмоль пролактина	170	82	97	89
H1H6958N2-SMCC-DM1	90	88	1,0	100
H1H6958N2-SMCC-DM1 +15 нмоль пролактина	110	86	3,0	100
H1H6782P-SMCC-DM1	90	83	1,0	98
H1H6782P-SMCC-DM1 + 15 нмоль пролактина	70	78	2,0	97

% Kill= процент уничтожения

[00203] Как показано в Таблице 13, присутствие пролактина оказывало лишь умеренное влияние на уничтожение клеток, опосредованное конъюгатом АЛС с рецептором пролактина, с наблюдаемым снижением в 2-3 раза эффективности уничтожения клеток тестируемых моноклональных антител.

[00204] Также оценивали эффективность антител, конъюгированных с рецептором пролактина, по сравнению со сходным антителом к коэкспрессированной на клеточной поверхности мишени ErbB2. Как PRLR, так и ErbB2 экспрессируются в большинстве случаев рака молочной железы, а антитела к ErbB2, конъюгированные с DM1, продемонстрировали клиническую эффективность при целенаправленном воздействии на ErbB2-рецептор положительный рак молочной железы (Hurvitz et al; 2013). Контрольное антитело к рецептору ErbB2 (Контроль II), конъюгированное с DM1 (Контроль II-DM1), тестировали способом анализа жизнеспособности *in vitro* на клеточных линиях, сгенерированных выше. Эффективность уничтожения клеток конъюгированными антителами к рецептору анти-пролактина по сравнению с конъюгированным антителом к рецептору анти-ErbB2 приведена в Таблицах 14-17.

Таблица 14: Эффективность уничтожения клеток конъюгированными антителами анти-PRLR-DM1 и анти-ErbB2-DM1

Конъюгат АЛС	293		293/ErbB2		293/PRLR	
	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	0,5	95	0,26	100	0,82	95
H1H6953N-DM1 (Анти PRLR-DM1)	100	92	120	98	0,43	93
Контроль II-DM1 (Анти ErbB2-DM1)	100	89	2,0	98	100	88
Изотипический контроль-DM1	150	86	110	98	150	86
Экспрессия PRLR	1X		1X		18X	
Экспрессия ErbB2	28X		215X		18X	

Значения IC₅₀ даны в нмоль; % Kill= процент уничтожения

Таблица 15: Эффективность уничтожения клеток конъюгированными антителами анти-PRLR-DM1 и анти-ErbB2-DM1 (продолжение)

Конъюгат АЛС	PC3		PC3/ErbB2		PC3/PRLR	
	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	0,44	88	0,42	85	0,24	82
H1H6953N-DM1 (Анти PRLR-DM1)	100	80	80	73	0,68	76
Контроль II-DM1 (Анти ErbB2-DM1)	90	80	1,1	80	100	62
Изотипический контроль-DM1	85	82	90	71	100	62
Экспрессия PRLR	1X		1X		13X	
Экспрессия ErbB2	41X		238X		31X	

Значения IC₅₀ даны в нмоль; % Kill= процент уничтожения

Таблица 16: Эффективность уничтожения клеток конъюгированными антителами анти-PRLR-DM1 и анти-ErbB2-DM1 (продолжение)

Конъюгат АЛС	T47D		T47D/ErbB2		SK-BR-3		MCF7	
	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	0,21	80	0,18	71	0,39	74	0,54	78
H1H6953N-DM1 (Анти PRLR-DM1)	1,3	78	2,4	80	100	77	82	74

Контроль II-DM1 (Анти ErbB2-DM1)	100	59	1,18	81	0,48	81	80	68
Изотипический контроль-DM1	100	62	120	75	110	76	100	65
Экспрессия PRLR	12X		12X		1X		3X	
Экспрессия ErbB2	87X		437X		600X		42X	

Значения IC₅₀ даны в нмоль; % Kill= процент уничтожения

Таблица 17: Эффективность уничтожения клеток конъюгатами АЛС-PRLR-DM1 и конъюгатами АЛС- ErbB2-DM1 (продолжение)

Конъюгат АЛС	MCF7/PRLR		MCF/PRLR +ErbB2		NCI-N87		NCI-N87/PRLR	
	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill	IC ₅₀	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	1,85	79	0,82	77	0,84	95	1,45	98
H1H6953N-DM1 (Анти PRLR-DM1)	0,33	76	0,33	77	90	83	2,9	94
Контроль II-DM1 (Анти ErbB2-DM1)	100	56	0,63	76	0,22	95	0,66	94
Изотипический контроль-DM1	150	61	100	70	90	85	85	88
Экспрессия PRLR	55X		55X		1X		6X	
Экспрессия ErbB2	36X		349X		1400X		1400X	

Значения IC₅₀ даны в нмоль; % Kill= процент уничтожения

[00205] Антитела к анти-PRLR-DM1 эффективно убивали клетки даже при относительно низких уровнях экспрессии рецептора пролактина. Например, антитела H1H6953N-DM1 (анти-PRLR-DM1) ингибировали рост клеток T47D (экспрессирующих рецептор пролактина на уровне всего в 12 раз выше фонового) со значением IC₅₀ 1,3 нмоль и показывали 78% уничтожения. Это же антитело также ингибировало рост клеток 293/hPRLR (экспрессирующих рецептор пролактина на уровне в 18 раз выше фонового) со значением IC₅₀ 0,43 нмоль и показало 93% уничтожения. Эквивалентное уничтожение антителом к анти-ErbB2-DM1 («контроль II») наблюдалось только в клетках, которые экспрессируют антиген-мишень на

уровнях, превышающих фоновый примерно в 200-400 раз (см., например, PC3/hErbB2, экспрессирующий рецептор ErbB2 в 238 раз выше фонового уровня и T47D/hErbB2, экспрессирующий рецептор ErbB2 в 437 выше фонового уровня). Следовательно, эти данные свидетельствуют о том, что конъюгаты АЛС с рецептором к анти-пролактину могут эффективно воздействовать и убивать опухолевые клетки с относительно низкими уровнями экспрессии рецептора пролактина, тогда как конъюгаты АЛС с рецептором ErbB2 эффективны только против опухолей с очень высокими уровнями экспрессии рецептора ErbB2.

[00206] Наконец, эффективность антител к рецептору анти-пролактина, конъюгированных с DM1 через нерасщепляемый линкер SMCC, сравнивали с эффективностью уничтожения клеток антителами к рецептору анти-пролактина, конъюгированных с антителом MMAE через расщепляемый линкер: mc-vc-PAB (доступный в компании Concortis, Сан-Диего, Калифорния). Клетками, использованными в этом эксперименте, были PC3, PC3/hPRLR, MCF7/ATCC и MCF7/PRLR. Результаты показаны в Таблице 18.

Таблица 18: Эффективность конъюгата АЛС с рецептором анти-пролактина для уничтожения клеток

	PC3		PC3/hPRLR		MCF7/ATCC		MCF7/PRLR	
	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill
Свободный DM1	0,5	90	1,0	70	3,0	80	1,9	86
Свободный MMAE	1,4	90	1,0	77	2,4	83	1,5	95
Изотипический контроль I-SMCC-DM1	95	79	100	79	100	71	100	76
Изотипический контроль I-mc-VC-PAB-MMAE	200	33	145	55	143	23	143	21
H1H6953N-SMCC-DM1	90	81	0,4	83	80	70	0,1	80
H1H6953N-mc-VC-PAB-MMAE	130	49	0,2	80	150	42	0,1	85
H1H6958N2-SMCC-DM1	110	81	0,5	79	90	72	0,2	83
H1H6958N2-mc-VC-PAB-MMAE	100	39	0,5	82	150	53	0,2	88
H1H6765P-SMCC-DM1	80	80	0,3	83	90	71	0,1	81
H1H6765P-mc-VC-	150	29	0,40	85	150	38	0,2	86

	PC3		PC3/hPRLR		MCF7/ATCC		MCF7/PRLR	
PAB-MMAE								

% Kill= процент уничтожения

[00207] Как показано в Таблице 18, почти эквивалентное уничтожение клеток в клеточных линиях PC3/hPRLR и MCF7/hPRLR наблюдалось как для нерасщепляемых конъюгатов АЛС DM1 (H1H6953-SMCC-DM1, H1H6958N2-SMCC-DM1 и H1H6765-SMCC-DM1), так и для расщепляемых конъюгатов АЛС MMAE (H1H6953-mc-vc-PAB-MMAE, H1H6958N2-mc-VC-PAB-MMAE и H1H6765-mc-VC-PAB-MMAE).

[00208] Дополнительные токсины (DM4, MeNHC3-May и MMD), конъюгированные с антителами к анти-пролактину, также тестировали в клеточных линиях T47D и MCF7/hPRLR, результаты сведены в Таблицы 19 (уничтожение клеток 293 и T47D) и 20 (MCF7/ATCC и MCF7/PRLR уничтожение клеток). (ND = не обнаружено).

Таблица 19: Конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина – способность к уничтожению клеток (клеточные линии 293 и T47D)

			Клеточная линия			
			293		T47D	
Антитело	Линкер	Лекарственное средство	IC ₅₀ нмоль	% Kill	IC ₅₀ нмоль	% Kill
Свободный		DM1 (Me-SS-May)	1.2	95	1.5	100
		MMAE	0.9	100	1	100
		DM4	0.6	100	0.5	100
		MMD	0.9	100	2	100
		MeNHC3-May	60	90	90	100
Изотипический контроль I	SMCC	DM1	150	80	140	50
	mc-VC-PAB	MMAE	300	30	300	20
		MMD	300	70	140	70
		MeNHC3-May	300	30	300	30
	SPDB	DM4	50	90	30	100
H1H6953N	SMCC	DM1	100	90	1.5	100
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1.0	80
		MMD	110	70	1.0	90
		MeNHC3-May	300	20	1.0	90
H1H6958N2	SMCC	DM1	100	90	2	100
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1	90
	SPDB	DM4	ND	ND	1	100
H1H6975P	SMCC	DM1	80	90	2	100
	mc-VC-PAB	MMD	110	80	3	90

H1H6782P	SMCC	DM1	120	80	3	100
	mc-VC-PAB	MMD	230	70	2	90
	mc-VC-PAB	MeNHC3-May	60	90	2	90
H1H6765P	SMCC	DM1	85	100	1	90
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1	90

Таблица 20: Конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина – способность к уничтожению клеток (клеточные линии MCF7/ATCC and MCF7/PRLR)

			Клеточная линия			
			MCF7/ATCC		MCF7/PRLR	
Антитело	Линкер	Лекарственное средство	IC ₅₀ нмоль	% Kill	IC ₅₀ нмоль	% Kill
Свободный		DM1 (Me-SS-May)	1.3	80	0.8	80
		MMAE	2.4	80	1.5	95
		DM4	1.3	90	2	90
		MMD	2	90	0.4	90
		MeNHC3-May	100	70	50	80
Изотипический контроль I	SMCC	DM1	300	60	150	70
	mc-VC-PAB	MMAE	140	20	140	20
		MMD	300	40	70	75
		MeNHC3-May	300	30	200	55
	SPDB	DM4	70	80	80	90
H1H6953N	SMCC	DM1	90	70	0.3	80
	mc-VC-PAB	MMAE	150	40	0.1	85
		MMD	300	50	0.2	90
		MeNHC3-May	150	60	0.2	80
H1H6958N2	SMCC	DM1	70	70	0.2	80
	mc-VC-PAB	MMAE	150	50	0.2	90
	SPDB	DM4	25	80	0.8	90
H1H6975P	SMCC	DM1	200	70	0.2	80
	mc-VC-PAB	MMD	150	50	0.2	90

H1H6782P	SMCC	DM1	250	70	0.3	80
	mc-VC-PAB	MMD	200	50	0.3	90
	mc-VC-PAB	MeNHC3-May	250	50	0.2	80
H1H6765P	SMCC	DM1	150	70	0.3	90
	mc-VC-PAB	MMAE	150	40	0.2	90

[00209] Все протестированные конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина, независимо от используемого токсина и линкера, специфически убивали тестируемые клетки. Значения IC₅₀s жизнеспособности клеток T47D варьировались от 0,6 нмоль до 3,4 нмоль, значения IC₅₀s жизнеспособности клеток MCF7/hPRLR варьировалась от 0,2 нмоль до 0,8 нмоль.

ПРИМЕР 8. Конъюгат АЛС с рецептором анти-пролактина эффективно ингибирует рост клеток *in vivo*

[00210] Для определения эффективности *in vivo* конъюгатов АЛС-PRLR-DM1 были проведены исследования на мышах с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты пролактин-рецептор положительного рака молочной железы.

[00211] Вкратце, 20×10⁶ клеток MCF7/PRLR (ATCC HTB-22, трансфицированных полноразмерным hPRLR, как описано ранее) имплантировали подкожно в левый жировой слой молочной железы самок голых мышей NCr. В других исследованиях 10×10⁶ PC3/PRLR (ATCC CRL-1435, трансфицированный полноразмерным hPRLR, как описано ранее) имплантировали подкожно в левый бок самцам мышей SCID. Кроме того, 10×10⁶ родительских клеток T47D (ATCC HTB-133) или 7,5×10¹⁰ клеток T47D#11 (ATCC HTB-133, серийно пассированных *in vivo*, как описано ниже), подкожно имплантировали в левый бок самкам мышей CB17 SCID. Все мыши были получены от производителя Taconic (Гудзон, Нью-Йорк). Каждый болюс клеток дополняли гранулами высвобождения эстрогена в течение 90 дней (1,7 мг/гранула; Innovative Research America, Сарасота, Флорида). Когда средний объем опухолей достигал 250 мм³, мышей рандомизировали на группы по семь особей, которым вводили конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина или контрольные реагенты. Контрольные реагенты включали носитель PBS, свободный метилдисульфид DM1 (DM1-SMe) и контрольный изотип 1-DM1.

[00212] В многодозовых исследованиях мышам вводили препарат один раз в неделю в общей сложности три недели, при этом объем опухолей и массу тела контролировали два раза в неделю в течение всего исследования. Тестовые конъюгаты АЛС в многодозовых исследованиях вводили в дозе 5 мг/кг и/или 15 мг/кг. В исследованиях с однократной дозой мыши получали однократную дозу тестового конъюгата АЛС, объем опухолей и массу тела контролировали дважды в неделю в

течение всего исследования. Тестовые конъюгаты АЛС в исследованиях с одной дозой вводили в дозах 1, 2,5, 5 и 15 мг/кг. Средний размер опухоли, а также ингибирование роста опухоли относительно группы, получавшей носитель, рассчитывали для каждой группы. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, пока средний размер группы, получавшей носитель не достиг 1000 мм³. Размер опухоли рассчитывали по Формуле (длина x ширина²)/2. Ингибирование роста опухоли рассчитывали по следующей Формуле: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}) / (C_{\text{final}} - C_{\text{initial}}))) * 100$, где Т (обработанная группа) и С (контрольная группа) представляют собой среднюю массу опухоли в день, когда размер опухоли в экспериментальной группе достиг 1000 мм³. Животных наблюдали до 52-го дня. Результаты сведены в Таблицы 21-25 (многократная доза) и Таблицу 26 (однократная доза). (NT = не тестировалось в показанном конкретном эксперименте).

Таблица 21: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли MCF7/PRLR (ИССЛЕДОВАНИЕ № 1)

[голые мыши NCr – сведения собраны на 52-ой день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	1068 ± 384	-
Свободный DM1	0,2	625 ± 141	57
Изотипический контроль Ab-DM1	5	NT	NT
	15	300 ± 141	96
H1H6958N2	15	483 ± 46	74
H1H6958N2-DM1	5	51 ± 33	128
	15	0 ± 0	133
H1H6953N	15	421 ± 23	79
H1H6953N-DM1	5	107 ± 45	120
	15	0 ± 0	133
H1H6975N	15	659 ± 144	51
H1H6975N-DM1	5	125 ± 46	118
	15	0 ± 0	135
H1H6782P	15	NT	NT

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
H1H6782P-DM1	5		
	15		
H1H6765P	15	NT	NT
H1H6765P-DM1	5		
	15		

*SEM: стандартная погрешность среднего

Таблица 22: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли MCF7/PRLR (ИССЛЕДОВАНИЕ № 2)

[голые мыши NCr – сведения собраны на 63-ий день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	870 ± 211	-
Свободный DM1	0,2	1080 ± 451	-33
Изотипический контроль Ab-DM1	5	1106 ± 371	-39
	15	712 ± 214	24
H1H6958N2	15	766 ± 128	17
H1H6958N2-DM1	5	117 ± 10	116
	15	0 ± 0	137
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
H1H6782P	15	300 ± 83	88
H1H6782P-DM1	5	74 ± 34	123
	15	0 ± 0	137
H1H6765P	15	737 ± 182	19
H1H6765P-DM1	5	90 ± 56	122
	15	0 ± 0	136

Таблица 23: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли РС3/PRLR (ИССЛЕДОВАНИЕ № 1)

[мышь SCID – сведения собраны на 63-ий день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	1311 ± 257	-
Свободный DM1	0,2	1361 ± 120	-5
Изотипический контроль Ab-DM1	5	1379 ± 128	-7
	15	1091 ± 93	19
H1H6958N2	15	1507 ± 106	-19
H1H6958N2-DM1	5	1247 ± 171	5
	15	808 ± 83	46
H1H6953N	15	1306 ± 127	0
H1H6953N-DM1	5	1058 ± 138	23
	15	892 ± 53	39
H1H6975N	15	1185 ± 97	12
H1H6975N-DM1	5	973 ± 169	31
	15	895 ± 63	38

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
H1H6782P	15	NT	NT
H1H6782P-DM1	5		
	15		
H1H6765P	15	NT	NT
H1H6765P-DM1	5		
	15		

Таблица 24: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли

PC3/PRLR (ИССЛЕДОВАНИЕ № 2)

[мышы SCID– сведения собраны на 55-ый день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	1222 ± 99	0
Свободный DM1	0.2	1147 ± 59	7
Изотипический контроль Ab-DM1	5	1052 ± 101	16
	15	1049 ± 127	16
H1H6958N2	15	917 ± 253	28
H1H6958N2-DM1	5	566 ± 63	61
	15	230 ± 22	94
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		
H1H6782P	15	1154 ± 212	6
H1H6782P-DM1	5	490 ± 63	69
	15	321 ± 33	85
H1H6765P	15	1208 ± 72	1

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
H1H6765P-DM1	5	489 ± 70	70
	15	181 ± 42	98

Таблица 25: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли T47D#11 (ИССЛЕДОВАНИЕ № 1)

[мыши SCID – сведения собраны на 66-ой день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	1234 ± 88	0
Свободный DM1	0.2	1433 ± 23	-19
Изотипический контроль Ab-DM1	5	1340 ± 176	-9
	15	1678 ± 67	-42
H1H6958N2	15	1259 ± 122	-3
H1H6958N2-DM1	5	168 ± 19	102
	15	44 ± 5	112
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		
H1H6782P	15	1537 ± 111	-29
H1H6782P-DM1	5	293 ± 20	90
	15	124 ± 36	106

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
H1H6765P	15	1278 ± 164	-3
H1H6765P-DM1	5	183 ± 28	100
	15	69 ± 12	111

Таблица 26: Размер опухоли и ингибирование роста опухоли после многократного введения конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина и контролей – опухоли MCF7/PRLR

[сведения собраны на 55-й день]

Экспериментальная группа	Доза (мг/кг)	Конечный размер опухоли, мм ³ (среднее ± SEM)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель	--	710 ± 249	0
Изотипический контроль Аб-DM1	15	514 ± 86	38
H1H6958N2	15	703 ± 160	1
H1H6958N2-1	1	274 ± 142	86
H1H6958N2-1	2.5	172 ± 53	109
H1H6958N2-1	5	107 ± 26	120
H1H6958N2-1	15	33 ± 23	136

ОБСУЖДЕНИЕ

[00213] В этом Примере пять иллюстративных антител к рецептору анти-пролактина, конъюгированных с DM1, первоначально оценивали на способность уменьшать объем опухолей MCF7/PRLR и PC3/PRLR в исследованиях с множеством доз. В первом многодозовом исследовании (Таблица 21) антитела H1H6958N2-DM1, H1H6953N-DM1 и H1H6975N-DM1 сильно ингибировали рост опухоли MCF7/PRLR при дозах 5 и 15 мг/кг. При самой высокой дозе все три антитела, конъюгированные с DM1, уменьшали опухоли до неопределяемых уровней с процентным уменьшением объема опухоли примерно на 133-135%. Этот результат был повторен во втором многодозовом исследовании (Таблица 22), где антиген H1H6958N2-DM1 исследовали вместе с двумя дополнительными иллюстративными антителами к рецептору анти-пролактина конъюгированными с DM1: H1H6782P и H1H6765P. Во втором исследовании рост опухоли также был снижен до неопределяемых уровней при самой высокой дозе 15 мг/кг с процентным уменьшением объема опухоли 136-137%. Хотя обработка неконъюгированными антителами к рецептору анти-пролактина приводила к умеренному уменьшению объема опухоли (17-79%) по сравнению с контрольной группой, наибольшее ингибирование размера опухоли наблюдалось в когортах, обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство.

[00214] Затем противоопухолевую эффективность тех же самых иллюстративных антител к рецептору анти-пролактина DM1 оценивали в исследованиях с множеством доз на мышах, несущих пролактин-рецептор положительные ксенотрансплантаты PC3/PRLR (Таблицы 23 и 24). Мышей лечили после того, как опухоли выросли в течение 21 дня. Все антитела - H1H6958N2-DM1, H1H6953N-DM1 и H1H6975N-DM1 - продемонстрировали ингибирование роста опухоли, особенно в самой высокой дозе 15 мг/кг. (Таблица 23). Противоопухолевый эффект аналогичным образом наблюдался во втором исследовании, когда антитело H1H6958N2-DM1 тестировали вместе с антителами H1H6765P-DM1 и H1H6782P-DM1 после 15 дней роста опухоли. При введении самой высокой дозы процент ингибирования опухоли в разных исследованиях варьировало от 38 до 98%. (Таблица 24). Для сравнения, антитело изотипического контроля, конъюгированное с DM1, вызывало только 16% ингибирование роста опухоли с конечными объемами опухоли, которые существенно не отличались от контрольного.

[00215] Дальнейшую оценку конъюгатов анти-PRLR- АЛС, введенных многократно в дозах 5 и 15 мг/кг, проводили на мышах, несущих ксенотрансплантаты T47D#11, эндогенно экспрессирующих рецептор пролактина. (Таблица 25). Как и в других моделях опухоли, дозирование начинали, когда размер опухоли составлял в среднем 200 мм³. Результаты, полученные на этой модели опухоли, соответствовали более ранним результатам и четко

продemonстрировали противоопухолевую активность антител к рецептору анти-пролактина, конъюгированных с DM1. Например, конъюгаты АЛС с антителами H1H6958N2-DM1, H1H6765P-DM1 и H1H6782P-DM1 эффективно ингибируют рост опухоли при дозах 5 мг/кг и 15 мг/кг. При 5 мг/кг конъюгаты АЛС-PRLR-DM1 демонстрировали 89-100% ингибирование опухоли, тогда как при 15 мг/кг DM1-конъюгированные антитела приводили к 106-112% ингибированию роста опухоли. Важно, что неконъюгированные антитела к рецептору пролактина не обнаруживали какой-либо противоопухолевой эффективности в этой модели эндогенной опухоли, что указывает на роль конъюгата DM1 в обеспечении противоопухолевой эффективности. Опять же, эффективность конъюгата АЛС с рецептором анти-пролактина была очень специфической, поскольку контрольный конъюгат АЛС не оказывал какого-либо влияния на рост опухоли.

[00216] В последнем Примере конъюгатированное с DM1 тело H1H6958N2 оценивали у мышей с ксенотрансплантированной опухолью MCF7/PRLR в исследовании с однократной дозой. (Таблица 26). Как и в исследованиях с множественными дозами, установленным опухолям позволяли расти приблизительно до 200 мм³ до введения однократной дозы. Здесь антитело H1H6958N2-DM1 вводили в дозах 1, 2,5, 5 и 15 мг/кг. Как показано в Таблице 26, дозозависимый противоопухолевый эффект наблюдался в широком диапазоне, использованном в этом исследовании. Противоопухолевый эффект наблюдался при всех дозах, при этом доза 1 мг/кг вызывала значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с опухолями контрольной группы. Кроме того, хотя 15 мг/кг изотипического контроля I-DM1 оказывали некоторое противоопухолевое действие (~ 38% ингибирование роста опухоли), анти-PRLR-DM1 в дозе 2,5 мг/кг и выше значительно снижали объем опухоли (> 100% ингибирование роста опухоли при всех исследованных дозах выше 1 мг/кг). Разовые дозы 5 мг/кг и 15 мг/кг продемонстрировали противоопухолевую эффективность, сравнимую с таковой, наблюдаемой после повторного введения дозы на том же уровне, что иллюстрирует эффективность конъюгатов АЛС с рецептором анти-пролактина.

[00217] Таким образом, этот пример иллюстрирует, что конъюгаты АЛС с рецептором анти-пролактина являются мощными ингибиторами роста опухоли и способны уменьшать размер опухоли до необнаружимых уровней в различных исследованных моделях опухолей.

ПРИМЕР 9. Конъюгаты алс против рецепторов цитокина Класса I эффективно уничтожают клеточные линии, экспрессирующие низкие уровни целевого антигена

[00218] Как обсуждалось в другом разделе данного раскрытия, конъюгаты антитело-лекарственное средство против рецептора пролактина эффективно убивают экспрессирующие рецептор пролактина клеточные линии, даже те, которые экспрессируют относительно низкие

уровни целевого антигена. Как отмечалось ранее, рецептор пролактина относится к семейству рецепторов цитокинов класса I, которое включает IL-4R и IL-6R. Подобно рецептору пролактина, IL-4R и IL-6R являются однопроходными трансмембранными рецепторами; IL-4R опосредует передачу сигналов IL-4 и IL-13, тогда как IL-6R опосредует передачу сигналов IL-6 через комплекс с рецептором gp130. В качестве дополнительного подтверждения концепции о том, что конъюгаты АЛС, направленные против рецепторов цитокинов класса I, могут быть использованы для эффективного уничтожения клеток, включая клетки, экспрессирующие низкие уровни целевого антигена, оценивали способность конъюгатов АЛС уничтожать клетки в отношении рецепторов IL-4R и IL-6R.

[00219] Уровни антигена клеточной поверхности на клетках, которые эндогенно или рекомбинантно экспрессируют рецепторы IL-4R или IL-6R, были впервые установлены с использованием способа анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией. Вкратце, приблизительно 1 миллион клеток KG-1 (IL-4R⁺), HEK293/IL-4R и Ramos (IL-6R⁺) инкубировали с иллюстративными антителами к рецепторам анти-IL-4R (H4H083P2, см. Патент США № 7,608,693) и анти-IL-6R (VV6A9-5, см. Патент США № 7,582,298) в течение 30 минут на льду. После промывки добавляли PE-конъюгированное вторичное антитело человека (10 мкг/мл) в течение 30 минут с последующей второй стадией промывки и анализом на цитометре Ассиги С6 с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc., Ашленд, Орегон). Относительные уровни экспрессии рецепторов IL-4R и IL-6R клеточной поверхностью рассчитывали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) выше уровней изотипического контроля. Уровни экспрессии приведены в Таблице 27.

Таблица 27: Относительная экспрессия рецепторов IL-4R и IL-6R клеточной поверхностью в клеточных линиях, эндогенно или рекомбинантно экспрессирующих рецепторы IL-4R and IL-6R

Экспрессия рецептора	Уровень экспрессии клеточной линии; кол-во раз выше фонового уровня			
	HEK293	HEK293/IL4R	KG-1	Ramos
IL-4R	2	50	1	4
IL-6R	1	1	7	1

[00220] Как показано в Таблице 27, клетки HEK293 и Ramos эндогенно экспрессировали рецептор IL-4R на уровнях в 2 и 4 раза выше фонового, соответственно, тогда как генно-инженерная клеточная линия HEK293/IL-4R экспрессировала рецептор IL-4R на уровнях в 50 раз выше фонового. На клетках KG-1 экспрессия рецептора IL-4R не определялась выше

фоновый уровень. Экспрессия рецептора IL-6R была обнаружена в 7 раз выше фоновых уровней в клетках KG-1, но не в клеточных линиях HEK293 или Ramos.

[00221] Затем, иллюстративные антитела к рецепторам IL-4R (H4H083P2) и IL-6R (VV6A9-5) конъюгировали с цитотоксическим лекарственным средством DM1 и оценивали их эффективность в реакциях цитотоксичности. Вкратце, клеточные линии HEK293/IL-4R, Ramos или KG-1, а также родительские клетки HEK293 высевали в покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты по 1500-10000 клеток на лунку. Конъюгат АЛС или свободный DM1 (как производное метилдисульфида DM1-SMe) добавляли к клеткам в конечных концентрациях в диапазоне от 300 нмоль до 15 пмоль и инкубировали в течение 3 дней. Клетки инкубировали по протоколу CCK8 (Dojindo, Роквилл, Мэриленд) в течение последних 1-3 часов и определяли оптическую плотность при 450 нмоль (OD₄₅₀) на микропланшет-ридере Flexstation3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Значения фонового OD₄₅₀ для клеток, обработанных дигитонином (40 нмоль), вычитали из всех лунок, жизнеспособность выражали в виде процента от необработанного контроля. Значения IC₅₀ определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика из 10 точек (GraphPad Prism). Результаты представлены в Таблице 28.

Таблица 28: Эффективность уничтожения клеток конъюгатами АЛС анти-IL4R и анти-IL6R на клеточных линиях, экспрессирующих рецепторы IL4R and IL-6R

Конъюгат АЛС	HEK293		HEK293/ hIL4R		KG-1		Ramos	
	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill	IC ₅₀ (нмоль)	% Kill
DM1 (свободное ЛС)	0,27	100	0,33	98	1,26	89	0,34	100
Изотипический контроль-DM1	70	89	110	91	100	74	60	91
Анти-IL-4R-DM1	80	91	0,22	95	90	83	18	91
Анти-IL-6R-DM1	100	88	70	92	38	77	70	94
Уровни экспресс рецептора: раз выше уровня изотипического контроля								
IL-4R	2		50		1		4	
IL-6R	1		1		7		1	

*%Kill: процент уничтожения клеток

[00222] Как показано в Таблице 28, конъюгаты антитело-лекарственное средство анти-IL-4R-DM1 снижали жизнеспособность клеток Ramos со значением IC₅₀ 18 нмоль, несмотря на то, что поверхностная экспрессия рецептора IL-4R была всего в 4 раза выше фоновых уровней.

конъюгаты АЛС анти-IL-4R-DM1 снижали высокую жизнеспособность клеток HEK293/IL-4R, экспрессирующих рецептор IL-4R, со значением IC_{50} 0,22 нмоль. Конъюгаты антитело-лекарственное средство анти-IL-6R-DM1 оказывали умеренное, но воспроизводимое влияние на жизнеспособность клеток KG-1 (экспрессирующих IL-6R на уровне в 7 раз выше фонового со значением IC_{50} 38 нмоль по сравнению со значением IC_{50} 100 нмоль у эквивалентно конъюгированного конъюгата АЛС изотипического контроля.

[00223] Таким образом, этот пример демонстрирует, что конъюгаты с антителами к анти-IL-4R и анти-IL-6R проявляли сильную и воспроизводимую цитотоксичность даже на клеточных линиях, экспрессирующих невысокие уровни рецепторов. Этот результат аналогичен тому, что наблюдалось для конъюгатов АЛС с рецепторами анти-пролактина, где уничтожение клеток на высоком уровне достигалось даже на клетках, экспрессирующих низкие уровни рецептора пролактина (см., например, Пример 7 в данном документе). Таким образом, этот пример дополнительно подтверждает идею изобретения, состоящую в том, что конъюгаты АЛС цитокиновых рецепторов класса I в целом могут быть эффективными терапевтическими средствами против клеточных линий и опухолей, которые экспрессируют рецепторы цитокинов класса I даже на низких уровнях.

ПРИМЕР 10. Картирование эпитопов способом водород-дейтериевого обмена

[00224] Были проведены эксперименты по определению аминокислотных остатков рецептора пролактина, с которыми взаимодействует антитело H1H6958N2. Для этого было проведено картирование эпитопа способом водород-дейтериевого (H/D) обмена. Общее описание метода водород-дейтериевого обмена изложено, например, в работах Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00225] Для картирования связывающего эпитопа(ов) антитела H1H6958N2 на домене hPRLR посредством водород-дейтериевого обмена, конструкцию, содержащую рекомбинантный внеклеточный домен hPRLR с С-концевой мик-мик-гексагистиридиновой меткой (hPRLR-mmH; SEQ ID NO: 406) заменяли на фосфатно-солевым буфером с конечной концентрацией 8 мг/мл, и антитело H1H6958N2 ковалентно связывали с агарозными гранулами N-гидроксисукцинимидом (NHS) (GE Lifescience).

[00226] В эксперименте «в раствор/с гранул» (обмен с переходом в раствор с последующим обменом с переходом с гранул) домен hPRLR дейтерировали в течение 5 минут или 10 минут в фосфатно-солевом буфере, приготовленном с D_2O , и затем связывали с гранулами антитела H1H6958N2 путем инкубации в течение 2 минут. Связанные с доменом hPRLR гранулы промывали водным раствором фосфатно-солевого буфера (приготовленного с H_2O) и инкубировали фосфатно-солевой буфер в течение половины времени обмена. После обмена с

гранул связанный домен hPRLR элюировали из гранул охлажденным на льду раствором трифторуксусной кислоты с низким pH. Затем элюированный домен hPRLR расщепляли иммобилизованным пепсином (ThermoScientific) в течение 5 минут. Полученные пептиды обессоливали, используя наконечники для хроматографической пипетки ZipTip®, и сразу же анализировали методом времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы UltrafleXtreme (MALDI-TOF)-TOF.

[00227] В эксперименте «в гранулы/с гранул» (обмен с переходом на гранулы с последующим переходом с гранул) домен hPRLR сначала связывали с гранулами антитела H1H6958N2, а затем инкубировали в течение 5 минут или 10 минут в D₂O для обмена с гранул. Следующие этапы (обмен с гранул, расщепление пепсином и анализ МС) выполняли, как описано для процедуры «в раствор/с гранул». Значения центроидов или среднее отношение массы к заряду (м/з) всех обнаруженных пептидов рассчитывали и сравнивали между этими двумя наборами экспериментов.

[00228] Результаты сведены в Таблицу 29, которая обеспечивает сравнение значений масса/заряд центроидов для всех обнаруженных пептидов, идентифицированных жидкостной хроматографией и МС после водород-дейтериевого обмена и описанной выше процедуры расщепления пепсином. Для целей настоящего примера положительная разница (Δ), равная по меньшей мере 0,20 масса/заряд в обоих экспериментах, указывает на аминокислоты, защищенные связыванием антитела. Сегменты, отвечающие этому критерию, обозначены жирным шрифтом и звездочкой (*) в Таблице 29. [Обратите внимание, что, хотя этот эксперимент был проведен с усеченной формой рецептора пролактина (то есть hPRLR-mmH; SEQIDNO: 406), нумерация остатков в крайнем левом столбце Таблицы 29 была откорректирована с учетом аминокислотной последовательности белка рецептора пролактина полной длины, представленной в последовательности SEQIDNO: 404.]

Таблица 29: Связывание антитела H1H6958N2 с доменом hPRLR-mmH

Остатки (SEQ ID NO:404)	Эксперимент I			Эксперимент II		
	5 мин. обмен в раствор/ 2,5 мин. обмен с гранул			10 мин. обмен в раствор-/ 5 мин. обмен с гранул		
	в раствор/ с гранул	на гранулы/ с гранул	Δ	в раствор/ с гранул	на гранулы/ с гранул	Δ
61-71	1306,39	1306,50	-0,10	1306,34	1306,38	-0,04
64-71	1005,13	1005,05	0,07	1005,13	1005,18	-0,05
64-72	1136,16	1136,15	0,01	1136,33	1136,49	-0,16
72-94*	2573,91	2572,17	1,74	2573,74	2572,12	1,62
72-95*	2705,49	2703,43	2,06	2705,29	2703,70	1,60
96-101*	870,70	870,20	0,50	870,71	870,20	0,52

Остатки (SEQ ID NO:404)	Эксперимент I 5 мин. обмен в раствор/ 2,5 мин. обмен с гранул			Эксперимент II 10 мин. обмен в раствор-/ 5 мин. обмен с гранул		
	в раствор/ с гранул	на гранулы/ с гранул	Δ	в раствор/ с гранул	на гранулы/ с гранул	Δ
96-102*	1001,59	1001,22	0,37	1001,62	1001,14	0,48
133-147	1786,59	1786,37	0,22	1786,55	1786,52	0,02
134-147	1673,36	1673,29	0,07	1673,50	1673,39	0,11
135-147	1602,15	1602,02	0,13	1602,15	1602,04	0,11
136-147	1502,85	1502,88	-0,03	1502,79	1502,88	-0,09
137-147	1373,78	1373,68	0,09	1373,80	1373,84	-0,04
168-179	1447,73	1447,71	0,02	1447,76	1447,78	-0,02
168-180	1633,59	1633,66	-0,06	1633,71	1633,64	0,08
169-180	1469,67	1469,86	-0,19	1469,71	1469,67	0,04
170-179	1155,40	1155,35	0,05	1155,40	1155,39	0,01
170-180	1341,62	1341,66	-0,04	1341,49	1341,34	0,15
191-205	1772,03	1772,03	-0,01	1772,15	1772,28	-0,13
192-202	1284,36	1284,39	-0,03	1284,32	1284,43	-0,11
192-205	1624,94	1624,98	-0,04	1625,08	1625,17	-0,10
206-215	1261,44	1261,33	0,11	1261,24	1261,46	-0,22
206-217	1419,64	1419,65	-0,01	1419,48	1419,45	0,02
206-222	1962,58	1962,39	0,20	1962,52	1962,63	-0,10
236-249	1560,81	1560,76	0,05	1560,81	1560,83	-0,01
238-261	2828,15	2827,99	0,16	2827,99	2828,17	-0,18
241-261	2498,70	2498,74	-0,04	2498,68	2498,88	-0,20

[00229] Хотя большинство наблюдаемых пептидов давали сходные значения в центроидах для протоколов «в раствор/с гранул» и «на гранулы/с гранул», область, соответствующая аминокислотным остаткам с 72 по 102 из SEQIDNO: 404 имела значения дельта-центроида более 0,20 м/з в обоих экспериментах. Таким образом, результаты водород-дейтериевого обмена, обобщенные в таблице 29, показывают, что область, соответствующая аминокислотам с 72 по 102 SEQIDNO: 404 (т.е. MNECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMM, SEQID: 405), содержит эпитоп рецептора пролактина, с которым взаимодействует антитело H1H6958N2. Этот эпитоп расположен внутри фибронектиноподобного домена 1 типа III («домен 1») внеклеточного домена рецептора пролактина. Таким образом, настоящий пример в сочетании с другими изложенными здесь иллюстративными примерами идентифицирует домен 1 внеклеточного домена рецептора

пролактина в качестве особенно эффективной мишени для антител и конъюгатов АЛС, которые полезны для лечения заболеваний и расстройств, связанных с рецептором пролактина.

ПРИМЕР 11. Экспрессия рецептора пролактина на поверхности клеточных линий и в раковых опухолях молочной железы человека

[00230] Для оценки экспрессии рецептора пролактина при раке молочной железы человека образцы опухолей рака молочной железы оценивали с использованием технологии гибридизации *in situ* RNAscope (Advanced Cell Diagnostics). Внедренные образцы, зафиксированные формалином и залитые парафином, брали из микрочипов опухолей молочной железы (ТМА), полученных от компании Indivumed. Срезы опухоли оценивали на предмет экспрессии РНК рецептора пролактина с использованием специфических РНК-зондов и обрабатывали с использованием хромогенных красок на основе диаминобензидина в соответствии со стандартными протоколами. Изображения сканировали с использованием оборудования Aperio XT Scan при 40-кратном увеличении (Leica Systems), выполняли качественную оценку экспрессии рецептора пролактина в образцах.

[00231] Экспрессия рецептора пролактина была гетерогенной в некоторых опухолях (данные не показаны). Корреляции между экспрессией рецептора пролактина и гормональным рецептором или HER2-статусом опухолей не наблюдалось, при этом рецептор пролактина обнаруживался как в гормон-рецептор положительных опухолях, так и в ER/PR/HER2 «тройных негативных» опухолях. Эти данные согласуются с анализом уровней мРНК PRLR при раке молочной железы человека из общедоступных баз данных по экспрессии генов (данные не представлены).

ПРИМЕР 12. Конъюгаты алс с рецептором анти-пролактина блокируют связывание и опосредованную пролактином активность STAT5

[00232] Были разработаны анализы блокирования на основе способа ELISA для определения способности антител H1H6958N2 и H1H6958N2-DM1 блокировать связывание рецептора пролактина человека и обезьяны *Cynomolgus* с иммобилизованным пролактином человека. В этом анализе использовали димерные формы связывание рецептора пролактина человека или обезьяны *Cynomolgus* (*Macaca flavicularis*) и мономерный пролактин человека. Чтобы получить начальные кривые зависимости доза-эффект, рецептор пролактина человека или обезьяны в концентрациях от 3,38 пмоль до 200 нмоль добавляли в планшеты, предварительно покрытые 1 мкг/мл пролактина. После 1-часовой инкубации захваченный рецептор пролактина детектировали с помощью антитела козы к Fc γ , конъюгированного с пероксидазой хрена, и визуализировали с колориметрическим субстратом триметилбензола путем измерения поглощения при 450 нмоль. Чтобы определить ингибирование связывания рецептора

пролактина с помощью антител H1H6958N2 или H1H6958N2-DM1, 10 нмоль рецептора пролактина человека или обезьяны смешивали с mAb или конъюгатом АЛС в диапазоне от 520 пмоль до 30 нмоль и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смеси добавляли в планшеты, покрытые 1 мкг/мл пролактина, и захваченный рецептор пролактина определяли, как описано выше. Данные анализировали с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 11-точечной кривой отклика в программном обеспечении GraphPad Prism, рассчитывали значения IC_{50} .

[00233] Способность антител H1H6958N2 и H1H6958N2-DM1 блокировать передачу сигналов рецептора пролактина, индуцированную человеческим пролактином, определяли с помощью анализа репортерного гена люциферазы с использованием клеточной линии HEK293, сконструированной для конститутивной экспрессии рецептора пролактина и стабильно трансдуцированной с помощью конструкции репортерного гена люциферазы, содержащей 5 tandemных сайтов связывания STAT5, производных от промотора гена α человеческого рецептора интерлейкина-2 [элемент ответа STAT5 (x5) - люцифераза] (John et al., The EMBO Journal, 1996, 15(20):5627-5635). Факторы транскрипции STAT5 являются известными медиаторами внутриклеточной трансдукции сигнала после рецептора пролактина (Fang et al., BMC Biotechnology, 2008, 8:11). Чтобы получить кривую доза-ответ, человеческий пролактин добавляли к репортерным клеткам в концентрациях от 0,8 пмоль до 100 нмоль. После добавления пролактина клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C и 5% CO₂ и затем уравнивали до комнатной температуры в течение 15 мин. Активность люциферазы измеряли с использованием субстрата ONE-Glo и методом люминесценции. Для проверки на ингибирование пролактин-опосредованной передачи сигналов рецептора пролактина в клетках, добавляли mAb или конъюгат АЛС в концентрациях от 3,3 пмоль до 200 нмоль (молярность указывает концентрацию антител как для конъюгата АЛС, так и для mAb) с последующим добавлением пролактина в постоянной концентрации 2 нмоль. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 часов и уравнивали до комнатной температуры в течение 10 минут. Активность люциферазы снова измеряли с использованием субстрата ONE-Glo и метода люминесценции.

[00234] Антитело H1H6958N2-DM1 блокировало связывание рецептора пролактина человека или обезьяны с мономерным лигандом пролактина человека с помощью метода ELISA (ФИГ. 1). Здесь рецепторы пролактина человека или обезьяны связаны с пролактином человека дозозависимым образом со значениями EC_{50} , равными 4,9 и 5,7 нмоль, соответственно (сплошные черные квадраты во вставках на ФИГ. 1А и 1В). Антитела H1H6958N2-DM1 и H1H6958N2 блокировали связывание 10 нмоль рецептора пролактина человека с иммобилизованным пролактином человека со значениями IC_{50} 4,4 нмоль и 5,0 нмоль,

соответственно (ФИГ. 1A). Аналогичным образом, антитела H1H6958N2-DM1 и H1H6958N2 блокировали связывание рецептора пролактин обезьяны с пролактином человека со значениями IC_{50} 4,2 нмоль и 5,8 нмоль соответственно (ФИГ. 1B). Контрольное антитело и контрольный конъюгат АЛС не демонстрировали какой-либо блокирующей активности в идентичных условиях анализа.

[00235] Чтобы гарантировать, что антитело H1H6958N2-DM1 также блокирует пролактин-индуцированную активность STAT5, была создана линия репортерных клеток HEK293/PRLR/STAT5-Luc. В этой репортерной линии было определено, что 2,1 нмоль человеческого пролактина является концентрацией, необходимой для стимуляции передачи сигналов человеческого рецептора пролактина до 50% от максимального уровня активности (EC_{50}) (ФИГ. 1C). Как H1H6958N2, так и H1H6958N2-DM1 эффективно блокировали индуцированную пролактином люциферазную активность дозозависимым образом, при этом для 50% снижения передачи сигналов рецептора пролактина (IC_{50}) в присутствии пролактина в постоянной концентрации 2 нмоль требуется 0,4 нмоль антител H1H6958N2 и H1H6958N2-DM1. Как и в случае блокирующих анализов ELISA, ни контрольный mAb, ни контрольный конъюгат АЛС не блокировали пролактин-индуцированную передачу сигналов PRLR-STAT5.

[00236] Таким образом, в дополнение к цитотоксической активности антитела DM1, H1H6958N2-DM1 эффективно блокирует связывание пролактина с рецептором пролактина и блокирует индуцированную пролактином передачу сигналов STAT5.

ПРИМЕР 13. Антитело H1H6958N2-DM1 имеет противоопухолевую активность в отношении ксенотрансплантатов раковых опухолей MCF7 и MCF7/PRLR

[00237] Были проведены дополнительные эксперименты для оценки общей противоопухолевой активности антитела H1H6958N2-DM1 на нескольких моделях ксенотрансплантата опухоли молочной железы, экспрессирующих как эндогенный, так и трансфицированный рецептор пролактина.

[00238] После того, как опухоли MCF7 или MCF7/PRLR достигали среднего объема ~150-200 мм³ (через 14-16 дней после имплантации), мышей рандомизировали в группы лечения (n=8-9 мышей/группа) и системно путем внутривенной инъекции в хвостовую вену вводили однократную дозу или три раза в неделю дозы антитела H1H6958N2-DM1, контрольного конъюгата АЛС или контрольного носителя. Размер опухоли и массу тела измеряли *in vivo* два раза в неделю на протяжении всего исследования.

[00239] Активность антитела H1H6958N2-DM1 в опухоли, экспрессирующей низкие уровни рецептора, оценивали с использованием голых мышей NCr с установленными ксенотрансплантатами опухоли MCF7. Хотя эта линия опухолевых клеток не ингибировалась

антителом H1H6958N2-DM1 *in vitro* (см. выше), умеренная противоопухолевая активность *in vivo* наблюдалась после однократного приема 5 мг/кг или 10 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 (ФИГ. 2A). При самой высокой оценке дозы (15 мг/кг) антитело H1H6958N2-DM1 значительно ингибировало рост опухолей MCF7 по сравнению с контрольным конъюгатом АЛС. Повторное лечение опухолей MCF7 в последующем исследовании привело к более выраженным противоопухолевым эффектам, чем в исследовании с однократным введением. Здесь, как 10 мг/кг, так и 15 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 значительно ингибировали рост опухоли MCF7 относительно контрольного конъюгата АЛС, хотя некоторая противоопухолевая активность индуцировалась контрольным конъюгатом АЛС по сравнению с контролем с носителем (ФИГ. 2B).

[00240] Затем оценивали терапевтическую эффективность антитела H1H6958N2-DM1 в ксенотрансплантате опухоли MCF7/PRLR, экспрессирующем высокие уровни рецептора пролактина. Здесь лечение однократным введением антитела H1H6958N2-DM1 в дозе 2,5-15 мг/кг было активным, при этом значительная противоопухолевая эффективность наблюдалась при всех дозах. Наблюдалась повышенная активность при дозах 10 мг/кг и 15 мг/кг, причем эти дозы вызывали эрадикацию опухолей в ходе исследования (ФИГ. 2C). Введение доз три раза в неделю дало дальнейшую значительную противоопухолевую активность, при этом повторные дозы 5 мг/кг и 15 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 приводили к эрадикации опухоли в этой модели (ФИГ. 2D). У контрольного конъюгата АЛС в этой модели противоопухолевой активности не наблюдалось, неконъюгированное антитело H1H6958N2, которое также оценивали в этом исследовании, также не вызывало какого-либо ингибирования роста опухоли.

[00241] Ксенотрансплантаты опухоли MCF7 продемонстрировали четкую реакцию на антитело H1H6958N2-DM1 *in vivo*, несмотря на экспрессию умеренных уровней рецептора пролактина и нечувствительность к конъюгату АЛС *in vitro*. Причиной наблюдаемого дифференциального ответа может быть большее воздействие антитела H1H6958N2-DM1 *in vivo* или относительное увеличение экспрессии рецептора пролактина *in vivo*.

ПРИМЕР 14: противоопухолевая активность антитела H1H6958N2-DM1 в отношении ксенотрансплантата раковой опухоли T47Dv11 и повышение активности в комбинации с фулвестрантом

[00242] Модель опухоли T47Dv11 использовалась для оценки активности антитела H1H6958N2-DM1 в модели со значительными уровнями экспрессии эндогенного рецептора пролактина. Поскольку родительские T47D-клетки слабо онкогенны, для пассивного использования варианта *in vivo* был разработан вариант с устойчивой онкогенностью. Первоначально 10×10^6 родительских клеток T47D имплантировали подкожно (SC) в левый бок

самкам мышей C.B.-17 SCID (Taconic, Гудзон, Нью-Йорк). Опухоли дополняли гранулами эстрогена высвобождения в течение 90 дней (Innovative Research America). Там, где наблюдали опухоли T47D, их иссекали и разрезали на фрагменты размером 3 мм, а затем имплантировали в левый бок отдельных самок мышей C.B.-17 SCID. Последующее пассирование проводили до тех пор, пока большая опухоль не была дезагрегирована в суспензию отдельных клеток. Клетки (названные T47Dv11) из этой опухоли затем культивировали *in vitro* и размножали. Проточная цитометрия подтвердила, что генерация клеток T47DvII не изменяла экспрессию рецептора пролактина относительно родительской клетки (данные не показаны). Для исследований эффективности имплантировали $7,5 \times 10^6$ клеток T47Dv11 в левый бок самок мышей C.B.-17 SCID с добавлением 90-дневного высвобожденного эстрогена в гранулах 0,72 мг/гранула. Для ксенотрансплантатов опухолей MCF7 и MCF7/PRLR 2×10^7 клеток опухоли MCF7/PRLR имплантировали SC в левый жировой слой молочной железы самок голых мышей NCr (7-8 недель) с добавлением 90-дневного высвобожденного эстрогена в гранулах 0,72 мг/гранула. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю на протяжении каждого исследования. Объем опухоли рассчитывали по Формуле $TV = (длина \times ширина^2)/2$.

[00243] После того, как опухоли T47Dv11 достигли среднего объема $\sim 150-200 \text{ мм}^3$ (через 14-16 дней после имплантации), мышей рандомизировали в группы лечения ($n = 8-9$ мышей/группа) и системно путем внутривенной инъекции в хвостовую вену вводили однократную дозу или три раза в неделю дозы антитела H1H6958N2-DM1, контрольного конъюгата АЛС или контрольного носителя. Фулвестрант селективного подавления рецептора эстрогена (SERD) (Faslodex, Astra Zeneca) вводили подкожно в рекомендованном носителе (10% вес/объем спирта, 10% вес/объем бензилового спирта и 15% вес/объем бензилбензоата, полученного до 100% мас./об. с касторовым маслом) один раз в неделю в течение всего периода исследования. Размер опухоли и массу тела измеряли *in vivo* два раза в неделю на протяжении всего исследования.

[00244] Однократное введение антитела H1H6958N2-DM1 в дозе 2,5 мг/кг или 5 мг/кг значительно ингибировало рост опухоли (ФИГ. 3А). Как отмечалось в других моделях, повторное дозирование вызывало более сильную противоопухолевую эффективность; три дозы 5 мг/кг или 15 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 вызывали регрессию опухоли. Полная регрессия была очевидна в отношении некоторых опухолей, которые получили самую высокую дозу конъюгата АЛС (ФИГ. 3В). У контрольного конъюгата АЛС в модели T47Dv11 противоопухолевой активности не наблюдалось, неконъюгированное антитело H1H6958N2 также не вызывало какого-либо ингибирования роста опухоли.

[00245] Затем комбинацию антитела H1H6958N2-DM1 с фулвестрантом SERD испытывали на модели ксенотрансплантата опухоли T47Dv11. Здесь активность любого агента в частично эффективных дозах сравнивали с активностью агентов в комбинации. Во-первых, было

проведено исследование дозы-титрования еженедельного введения фулвестранта для определения его активности в отношении одного агента (ФИГ. 4). Отдельные эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что непрерывное культивирование клеток T47DvII с цитостатическими концентрациями фулвестранта (10 или 100 нмоль) значительно не снижало экспрессию рецептора пролактина, по результатам оценки с помощью проточной цитометрии или вестерн-блоттинга (данные не показаны). Значительная противоопухолевая активность наблюдалась после отдельного введения 2,5 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 и 150 или 250 мг/кг фулвестранта. Наблюдалось, что комбинация этих агентов вызывала значительное увеличение противоопухолевой активности, предоставляя дополнительные доказательства того, что комбинация антитела H1H6958N2-DM1 с фулвестрантом обладает аддитивной эффективностью при ER-положительных опухолях (ФИГ. 3С и Таблица 30).

Таблица 30: Ингибирование роста опухоли T47DvII на 70-ый день лечения мышей SCID конъюгатом АЛС с рецептором анти-пролактина и фулвестрантом

Экспериментальная группа	Конечный объем опухоли (mean $\pm$ SD)	Среднее ингибирование роста опухоли (%)
Носитель PBS	1212 $\pm$ 95	0
H1H6958N2-DM1 2,5 мг/кг	386 $\pm$ 249	77
Изотипический контроль Ab-DM1 2,5 мг/кг	1177 $\pm$ 229	3
Фулвестрант 150 мг/кг	660 $\pm$ 205	52
Фулвестрант 250 мг/кг	433 $\pm$ 189	74
Изотипический контроль Ab-DM1 + Фулвестрант 150 мг/кг	758 $\pm$ 360	42
Изотипический контроль Ab-DM1 + Фулвестрант 250 мг/кг	552 $\pm$ 282	62
H1H6958N2-DM1 + Фулвестрант 150 мг/кг	148 $\pm$ 81	101
H1H6958N2-DM1 + Фулвестрант 250 мг/кг	150 $\pm$ 74	100

* mean $\pm$ SD: среднее значение $\pm$ стандартная погрешность среднего

ИЗМЕРЕНИЕ РОСТА ОПУХОЛЕЙ И ИНГИБИРОВАНИЯ

[00246] Для подкожных опухолей рассчитывали средний размер опухоли, а также ингибирование роста опухоли относительно группы, получавшей носитель, для каждой группы. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, пока средний размер группы, получавшей носитель, не достиг 1200 мм³. Размер опухоли рассчитывали по Формуле (длина $\times$

ширина²)/2. Для всех исследований ингибирование роста опухоли рассчитывали по следующей Формуле: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}) / (C_{\text{final}} - C_{\text{initial}}))) * 100$, где Т (экспериментальная группа) и С (контрольная группа) представляют собой среднюю массу опухоли в день, когда размер опухоли в экспериментальной группе достиг 1000 мм³.

[00247] Таким образом, в сочетании с неожиданными предварительными экспериментами *in vitro*, которые продемонстрировали, что культура клеток с цитостатическими концентрациями фулвестранта не проявляла значительно сниженную экспрессию рецептора пролактина, эти результаты *in vivo* демонстрируют, что антитело H1H6958N2-DM1 в комбинации с фулвестрантом обладает превосходным противоопухолевым действием. Эффективность по отношению к отдельным агентам и комбинации полезна при лечении пролактин-рецептор положительного рака молочной железы.

ПРИМЕР 15. фармакодинамическая оценка активности антитела H1H6958N2-DM1 IN VIVO

[00248] Чтобы подтвердить активность антитела DM1 в отношении активности микротрубочек, вызывание остановки митоза после лечения опухолей T47DvII антителом H1H6958N2-DM1 *in vivo* оценивали с помощью иммуногистохимии фосфогистона-Н3 (pHH3). Мышам имплантировали клетки опухоли T47DvII, опухоли выращивали в течение 15 дней, при этом мышей рандомизировали на основании объема опухоли и внутривенно вводили либо носитель, антитело H1H6958N2-DM1 в количестве 5 или 15 мг/кг, либо контрольный конъюгат АЛС в количестве 15 мг/кг (N=4-5). Через 24, 48 или 72 часа после обработки мышей умерщвляли и опухоли обрабатывали в качестве образцов, зафиксированных формалином и залитых парафином для анализа ИГХ. Затем срезы опухоли окрашивали антителом к фосфогистону Н3 (pHH3) (клон: Ser10, Cell Signaling Technology # 9701) в качестве меры митотических клеток. Изображения сканировали с помощью прибора Aperio XT Scan при скорости 40x (Leica Systems). PHH3-положительные ядерные сигналы визуализировали и количественно определяли с помощью алгоритма Halo CytoNuclear Count (Halo, Indica Labs). Процент положительных клеток в каждой опухоли определяли количественно для каждой группы и рассчитывали среднее значение для каждого условия лечения.

[00249] Опухоли, обработанные антителом H1H6958N2-DM1 в дозе 5 мг/кг, продемонстрировали явную индукцию иммунореактивности pHH3 со значительным увеличением по сравнению с опухолями, обработанными носителем (ФИГ. 5). При более высокой дозе антитела H1H6958N2-DM1, равной 15 мг/кг, было очевидным дальнейшее повышение уровня pHH3 в опухолях (данные не показаны). Удивительно, но уровни pHH3 достигли максимума через 48 часов после введения и были несколько ниже через 72 часа, что

указывает на время максимальной активности DM1 в отношении микротрубочек и остановки клеточного цикла. Важно, что индукция pHH3 в опухолях была специфичной для лечения антителом H1H6958N2-DM1, так как опухоли, обработанные 15 мг/кг контрольного конъюгата АЛС, не имели значительного увеличения pHH3 по сравнению с опухолями, обработанными носителем. Соответственно, уровни экспрессии pHH3, полученные в результате лечения антителом H1H6958N2-DM1 в дозе 5 или 15 мг/кг, были значительно выше, чем наблюдаемые в контрольных опухолях, обработанных конъюгатом АЛС.

[00250] Таким образом, целевая доставка DM1 после специфической интернализации антитела H1H6958N2-DM1 увеличивала уровни pHH3 в обработанных опухолях, что указывает на остановку митоза.

ПРИМЕР 16: противоопухолевая активность антитела H1H6958N2-DM1 в отношении опухоли, полученной от ксенотрансплантата пациента TM00107

[00251] Эффективность антитела H1H6958N2-DM1 также оценивали на модели рака молочной железы, полученной от ксенотрансплантата (PDX) пациента, которая может лучше представлять ответ у пациентов. Мышей NOD SCID гамма (NSG), несущих фрагменты опухоли опухоли рака молочной железы TM00107 PDX, получали из лаборатории The Jackson Laboratories. Модель TM00107 PDX была получена из ER+/-PR-/HER2- метастатической аденокарциномы молочной железы. Экспрессия рецептора пролактина подтверждалась анализом микрочипов и иммуногистохимией на предметных стеклах образцов опухолей, предоставленных лабораторией The Jackson Laboratories (данные не показаны). Когда средний объем опухолей составлял ~ 400-600 мм³ (через 21 день после имплантации), мышей рандомизировали в группы лечения (n = 7 мышей/группа), им вводили антитело H1H6958N2-DM1, контрольный конъюгат АЛС или контрольный носитель путем внутривенной инъекции один раз в неделю в общей сложности 4 недели. Отдельной экспериментальной группе вводили паклитаксел путем внутривенной инъекции каждые 4 дня, всего 4 дозы.

[00252] Контрольные опухоли росли очень быстро, и мышей, которые получали контрольный носитель, подвергали эвтаназии на 30 день после имплантации из-за большого объема опухоли. В это время наблюдалось умеренное, но достоверное (p < 0,01) уменьшение средних объемов опухолей у мышей, получавших 20 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1, по сравнению с животными, которым вводили 20 мг/кг контрольного конъюгата АЛС (ФИГ. 6А). Тенденция к ингибированию роста опухоли наблюдалась у мышей, получавших более низкую дозу 10 мг/кг антитела H1H6958N2-DM1 по сравнению с контрольными мышами, получавшими носитель, однако значительного различия в среднем объеме опухоли не наблюдалось. Лечение паклитакселем не оказывало влияния на рост опухоли.

[00253] Эти эксперименты демонстрируют полезность антитела H1H6958N2-DM1 для лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы в PDX-модели рака молочной железы.

[00254] Настоящее раскрытие не должно ограничиваться в объеме описанными здесь конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации в дополнение к описанным здесь станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих иллюстраций. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой Формулы изобретения.

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> METHODS OF TREATING PRLR POSITIVE BREAST CANCER

<130> 10314P1-US

<141> Filed herewith

<160> 406

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt cactatggca tgggtctgggt ccgccagcct 120
ccaggcaagg ggcctggagtg ggtggcactt atatcatttg atggaactac taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt atttctgtgt tggggctatt 300
gcagcagctg ccttcgatct ctgggggccgt ggcaccctgg tcaactgtctc ctca      354
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

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

Val Gly Ala Ile Ala Ala Ala Ala Phe Asp Leu Trp Gly Arg 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
 ggattcacct tcagtcacta tggc

24

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

<220>
 <223> Synthetic

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

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 5
 atatcatttg atggaactac taaa

24

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 6
 Ile Ser Phe Asp Gly Thr Thr Lys
 1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 7
gttgggggcta ttgcagcagc tgccttcgat ctc

33

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 8
Val Gly Ala Ile Ala Ala Ala Ala Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 9
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcgacttag cctggtagca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatagt gcatccgcca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttctactg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcccatgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

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

100

105

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 11
cagagtgtta gcagcgac

18

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
Gln Ser Val Ser Ser Asp
1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 13
agtgcattcc

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 14
Ser Ala Ser
1

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 15
cagcagtata ataactggcc catgtacact 30

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 16
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggtggt gtggtccggc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag gttctggatt cagcttcgat gatcatggca tgaactgggt ccgccaaggt 120
ccaggggaagg gactggagtg ggtctctggt tttaattgga atgggtggtag tacaaattat 180
gcagaatctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaggaa ctccctgttt 240
ctgcaaataga acagtctgag agccgaggac acggccttat attactgtgt gagaggtcgc 300
agtggctggt tcaatgatgc ttttgatgtc tggggcccag gaacaatggt caccgtctct 360
tca 363

<210> 18
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

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

115

120

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 19
 ggattcagct tcgatgatca tggc

24

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 20
 Gly Phe Ser Phe Asp Asp His Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 21
 tttaattgga atggtggtag taca

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 22
 Phe Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 23
gtgagaggtc gcagtggtg gttcaatgat gcttttgatg tc 42

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 24
Val Arg Gly Arg Ser Gly Trp Phe Asn Asp Ala Phe Asp Val
1 5 10

<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 25
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gactattaac agcaactact tagcctggta ccgacagaaa 120
cctggccaga ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gtagggccac tggcatccca 180
gacagggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttctctc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatgctg gtttaccacac ttteggccct 300
gggaccacaaag tggatatcaa a 321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 26
Glu Ile Val 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 Thr Ile Asn Ser Asn
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Gly Leu Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 27
cagactatta acagcaacta c

21

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 28
Gln Thr Ile Asn Ser Asn Tyr
1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 29
ggtacatcc

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 30
Gly Thr Ser
1

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 31
cagcagtatg ctggtttacc cact

24

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 32
 Gln Gln Tyr Ala Gly Leu Pro Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 33
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggcccagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt cacctttagt acctattgga tgagttgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gactggactg ggtgggcaac ataaagcaag atggaagtga acaaaactat 180
 gtggactctg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctgctgttt 240
 ctgcaaataa acagtctgcg agccgaggac acgggtgtgt attactgtgc gactcttctg 300
 actaagggtg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctctca 348

<210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Gly Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Gln Asn Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Leu Leu Thr Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 35
ggattcacct ttagtaccta ttgg

24

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 36
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 37
ataaagcaag atggaagtga acaa

24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 38
Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Gln
1 5

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 39
gcgactcttc tgactaaggg tgactac

27

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 40
 Ala Thr Leu Leu Thr Lys Gly Asp Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 41
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtgggaga cagcgtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtc ggacattagt aattatttag actggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccattt tgcaagggtg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccgacag tataagactt acccattcac ttcgggcct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

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

<220>
 <223> Synthetic

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

<210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 43
caggacatta gtaattat

18

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 44
Gln Asp Ile Ser 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
cgacagtata agacttaccc attcact

27

<210> 48
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 48

Arg Gln Tyr Lys Thr Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 49

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 49

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagac ttggtacagc ctggagagtc cctgagactc 60
tcctgtacag cctctggatt caccttcaat agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggtctcatat attagtagta gtggtggtac caaatactac 180
gtagactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca acgccaagaa gtcactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgatgac acggctcttt attactgtgc gagactcaat 300
gggggttgatg tttttgatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 50

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

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 51
 ggattcacct tcaatagtta tgaa 24

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 52
 Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Glu
 1 5

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 53
 attagtagta gtggtggtac caaa 24

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 54
 Ile Ser Ser Ser Gly Gly Thr Lys
 1 5

<210> 55
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 55
 gcgagactca atgggggttga tgtttttgat atc 33

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 56

Ala Arg Leu Asn Gly Val Asp Val Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 57

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 57

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca ggacattttc aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagttc ctgagctcct gatctctgct gcgtccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacatat ttcactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
gaagatattg ctacttatta ctgtcaaaga tataacagtg ccccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa 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 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Phe Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Ser Ala Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 59
caggacattt tcaattat 18

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 60
Gln Asp Ile Phe Asn Tyr
1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 61
gctgcgctcc 9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 62
Ala Ala Ser
1

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 63
caaagatata acagtgtccc gctcact 27

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

<220>
<223> Synthetic

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

<210> 65
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 65
 gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attatttga atagtgggtca cataggctat 180
 ggggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa atccctatat 240
 ctgcaaataa acagtctgag agctgaggac acggccttgt attattgtgc aagagatagt 300
 gggagggtacc agtcctactt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 66
 <211> 120
 <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 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ile Trp Asn Ser Gly His Ile Gly Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys 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 Arg Asp Ser Gly Arg Tyr Gln Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<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
 attatttgga atagtgggtca cata 24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

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

<210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 71
 gcaagagata gtgggaggta ccagtcctac tttgactac 39

<210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 72
 Ala Arg Asp Ser Gly Arg Tyr Gln Ser Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 73
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 73
 gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca cattattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaggctct gatctttaag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatactt attctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 74
 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 His Ile Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser 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
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Ser Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 75
 cacattatta gtagctgg

18

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 76
His Ile Ile Ser Ser Trp
1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 77
aaggcgtct

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 78
Lys Ala Ser
1

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 79
caacagtata atacttattc tcggacg

27

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 80
Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Ser Arg Thr

1

5

<210> 81
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 81
 caggtagcagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
 acctgtgccca tctccgggga cagtgtctct agtaatactt ttgcttgga ctggatcagg 120
 cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
 attgattatg cagaatctgt gaaaagtcga ataaccatca cccagagac atccaagaac 240
 cagttctccc tgcagttgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctctgta ttactgtgca 300
 ggtggataca cctatgcccc ccggggtgct tttgatatct ggggccaagg gacaatggtc 360
 accgtctctt ca 372

<210> 82
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Thr Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Ile Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Thr Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Leu
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 83
 ggggacagtg tctctagtaa tacttttgct

30

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 84
Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 85
acatactaca ggtccaagtg gtatatatt

27

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 86
Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Ile
1 5

<210> 87
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 87
gcaggtggat acacctatgc cccccggggt gcttttgata tc

42

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 88
Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 89
<211> 318
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 89
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc cttaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatgttagtt atttcacttt tggccagggg 300
accaagctgg agatcaaa 318

<210> 90
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

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

<210> 91
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 91
cagagtatta gtagctgg

18

<210> 92
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 92

Gln Ser Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 93

aaggcgtct

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 94

Lys Ala Ser

1

<210> 95

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 95

caacagtatg ttagttatct cact

24

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 96

Gln Gln Tyr Val Ser Tyr Phe Thr

1 5

<210> 97
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 97
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtgcagc ctggaggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gatttcatac attagtagtc gtggtggtac catatactac 180
 gcagactcta taaagggccg attcaccatc tacagagaca acgccaggaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatctt attactgtgc gagactgagt 300
 gggggtgata tttttgatat ctgggggcca gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 98
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

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

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 99
 ggattcacct tcagtagtta tgaa

24

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

<220>

<223> Synthetic

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu

1

5

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 101

attagtagtc gtggtggtac cata

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 102

Ile Ser Ser Arg Gly Gly Thr Ile

1

5

<210> 103

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 103

gcgagactga gtggggttga tatttttgat atc

33

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 104

Ala Arg Leu Ser Gly Val Asp Ile Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 105

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 105
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagttc ctaaactcct gatctatctt gcatccactt tgcaatcagg ggtcccttct 180
cgcttcagtg gcggtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatggtg caacttatta ctgtcaaagg tataacagtg ccccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 106
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Ser Ala Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 107
cagggcatta gcaattat

18

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 108
Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 109
tttgcattcc

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 110
Phe Ala Ser
1

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 111
caaagggtata acagtgtccc gctcact

27

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 112
Gln Arg Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 113

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgacctgggt cgcagggt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attactggta gtgttggtaa cacatactac 180
gcagactctg tgaagggtcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctggg agccgaggat acggccgaat attactgtgc gaaaggggag 300
ggaatgacta cgaactggta cctcgatctc tggggccgtg gcacctggt caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 114

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

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 115

ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

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

<210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 117
attactggta gtggttggtta caca

24

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

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

<210> 119
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 119
gcgaaagggg cggaatgac tacgaactgg tacctcgatc tc

42

<210> 120
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 120
Ala Lys Gly Ala Gly Met Thr Thr Asn Trp Tyr Leu Asp Leu
1 5 10

<210> 121
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 121

```
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcgc gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaatcagaa ctacttaact 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaacttctca ttaagtgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattatt gtcagcaata tgctagtagt 300
ccgtatactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339
```

<210> 122

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 122

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

<210> 123

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 123

cagagtgttt tatacagctc caacaatcag aactac

36

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 124
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Gln Asn Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 125
tgggcatct

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 126
Trp Ala Ser
1

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 127
cagcaatatg ctagtagtcc gtatact

27

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 128
Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 129
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 129

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttgat gatcatgccg tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtgtga atagtgttta catagactat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatt ttcagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag agctgaggac acggccttct attactgtgc aagagatatt 300
gagggagctc gggactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351
```

<210> 130

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 130

```
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 Leu Asp Asp His
          20           25           30
Ala Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Val Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe 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 Phe Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Asp Ile Glu Gly Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115
```

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 131

ggattcaccc ttgatgatca tgcc

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 132

Gly Phe Thr Leu Asp Asp His Ala
1 5

<210> 133
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 133
attagttgga atagtgttta cata

24

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 134
Ile Ser Trp Asn Ser Val Tyr Ile
1 5

<210> 135
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 135
gcaagagata ttgagggagc tcgggactac

30

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 136
Ala Arg Asp Ile Glu Gly Ala Arg Asp Tyr
1 5 10

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

<220>

<223> Synthetic

<400> 137

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggctagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggata tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caccttatta ctgtctacag cataatagtt acccgctcac ttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a                                     321
```

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 138

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Pro Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
```

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 139

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 140

```
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1           5
```

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 141
gctgcatcc

9

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 142
Ala Ala Ser
1

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 143
ctacagcata atagttaccc gctcact

27

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 144
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 145

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggct cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cagttttagc atctatgcca tgagctgggt cgcgcaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attaatggct gtgggtgatgg cacacactac 180
 gcagactccg tgaaggggcc gttcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgtat 240
 ctgcaaatga gcagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacccgct 300
 atgagtacaa atggttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 146
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 146
 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 Ser Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Gly Arg Gly Asp Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Val Met Ser Thr Asn Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 147
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 147
 ggattcagtt ttagcatcta tgcc

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 148
 Gly Phe Ser Phe Ser Ile Tyr Ala
 1 5

<210> 149
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 149
 attaatgggtc gtggtgatgg caca 24

 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 150
 Ile Asn Gly Arg Gly Asp Gly Thr
 1 5

 <210> 151
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 151
 gcgaaacccg tcatgagtac aaatgggtttt gatatc 36

 <210> 152
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 152
 Ala Lys Pro Val Met Ser Thr Asn Gly Phe Asp Ile
 1 5 10

 <210> 153
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 153
 gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gaggattagt agctgggttg cctgggtatca actgaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct aatctataag gcgtctaatt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatattt attggacgtt cggccaaggg 300
 accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 154
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 154
 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 Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Glu Ser 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
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 155
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 155
 cagagtatta gtagctgg 18

<210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 156
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 157

aaggcgtct

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 158

Lys Ala Ser

1

<210> 159

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 159

caacagtata atattttattg gacg

24

<210> 160

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 160

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Trp Thr

1

5

<210> 161

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 161

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtaaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttggc acctctggta tcacctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg agcagcgctt acaatggtaa aacagactat 180
gcacaaaagt tccaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgac cacaggctac 240

atggagatga ggagccttac atctgacgac acggccgtct attactgtac tactgtagta 300
 cgctgtccct ttgacttctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 162
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 162
 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 Gly Thr Ser
 20 25 30
 Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Met Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Val Val Arg Arg Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 163
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 163
 ggttacacct ttggcacctc tggt 24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 164
 Gly Tyr Thr Phe Gly Thr Ser Gly
 1 5

<210> 165
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 165
agcagcgctt acaatggtaa aaca

24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 166
Ser Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr
1 5

<210> 167
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 167
actactgtag tacgtcgtcc ctttgacttc

30

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 168
Thr Thr Val Val Arg Arg Pro Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 169
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 169
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattaat aatttttttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcggtggatc tgggacagat ttcgctctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggattttg caacttatta ctgccaacag tatagttctt accctatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa a

321

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 170

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

<210> 171

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 171

caggacatta ataatttt

18

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 172

Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Phe
1			5		

<210> 173

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 173
gctgcatcc

9

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 174
Ala Ala Ser
1

<210> 175
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 175
caacagtata gttcttacct tacc

27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 176
Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 177
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 177
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctcagactc 60
tcctgtatag tctctggatt caccttttagt ggctcttgga tgagttgggt ccgccagctt 120
ccaggaaagg ggctggagtg ggtggccaat attaaagaag atggaagtga ttcatactat 180
gtggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag ttcactttat 240
ctgcaaataa acagtctgag agtcgacgac acggctgtat atttctgtgc gagagcgagg 300
acagtccctc tccactactg gggccagggc accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 178

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 178
 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 Ile Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Glu Asp Gly Ser Asp Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Arg Thr Val Pro Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 179
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 179
 ggattcacct ttagtggctc ttgg

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 180
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Trp
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 181
 attaaagaag atggaagtga ttca 24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 182
 Ile Lys Glu Asp Gly Ser Asp Ser
 1 5

<210> 183
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 183
 gcgagagcga ggacagtccc tctccactac 30

<210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 184
 Ala Arg Ala Arg Thr Val Pro Leu His Tyr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 185
 gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagtattaat atttggttgg cctggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc cttaaactcct gatctatagg gcgtcttatt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 agtttcgccg gcggtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgactttg gaacttatta ttgtcaacac tataatagtt atccattcac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 186
 <211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 186
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 Ile Asn Ile Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Ser Phe Ala Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 187
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 187
cagagtatta atatttgg 18

<210> 188
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 188
Gln Ser Ile Asn Ile Trp
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 189
agggcgtct 9

<210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 190
Arg Ala Ser
1

<210> 191
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 191
caacactata atagttatcc attcact

27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 192
Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 193
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 193
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtgcagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat ggttatgcca tgcactgggt ccggcaaggt 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttggt atagtgatac cttaggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaacaaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac acggccttct attactgtgc aaaaatctct 300
agcagcggct gggcctttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 194
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 194

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

<210> 195

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 195

ggattcacct ttgatgggtta tgcc

24

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 196

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Gly	Tyr	Ala
1				5			

<210> 197

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 197

attagttggt atagtgtac ctta

24

<210> 198

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 198
Ile Ser Trp Tyr Ser Asp Thr Leu
1 5

<210> 199
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 199
gcaaaaatct ctagcagcgg ctgggccttt gactac 36

<210> 200
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 200
Ala Lys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 201
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 201
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc cagtgttagc agcgccact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccaga ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gttcacctct attcactttc 300
ggccctggga ccaaagtgga tatcaaa 327

<210> 202
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 202

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

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 203

cacagtgtta gcagcgcta c

21

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 204

His	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Tyr
1				5		

<210> 205

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 205

ggtacatcc

9

<210> 206

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 206
Gly Thr Ser
1

<210> 207
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 207
cagcagtatg gtagttcacc tctattcact 30

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 208
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 209
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 209
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgtca tctccgggga cagtgtctct agtaacactg cttggaactg ggtcaggcag 120
tccccatcga gaggccttga gtggctggga aggacatact acaggtccaa gtggtataat 180
gattatgcag tatctgtgaa aagtcgaata accatcaacc cagacacatc caagaaccag 240
ttctccctgc tgatgaactc tgtgactccc gaagacacgg ctgtatatta ttgcgcaaga 300
gtggttcggg gacttaacta ctttgactac tgggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
tca 363

<210> 210
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 210
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Thr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val
 50 55 60
 Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Leu Met Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Val Val Arg Gly Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 211
 ggggacagtg tctctagtaa cactgct

27

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 212
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Thr Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 213
 acatactaca ggtccaagtg gtataat

27

<210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 214

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn

1

5

<210> 215

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 215

gcaagagtgg ttcggggact taactacttt gactac

36

<210> 216

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 216

Ala Arg Val Val Arg Gly Leu Asn Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 217

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 217

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacaactcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaactactca tttactggtc atcttcccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcggcc tgcaggctga agatgtggca atttattact gtcagcaata ttctacaatt 300
ccttacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 218

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 218

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

Lys

<210> 219
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 219
 cagagtgttt tatacaactc caacaataag aactac

36

<210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 220
 Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 221
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 221
 tggatcatct

9

<210> 222
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 222
Trp Ser Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 223
cagcaatatt ctacaattcc ttacact

27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 224
Gln Gln Tyr Ser Thr Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 225
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 225
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt gtggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caagtttgat gattatggca tgacctgggt ccgccacgtt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag aacaggttat 180
acagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag agccgaggac acggccttgt atcactgtgc gggagctcgc 300
cgtgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 226
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 226
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly

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

<210> 227
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 227
 ggattcaagt ttgatgatta tggc

24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 228
 Gly Phe Lys Phe Asp Asp Tyr Gly
 1 5

<210> 229
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 229
 attaattgga atggtgtag aaca

24

<210> 230
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 230

Ile Asn Trp Asn Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 231

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 231

gcgggagctc gccgtgatgc ttttgatatac

30

<210> 232

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 232

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

<210> 233

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 233

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaacattatc aaatatTTaa attggtatca gcagaatgca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagct tgcaaagtgg agtcccatca 180
cggttcagtg gcagcggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttccagtt ccccatcac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 234

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

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

<210> 235
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 235
 cagaacatta tcaaatat

18

<210> 236
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 236
 Gln Asn Ile Ile Lys Tyr
 1 5

<210> 237
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 237
 actgcatcc

9

<210> 238
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 238

Thr Ala Ser
1

<210> 239
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 239
caacagagtt ccagttcccc atacact

27

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 240
Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 241
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 241
caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacacagac cctctcgtctg 60
acctgcaccg tctcgggggtt ctcactcagt gatgctggta tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgaatga cgggaaatcc 180
tacagcacat ctctgaagag cagactcacc atctccaagg acacctccaa aaggcagggtg 240
gtccttacca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacggata 300
cggactggaa cttattcctt ataccttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcactgtc 360
tcctca 366

<210> 242
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 242
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Ala
20 25 30

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

<210> 243
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 243
 ggggttctcac tcagtgatgc tggatatgggt

30

<210> 244
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 244
 Gly Phe Ser Leu Ser Asp Ala Gly Met Gly
 1 5 10

<210> 245
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 245
 attttttcga atgacgggaa a

21

<210> 246
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 246

Ile Phe Ser Asn Asp Gly Lys
 1 5

<210> 247
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 247
 gcacggatac ggactggaac ttattcctta taccttgact ac 42

<210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 248
 Ala Arg Ile Arg Thr Gly Thr Tyr Ser Leu Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 249
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 249
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gctctatattt gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccacacagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caagttacta ctgtcaagag agttatagta ccccgaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 250
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 250
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu

	35						40					45					
Tyr	Phe	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	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Glu	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 251
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 251
 cagagcatta acagctat

18

<210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 252
 Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
 1 5

<210> 253
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 253
 tttgcatcc

9

<210> 254
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 254
 Phe Ala Ser
 1

<210> 255
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 255
 caagagagtt atagtacccc gtggacg

27

<210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 256
 Gln Glu Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 257
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 257
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tctctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gactataaca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtatg atggatctaa taaacactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcacaatc tccagagaca attccaagaa cacgctctat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300
 tttacgattt ttggaatggt tcttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 258
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 258
 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Asn 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 His 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				80
	85		90	
Ala Arg Asp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Met Val Leu Asp Tyr Trp Gly				95
	100		105	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				110
	115		120	

<210> 259
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 259
 ggattcacct tcagtgacta taac

24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 260
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Asn
 1 5

<210> 261
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 261
 atatggtatg atggatctaa taaa

24

<210> 262
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 262
 Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 263
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 263
 gcgagagatg gatttacgat ttttggaatg gttcttgact ac 42

<210> 264
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 264
 Ala Arg Asp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Met Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 265
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 265
 gaaattgtgt tgaacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttatc agcagctact tagcctggta ccagcagaag 120
 cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagact ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gttcacctcc cttcactttc 300
 ggccctggga ccaaagtga tatcaaa 327

<210> 266
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 266
 Glu Ile Val 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 Ile Ser Ser
 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	Phe	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
			85					90						95	
Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 267
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 267
 cagagtgtta tcagcagcta c

21

<210> 268
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 268
 Gln Ser Val Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 269
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 269
 ggtgcatcc

9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 270
 Gly Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 30

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 271
cagcagtatg gtagttcacc tcccttcact

30

<210> 272
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 272
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 273
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 273
gaagtgcagc tgttggagtc tggggggaggc ttggttcagc cggggggggac cctaagacta 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc gcctatgcc a tgagttgggt cccgccaggct 120
ccaggggaagg gactggagtg ggtctcttct attaatgttc gtgctgggtga cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgttt 240
ctgctgatga acagcctgag agccgaagac acggccgcat attactgtgc gaaagccagg 300
tatagcagca attggggcctt tgacttcttg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 274
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 274
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Val Arg Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu	Leu	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asn	Trp	Gly	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 275
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 275
 ggattcacct ttagcgcccta tgcc

24

<210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 276
 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
 1 5

<210> 277
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 277
 attaattgttc gtgctggtga caca

24

<210> 278
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 278
 Ile Asn Val Arg Ala Gly Asp Thr
 1 5

<210> 279
 <211> 39

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 279
gcgaaagcca ggtatagcag caattggggc tttgacttc

39

<210> 280
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 280
Ala Lys Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Trp Gly Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 281
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 281
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctgactgtgt ctctggggcgc gaggaccacc 60
atcaactgcc agtccagcca gactatttta cacagctcca acaatcacaa ctacttagct 120
tggtatcagc agaaaccggg actgcctcct aaactactca tttactgggc atctaccggg 180
gaatccggag tccctgaccg attcagcggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca atttattact gtcaacaata ttctaatact 300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaat 339

<210> 282
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 282
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Ala Arg Thr Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Thr Ile Leu His Ser
20 25 30
Ser Asn Asn His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ser Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln

				85					90				95		
Tyr	Ser	Asn	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
			100					105					110		

Asn

<210> 283
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 283
 cagactattt tacacagctc caacaatcac aactac

36

<210> 284
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 284
 Gln Thr Ile Leu His Ser Ser Asn Asn His Asn Tyr
 1 5 10

<210> 285
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 285
 tgggtcatct

9

<210> 286
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 286
 Trp Ser Ser
 1

<210> 287
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 287

caacaatatt ctaatactcc gtacact

27

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 288

Gln Gln Tyr Ser Asn Thr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 289

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 289

cagggtgcagt tgggtggaatc tggggggaggc gtggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtggag cctctggatt caccttcaga aattatggca tgcagtgggt ccgccagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacactt atatcatttg atggaaatga taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttc 240
ctgcaaataga acagcctgag aactgaggac acggctgttt attactgtgc gagagggggg 300
gattttgact actgggggaca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 290

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 290

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 Gly Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Thr Leu Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asp 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 Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 291
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 291
 ggattcacct tcagaaatta tggc

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 292
 Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 293
 atatcatttg atggaaatga taaa

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 294
 Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asp Lys
 1 5

<210> 295
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 295

gcgagagggg gggattttga ctac

24

<210> 296

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 296

Ala Arg Gly Gly Asp Phe Asp Tyr

1

5

<210> 297

<211> 325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 297

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacattaga aaagatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgtct gatctatgct gcatccagtt tacatagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatagtt accccatgta cacttttggt 300
caggggacca agctggagat caaaa 325

<210> 298

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 298

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

100

105

<210> 299
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 299
caggacatta gaaaagat

18

<210> 300
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 300
Gln Asp Ile Arg Lys Asp
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 301
gctgcatcc

9

<210> 302
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 302
Ala Ala Ser
1

<210> 303
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 303
ctacaacata atagttaccc catgtacact 30

<210> 304
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 304
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 305
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 305
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcactgggt cccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt atctcttggc atagtggcat cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag aactgaggac gcggccttgc attattgtgc aaaaattggg 300
agctactttt actttgactc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 306
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 306
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 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp His Ser Gly Ile 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 Thr Glu Asp Ala Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 307
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 307
ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 308
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 308
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 309
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 309
atctcttggc atagtggcat cata

24

<210> 310
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 310
Ile Ser Trp His Ser Gly Ile Ile
1 5

<210> 311
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 311
gcaaaaattg ggagctactt ttactttgac tcc 33

<210> 312
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 312
Ala Lys Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 313
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 313
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcgtcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtttggtta gctcagggta cacttttggc 300
caggggacca acctggagat caaa 324

<210> 314
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 314
Glu Ile Val 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 Asn
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 Phe Gly Ser Ser Gly
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 315

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

<220>
<223> Synthetic

<400> 315
cagagtgtta gcagcaacta c

21

<210> 316
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 316
Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr
1 5

<210> 317
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 317
ggtgcgtcc

9

<210> 318
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 318
Gly Ala Ser
1

<210> 319
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 319
cagcagtttg gtagctcagg gtacact

27

<210> 320
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 320
 Gln Gln Phe Gly Ser Ser Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 321
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 321
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctgggtcaagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggaat taccttcagt agttatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtacta ggagtagtct cattcactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaata acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgttgggat 300
 gcggcagccg cctttgacta ctgggggccag ggaaccctgg tcatcgtctc ctca 354

<210> 322
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 322
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Thr Arg Ser Ser Leu Ile His 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 Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Ala Ala Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Ile Val Ser Ser
 115

<210> 323
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 323
 ggaattacct tcagtagtta tagc 24

 <210> 324
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 324
 Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
 1 5

 <210> 325
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 325
 attagtacta ggagtagtct catt 24

 <210> 326
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 326
 Ile Ser Thr Arg Ser Ser Leu Ile
 1 5

 <210> 327
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 327
 gcgcgttggg atgcggcagc cgcctttgac tac 33

 <210> 328

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

<220>
 <223> Synthetic

<400> 328
 Ala Arg Trp Asp Ala Ala Ala Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 329
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 329
 gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtc gggcattagc agttatttag cctggatatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttattt ctgtcaacag cttaatatgt acccgctcac ttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 330
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 330
 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 Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser 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 Phe Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 331
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

 <400> 331
 cagggcatta gcagttat 18

 <210> 332
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 332
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 1 5

 <210> 333
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 333
 gttgcatcc 9

 <210> 334
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 334
 Val Ala Ser
 1

 <210> 335
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 335
 caacagctta atagttaccc gctcact 27

 <210> 336
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 336

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 337

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 337

```
caggtccagt tggtagagtc tggggctgag gtgcagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60
tcctgcaagg tttccggata caccctcact gcattatcca tacactgggt gcgacaagct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat tttgatcctg gagatgggtga aacaatccac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accggggaca catctacaga cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attattgtgt aggggttact 300
tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342
```

<210> 338

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 338

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

<210> 339

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 339

ggatacacccc tcaactgcatt atcc

24

<210> 340

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 340

Gly Tyr Thr Leu Thr Ala Leu Ser

1

5

<210> 341

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 341

tttgatcctg gagatgggtga aaca

24

<210> 342

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 342

Phe Asp Pro Gly Asp Gly Glu Thr

1

5

<210> 343

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 343

gtaggggtta ctttttgacta c

21

<210> 344

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 344

Val Gly Val Thr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 345

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 345

gaaattgtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtggtgcc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct cctctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaggattttg cactttatta ctgtcagcac tataataact ggccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 346

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 346

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

<210> 347

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 347

cagagtgttg ccagcaac

18

<210> 348

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 348

Gln Ser Val Ala Ser Asn

1

5

<210> 349

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 349

ggtgcatcc

9

<210> 350

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 350

Gly Ala Ser

1

<210> 351

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 351

cagcactata ataactggcc gctcact

27

<210> 352

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 352
 Gln His Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 353
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 353
 gaggtgcagc ttgtagagtc tgggggagac ttggtacatc ctggcagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggtt cccctttgat gagtatgcca tgcactgggt cgggcaagtt 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtgtga gtaataataa cataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaaaaa ctccctgtat 240
 ctacaaatga acagtctgag acctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaatctgga 300
 atctttgact cctggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 354
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 354
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val His Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Glu 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 Ser Asn Asn Asn 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 Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 355
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 355
 ggtttcccct ttgatgagta tgcc

<210> 356
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 356
 Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr Ala
 1 5

<210> 357
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 357
 attagttgga gtaataataa cata

24

<210> 358
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 358
 Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile
 1 5

<210> 359
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 359
 gcaaaatctg gaatctttga ctcc

24

<210> 360
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 360

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser
1 5

<210> 361
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 361
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agggacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catccatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggggcagag ttcactctca tcatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataacaact ggcctctcac ttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 362
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 362
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
His Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Ile Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 363
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 363
cagagtgtta gcaggac

18

<210> 364
<211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 364
Gln Ser Val Ser Arg Asp
1 5

<210> 365
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 365
ggtgcatcc

9

<210> 366
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 366
Gly Ala Ser
1

<210> 367
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 367
cagcagtata acaactggcc tctcact

27

<210> 368
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 368
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 369
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 369
 gaggtgcact tgggtggagtc tggggggaggc ttggttcagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgcgcag cctctggggtt caccttcagt agttatgaaa tgaactgggt cgcgcagact 120
 ccagggaagg ggctggagtg gatttcacac attagtagtc gtagtgttat aatatattat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgttt 240
 ctgcaaataga acagtctgag agccgaagac acggctgtct atttctgtgc ggggattact 300
 atttttggtg tccctgaata ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 370
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 370
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser His Ile Ser Ser Arg Ser Val Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Gly Ile Thr Ile Phe Gly Ile Pro Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 371
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 371
 gggttcacct tcagtagtta tgaa

24

<210> 372
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 372

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu
1 5

<210> 373

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 373

attagtagtc gtagtggtat aata

24

<210> 374

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 374

Ile Ser Ser Arg Ser Val Ile Ile
1 5

<210> 375

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 375

gcggggatta ctatttttgg tatccctgaa tac

33

<210> 376

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 376

Ala Gly Ile Thr Ile Phe Gly Ile Pro Glu Tyr
1 5 10

<210> 377
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 377
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agttactttg cctggatatca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcgtccagca gggccacagg catcccaacc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcaa cgaagcagct ggcctatcac ctcgggccag 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 378
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 378
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Thr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 379
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 379
 cagagtgtta gtagttac

18

<210> 380
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 380

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1

5

<210> 381

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 381

gatgcgtcc

9

<210> 382

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 382

Asp Ala Ser

1

<210> 383

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 383

cagcaacgaa gcagctggcc tatcacc

27

<210> 384

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 384

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Ile Thr

1

5

<210> 385

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 385

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttcgtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tcctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaatt attagtctta atggctgta cacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctccaaatga acagcctgag agccgaagac acggccgtct attactgtgc cactgtaact 300
ggggactggt tcgacccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351
```

<210> 386

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 386

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

<210> 387

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 387

ggattcacct ttagttccta tgcc

24

<210> 388

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 388
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 389
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 389
attagttcta atggtcgtta caca

24

<210> 390
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 390
Ile Ser Ser Asn Gly Arg Tyr Thr
1 5

<210> 391
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 391
gccactgtaa ctggggactg gttcgacccc

30

<210> 392
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 392
Ala Thr Val Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 393
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 393

```
gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttggtt gggccagtca ggacattgac atttctttag cctggatatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctctt gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccttca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttt caacttatta ctgtcaacaa cttaatagtt acccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggacattaa a 321
```

<210> 394

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 394

```
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 Asp Ile Asp Ile Ser
          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 Ser Gly Val Pro Ser Lys 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 Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Ile
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys
        100           105
```

<210> 395

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 395

caggacattg acatttct

18

<210> 396

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 396

Gln Asp Ile Asp Ile Ser

1

5

<210> 397
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 397
gctgcatcc

9

<210> 398
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 398
Ala Ala Ser
1

<210> 399
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 399
caacaactta atagttaccc gatcacc

27

<210> 400
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

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

<210> 401
<211> 267
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> human PRLR ecto-mmH

<400> 401

Met	His	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg	Gly	Thr	Arg	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Ala	Gln	Leu	Pro
			20					25					30		
Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Phe	Lys	Cys	Arg	Ser	Pro	Asn	Lys	Glu	Thr
		35					40					45			
Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Arg	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gly	Leu	Pro	Thr	Asn
	50					55					60				
Tyr	Ser	Leu	Thr	Tyr	His	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	Met	His	Glu	Cys
65					70					75				80	
Pro	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Pro	Asn	Ser	Cys	His	Phe	Gly	Lys	Gln
				85				90						95	
Tyr	Thr	Ser	Met	Trp	Arg	Thr	Tyr	Ile	Met	Met	Val	Asn	Ala	Thr	Asn
			100					105					110		
Gln	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	Ser	Asp	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp	Val	Thr	Tyr
		115					120					125			
Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Gln
	130					135					140				
Pro	Glu	Asp	Arg	Lys	Pro	Tyr	Leu	Trp	Ile	Lys	Trp	Ser	Pro	Pro	Thr
145					150					155					160
Leu	Ile	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Trp	Phe	Thr	Leu	Leu	Tyr	Glu	Ile	Arg
				165					170					175	
Leu	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	His	Phe	Ala	Gly	Gln
			180					185					190		
Gln	Thr	Glu	Phe	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	His	Pro	Gly	Gln	Lys	Tyr	Leu
		195					200					205			
Val	Gln	Val	Arg	Cys	Lys	Pro	Asp	His	Gly	Tyr	Trp	Ser	Ala	Trp	Ser
	210					215					220				
Pro	Ala	Thr	Phe	Ile	Gln	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Thr	Met	Asn	Asp	Glu
225					230					235					240
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile
				245					250					255	
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	His	His	His	His	His					
			260					265							

<210> 402

<211> 472

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human PRLR ecto-mFc

<400> 402

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

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

<210> 403

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> monkey (mf) PRLR ecto-mmH

<400> 403

```
Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gln Leu Pro
          20          25          30
Pro Gly Lys Pro Glu Ile Phe Lys Cys Arg Ser Pro Asn Lys Glu Thr
          35          40          45
Phe Thr Cys Trp Trp Arg Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu Pro Thr Asn
          50          55          60
Tyr Ser Leu Thr Tyr His Arg Glu Gly Glu Thr Leu Met His Glu Cys
65          70          75          80
Pro Asp Tyr Ile Thr Gly Gly Pro Asn Ser Cys His Phe Gly Lys Gln
          85          90          95
Tyr Thr Ser Met Trp Arg Thr Tyr Val Met Met Val Asn Ala Thr Asn
          100          105          110
Gln Met Gly Ser Ser Phe Ser Asp Glu Leu Tyr Val Asp Val Thr Tyr
          115          120          125
Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Leu Glu Leu Thr Val Glu Val Lys Gln
          130          135          140
Pro Glu Asp Arg Lys Pro Tyr Leu Trp Met Lys Trp Ser Pro Pro Thr
145          150          155          160
Leu Ile Asp Leu Lys Thr Gly Trp Phe Thr Leu Leu Tyr Glu Ile Arg
          165          170          175
Leu Lys Pro Glu Lys Ala Ala Glu Trp Glu Thr His Phe Ala Gly Gln
          180          185          190
Gln Thr Glu Phe Lys Ile Leu Ser Leu His Pro Gly Gln Lys Tyr Leu
          195          200          205
Val Gln Val Arg Cys Lys Pro Asp His Gly Tyr Trp Ser Ala Trp Ser
210          215          220
Pro Ala Thr Phe Ile Gln Ile Pro Ser Asp Phe Ile Met Asn Asp Glu
225          230          235          240
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile
          245          250          255
Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
          260          265
```

<210> 404

<211> 622

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> full length human PRLR

<400> 404

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

				85					90				95				
Arg	Thr	Tyr	Ile	Met	Met	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Gln	Met	Gly	Ser	Ser		
			100					105					110				
Phe	Ser	Asp	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp	Val	Thr	Tyr	Ile	Val	Gln	Pro	Asp		
		115					120					125					
Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Gln	Pro	Glu	Asp	Arg	Lys		
		130				135					140						
Pro	Tyr	Leu	Trp	Ile	Lys	Trp	Ser	Pro	Pro	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Lys		
145					150					155					160		
Thr	Gly	Trp	Phe	Thr	Leu	Leu	Tyr	Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Lys		
				165					170						175		
Ala	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	His	Phe	Ala	Gly	Gln	Gln	Thr	Glu	Phe	Lys		
			180					185					190				
Ile	Leu	Ser	Leu	His	Pro	Gly	Gln	Lys	Tyr	Leu	Val	Gln	Val	Arg	Cys		
		195				200						205					
Lys	Pro	Asp	His	Gly	Tyr	Trp	Ser	Ala	Trp	Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Ile		
	210					215					220						
Gln	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Thr	Val	Trp	Ile	Ser		
225					230					235					240		
Val	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Ile	Cys	Leu	Ile	Ile	Val	Trp	Ala	Val		
				245					250					255			
Ala	Leu	Lys	Gly	Tyr	Ser	Met	Val	Thr	Cys	Ile	Phe	Pro	Pro	Val	Pro		
			260					265					270				
Gly	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Phe	Asp	Ala	His	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Lys		
		275					280					285					
Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Phe	Pro	Pro	Thr		
	290					295					300						
Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Glu	Tyr	Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Ser		
305					310					315					320		
Glu	Asp	Gln	His	Leu	Met	Ser	Val	His	Ser	Lys	Glu	His	Pro	Ser	Gln		
				325					330					335			
Gly	Met	Lys	Pro	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Asp	Ser	Gly	Arg	Gly		
			340					345					350				
Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Cys	Glu	Glu	Pro	Gln		
		355					360					365					
Ala	Asn	Pro	Ser	Thr	Phe	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Glu	Lys	Pro	Glu		
	370					375					380						
Asn	Pro	Glu	Thr	Thr	His	Thr	Trp	Asp	Pro	Gln	Cys	Ile	Ser	Met	Glu		
385					390					395					400		
Gly	Lys	Ile	Pro	Tyr	Phe	His	Ala	Gly	Gly	Ser	Lys	Cys	Ser	Thr	Trp		
				405				410						415			
Pro	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Gln	His	Asn	Pro	Arg	Ser	Ser	Tyr	His	Asn		
			420					425					430				
Ile	Thr	Asp	Val	Cys	Glu	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala		
		435					440					445					
Thr	Leu	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Ser	Gln	Thr		
	450					455					460						
Ile	Lys	Ser	Arg	Glu	Glu	Gly	Lys	Ala	Thr	Gln	Gln	Arg	Glu	Val	Glu		
465					470					475					480		
Ser	Phe	His	Ser	Glu	Thr	Asp	Gln	Asp	Thr	Pro	Trp	Leu	Leu	Pro	Gln		
				485				490						495			
Glu	Lys	Thr	Pro	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Pro	Leu	Asp	Tyr	Val	Glu	Ile		
			500					505					510				
His	Lys	Val	Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Lys	Gln	Arg		
		515					520					525					
Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Pro	Glu	Asn	Asn	Lys		
	530					535					540						
Glu	Tyr	Ala	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Met	Asp	Asn	Asn	Ile	Leu	Val	Leu		

545					550					555					560
Val	Pro	Asp	Pro	His	Ala	Lys	Asn	Val	Ala	Cys	Phe	Glu	Glu	Ser	Ala
				565					570					575	
Lys	Glu	Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Glu	Gln	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu
			580					585						590	
Ala	Asn	Phe	Thr	Ala	Thr	Ser	Ser	Lys	Cys	Arg	Leu	Gln	Leu	Gly	Gly
		595					600					605			
Leu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ala	Cys	Phe	Thr	His	Ser	Phe	His		
	610					615					620				

<210> 405
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> synthetic

<400> 405															
Met	His	Glu	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Pro	Asn	Ser	Cys	His
1				5					10					15	
Phe	Gly	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Met	Trp	Arg	Thr	Tyr	Ile	Met	Met	
			20					25					30		

<210> 406
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> synthetic

<400> 406															
Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Phe	Lys	Cys	Arg	Ser	Pro	Asn
1				5					10					15	
Lys	Glu	Thr	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Arg	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gly	Leu
			20					25					30		
Pro	Thr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Thr	Tyr	His	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	Met
		35					40					45			
His	Glu	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Pro	Asn	Ser	Cys	His	Phe
	50					55					60				
Gly	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Met	Trp	Arg	Thr	Tyr	Ile	Met	Met	Val	Asn
65						70				75					80
Ala	Thr	Asn	Gln	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	Ser	Asp	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp
			85					90						95	
Val	Thr	Tyr	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Glu
			100					105					110		
Val	Lys	Gln	Pro	Glu	Asp	Arg	Lys	Pro	Tyr	Leu	Trp	Ile	Lys	Trp	Ser
		115					120					125			
Pro	Pro	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Trp	Phe	Thr	Leu	Leu	Tyr
		130				135					140				
Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	His	Phe
145					150					155					160
Ala	Gly	Gln	Gln	Thr	Glu	Phe	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	His	Pro	Gly	Gln
			165					170						175	
Lys	Tyr	Leu	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Lys	Pro	Asp	His	Gly	Tyr	Trp	Ser

			180					185				190			
Ala	Trp	Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Ile	Gln	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Thr	Met
		195						200				205			
Asn	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln	Lys
	210					215					220				
Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	His	His	His	His	His			
225					230					235					

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы, включающий одновременное введение пациенту терапевтически эффективного количества:

(a) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), включающего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с майтанзиноидом, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR), и

(b) фулвестранта.

2. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 1,3 нмоль.

3. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 1,2 нмоль.

4. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 1,0 нмоль.

5. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 900 пмоль.

6. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 800 пмоль.

7. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 600 пмоль.

8. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 400 пмоль.

9. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 200 пмоль.

10. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 100 пмоль.
11. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 80 пмоль.
12. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 60 пмоль.
13. Способ по пункту 1, где антитело блокирует опосредованную пролактином передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина, со значением IC_{50} менее чем около 40 пмоль.
14. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает рецептор пролактина (PRLR), взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в первом фибронектиноподобном домене типа III внеклеточного домена рецептора пролактина (аминокислоты 27-128 SEQ ID NO:404), как определено способом водород-дейтериевого обмена.
15. Способ по пункту 14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в последовательности SEQ ID NO:405, как определено способом водород-дейтериевого обмена.
16. Способ по пункту 14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из (a) аминокислот 72-94 последовательности SEQ ID NO:404; (b) аминокислот 72-95 последовательности SEQ ID NO:404; (c) аминокислот 96-101 последовательности SEQ ID NO:404; и (d) аминокислот 96 - 102 последовательности SEQ ID NO:404.
17. Способ по пункту 15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с десятью аминокислотами, содержащимися в последовательности SEQ ID NO: 405.
18. Способ по пункту 15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует по меньшей мере с двадцатью аминокислотами, содержащимися в последовательности SEQ ID NO: 405.

19. Способ по пункту 14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 405.
20. Способ по пункту 1, где майтанзиноид означает DM4.
21. Способ по пункту 1, где майтанзиноид означает DM1.
22. Способ по пункту 1, где майтанзиноид конъюгирован с антителом посредством расщепляемого линкера.
23. Способ по пункту 1, где майтанзиноид конъюгирован с антителом посредством нерасщепляемого линкера.
24. Способ по пункту 1, где майтанзиноид конъюгирован с антителом посредством линкера, выбранного из группы, включающей 4-[-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат), SPDB, mc-val-cit, и mc-val-cit-PAB.
25. Способ по пункту 1, где майтанзиноид конъюгирован с антителом посредством линкера, и где линкер представляет собой 4-(N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (MCC).
26. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС ингибирует пролактин-опосредованную активность STAT5.
27. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС вызывает блокировку митоза в клетках, экспрессирующих рецептор пролактина.
28. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС ингибирует рост клеток, экспрессирующих рецептор пролактина.
29. Способ по пункту 1, в котором пациент ранее получал лечение ингибитором рецептора эстрогена.
30. Способ по пункту 1, где эффективное количество означает количество, достаточное для задержки или ингибирования прогрессирования рака.
31. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС вводится внутривенно.
32. Способ по пункту 1, где экспрессия рецептора пролактина при раке молочной железы существенно не снижается после лечения.
33. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС уничтожает клетки, экспрессирующие рецептор пролактина, на уровне экспрессии менее чем в 30 раз превышающем фоновый.
34. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС уничтожает клетки, экспрессирующие рецептор пролактина, на уровне экспрессии менее чем в 20 раз превышающем фоновый.

35. Способ по пункту 1, где конъюгат АЛС уничтожает клетки, экспрессирующие рецептор пролактина, на уровне экспрессии более чем в 12 раз, но менее чем в 30 раз превышающем фоновый.
36. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR) / варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NOs: 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378.
37. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, включающую последовательность SEQ ID NO: 20; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 22; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 24; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, включающую последовательность SEQ ID NO: 28; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 30; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 32.
38. Способ по пункту 37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 18, и область LCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 26.
39. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 68; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 70; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 72; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 76; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 78; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 80.
40. Способ по пункту 39, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 66 и область LCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 74.
41. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 276; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 278; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 280; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 284; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 286; область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 288.

42. Способ по пункту 41, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 274, и область LCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 282.
43. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 292; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 294; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 296; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 300; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 302; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 304.
44. Способ по пункту 43, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 290, и область LCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 298.
45. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 372; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 374; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 376; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 380; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 382; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 384.
46. Способ по пункту 45, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 370, и область LCVR, включающую последовательность SEQ ID NO: 378.
47. Способ по пункту 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с рецептором пролактина с эталонным антителом, включающим пару аминокислотных последовательностей областей HCVR/LCVR, выбранных из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378.
48. Способ лечения пролактин-рецептор положительного рака молочной железы у пациента, включающий одновременное введение пациенту терапевтически эффективного количества:
- (a) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), включающего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с DM1 посредством линкера MCC, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина человека (PRLR), и
 - (b) фулвестранта.

49. Способ по пункту 48, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 292; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 294; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 296; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 300; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 302; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 304.

50. Способ по пункту 49, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей областей HCVR/LCVR из последовательностей SEQ ID NOs: 290/298.

51. Способ уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих низкие уровни рецептора пролактина, при этом способ включает контактирование клеток:

(a) с конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), включающим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с майтанзиноидом, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором пролактина (PRLR) человека, и

(b) с фулвестрантом.

52. Способ по пункту 51, где опухолевые клетки экспрессируют менее 1 миллиона копий рецептора пролактина на клетку.

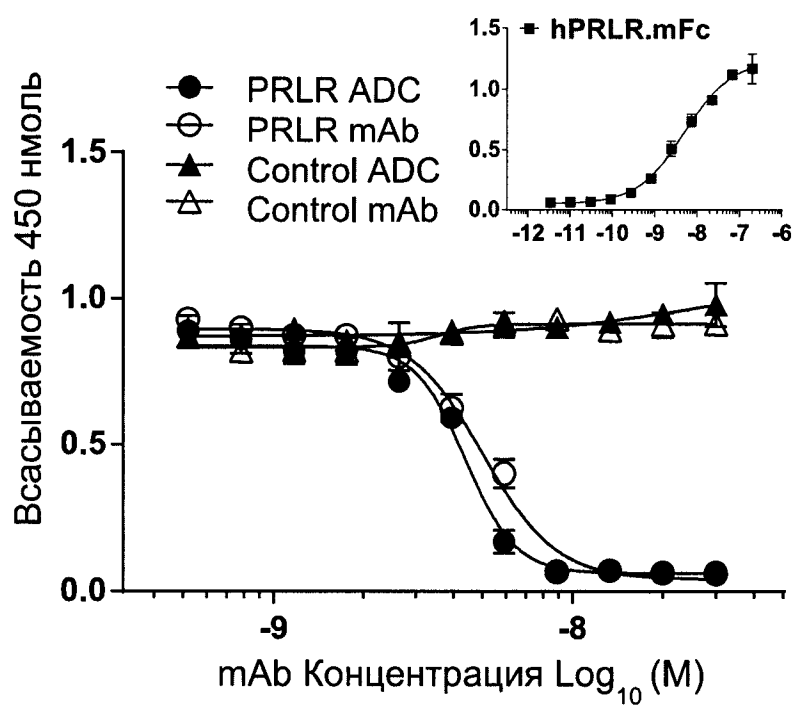
53. Способ по пункту 52, где опухолевые клетки экспрессируют 3000-500,000 копий рецептора пролактина на клетку.

54. Способ по пункту 51, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область HCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 292; область HCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 294; область HCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 296; область LCDR1, включающую последовательность SEQ ID NO: 300; область LCDR2, включающую последовательность SEQ ID NO: 302; и область LCDR3, включающую последовательность SEQ ID NO: 304.

55. Способ по пункту 54, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей областей HCVR/LCVR из последовательностей SEQ ID NOs: 290/298.

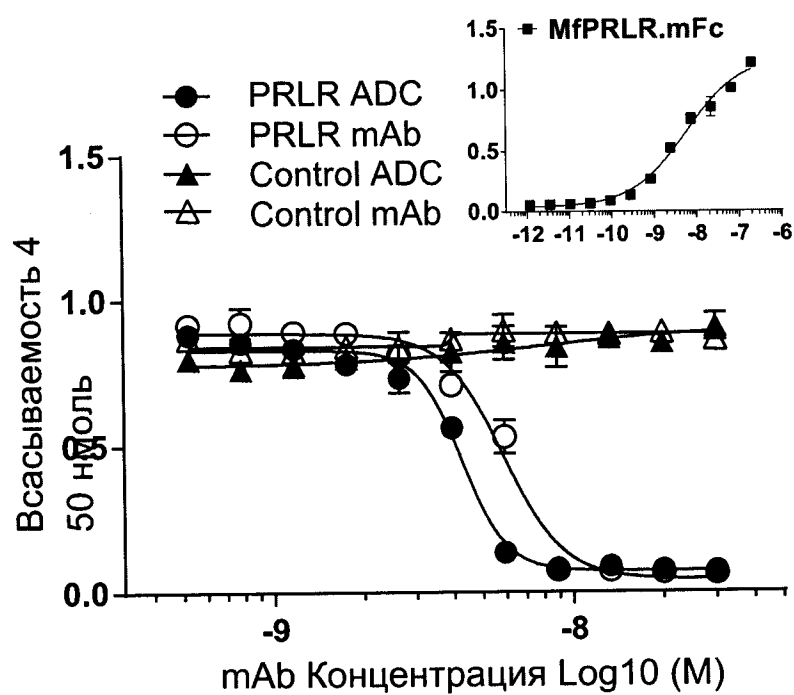
56. Способ по пункту 51, где майтанзиноид означает DM1.

57. Способ по пункту 56, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с антителом DM1 посредством линкера, и в котором линкер означает 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (MCC).

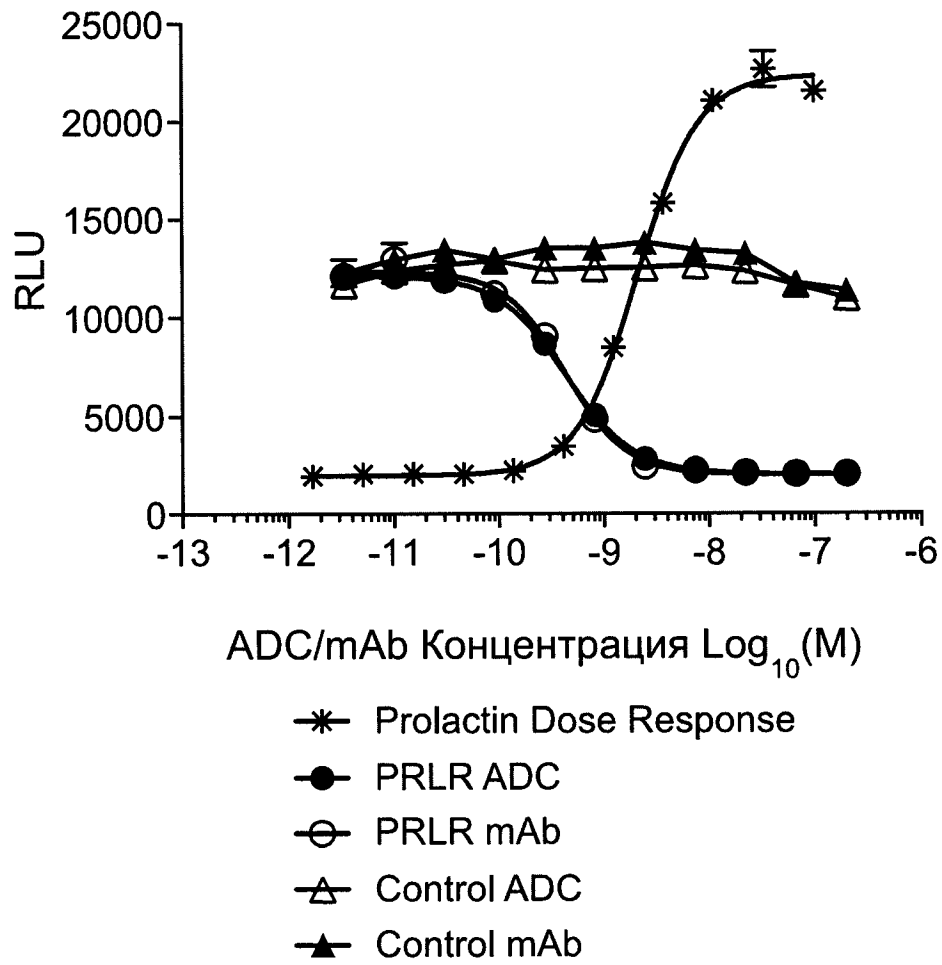
ADC/mAb-mediated Blockade of hPRLR.mFc Binding to hPRL.mmH

ФИГ.1А

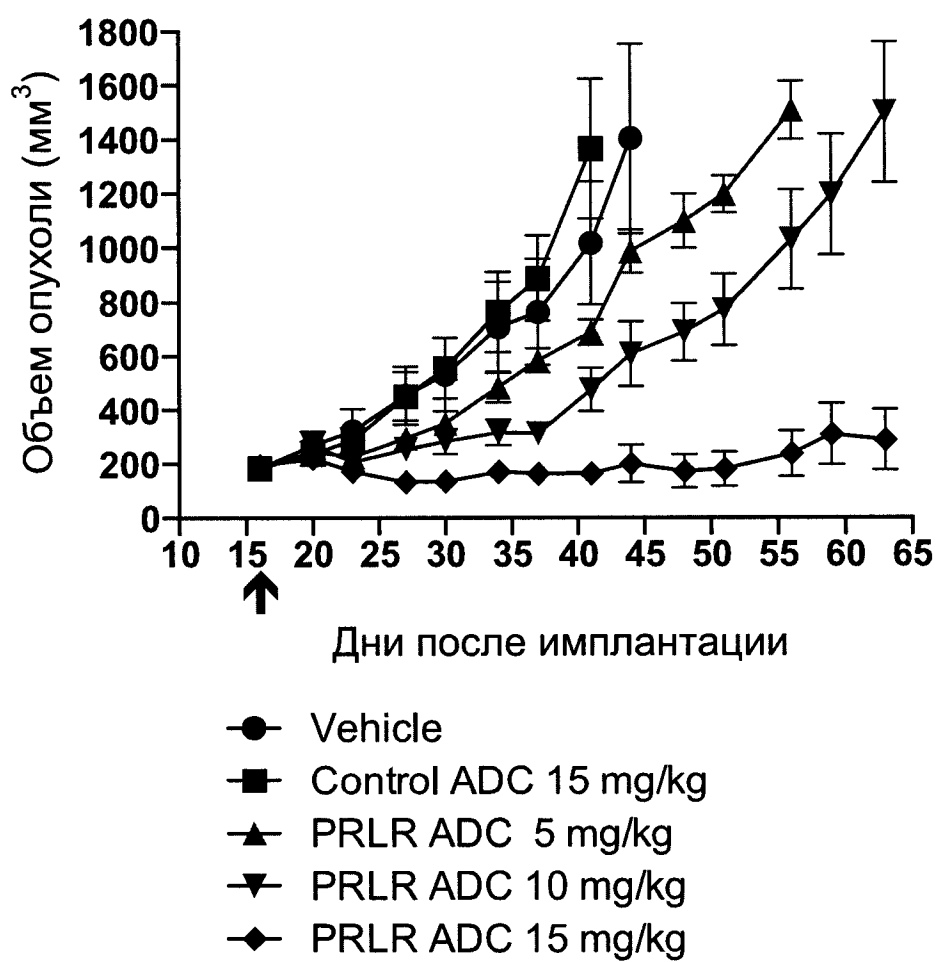
ADC/mAb-mediated Blockade of MfPRLR.mFc Binding to hPRL.mmH



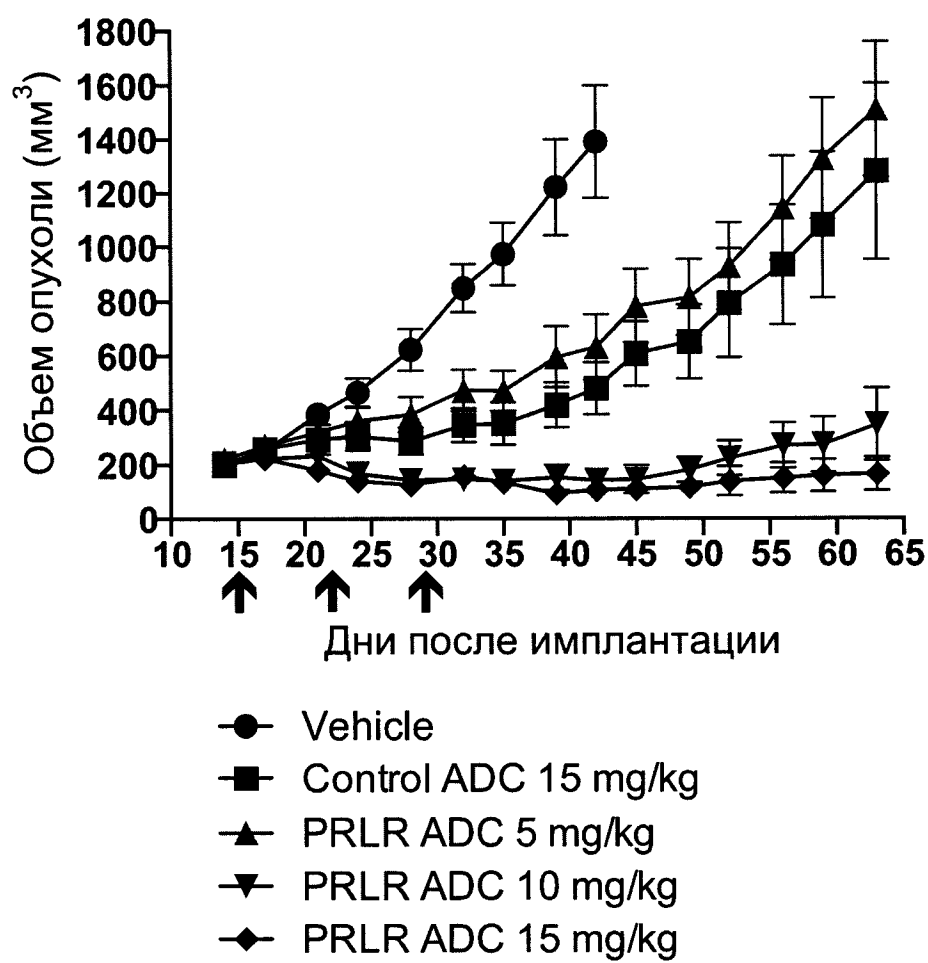
ФИГ.1В



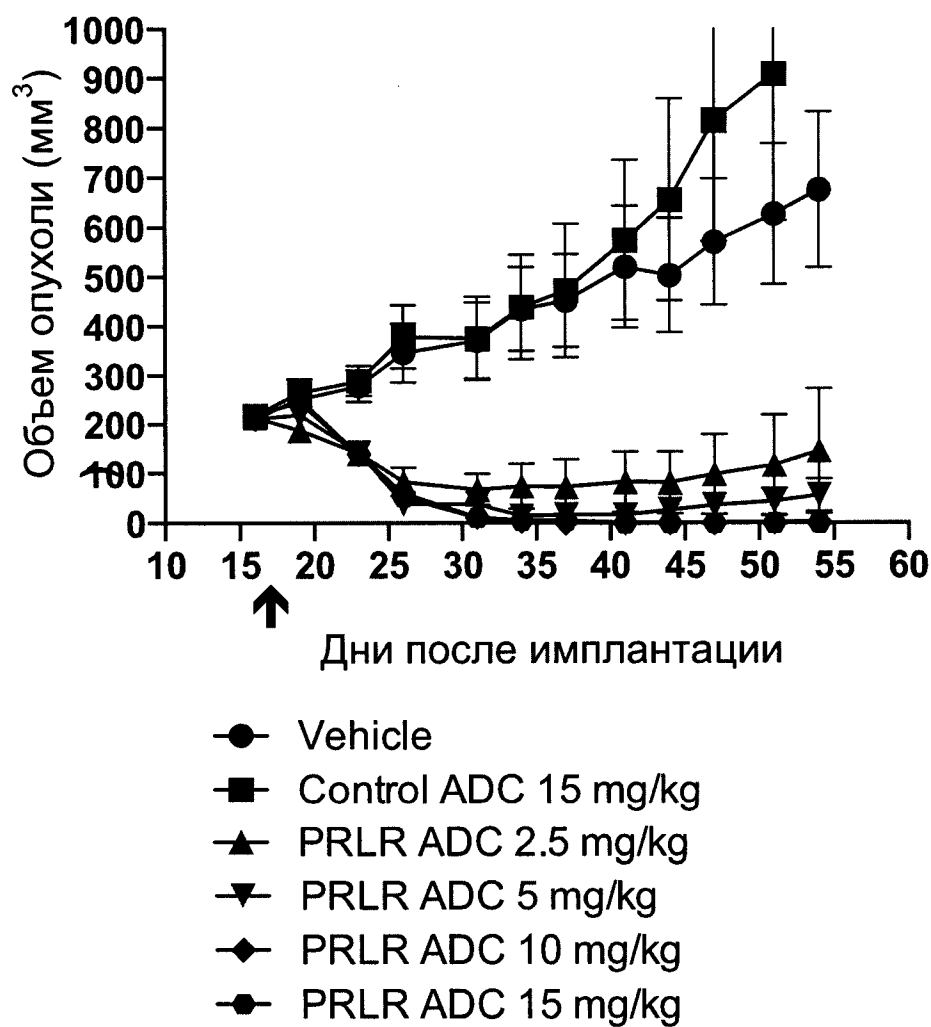
ФИГ. 1С



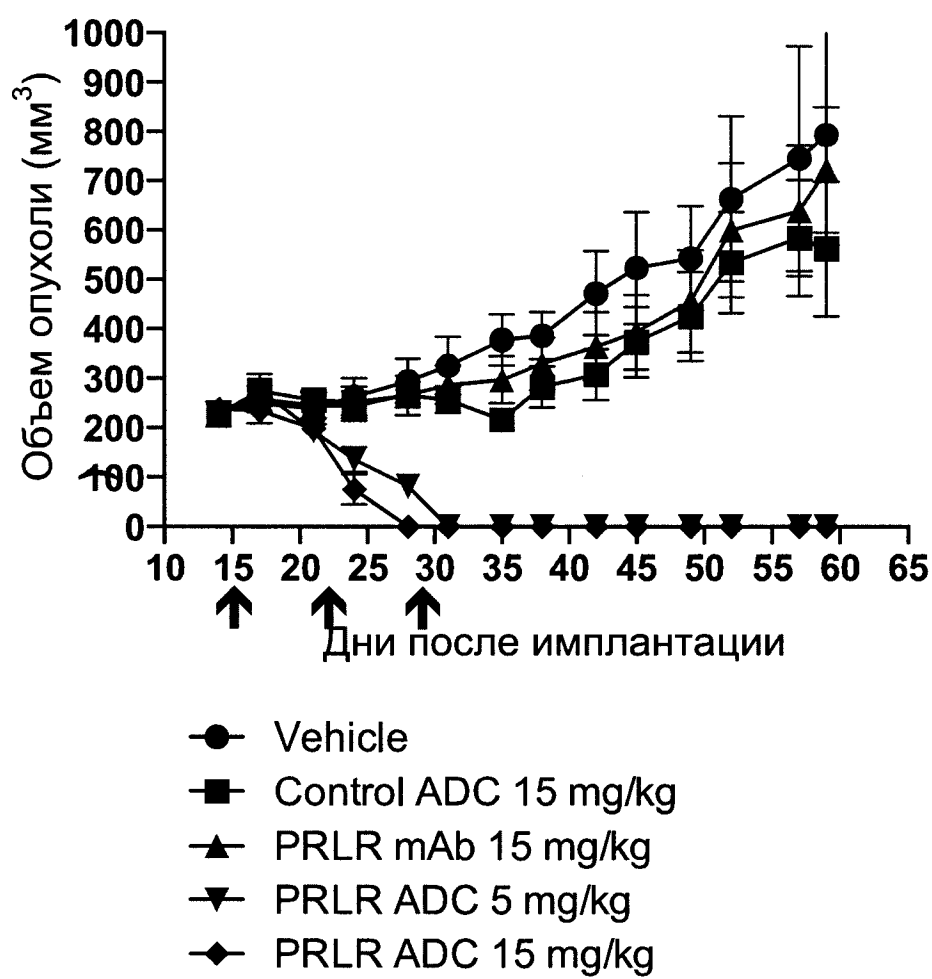
ФИГ.2А



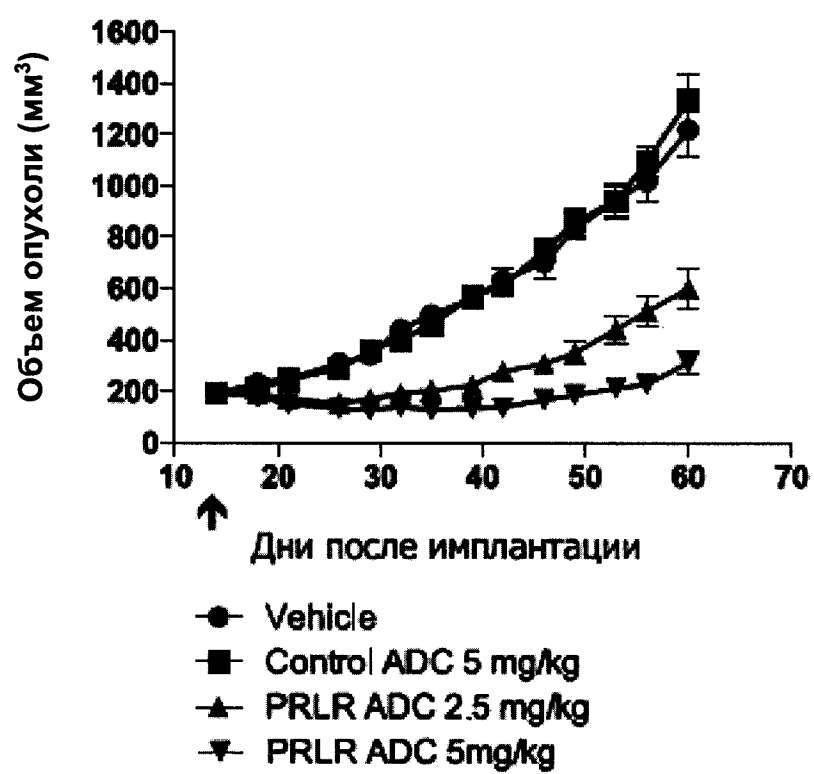
ФИГ.2В



ФИГ.2С

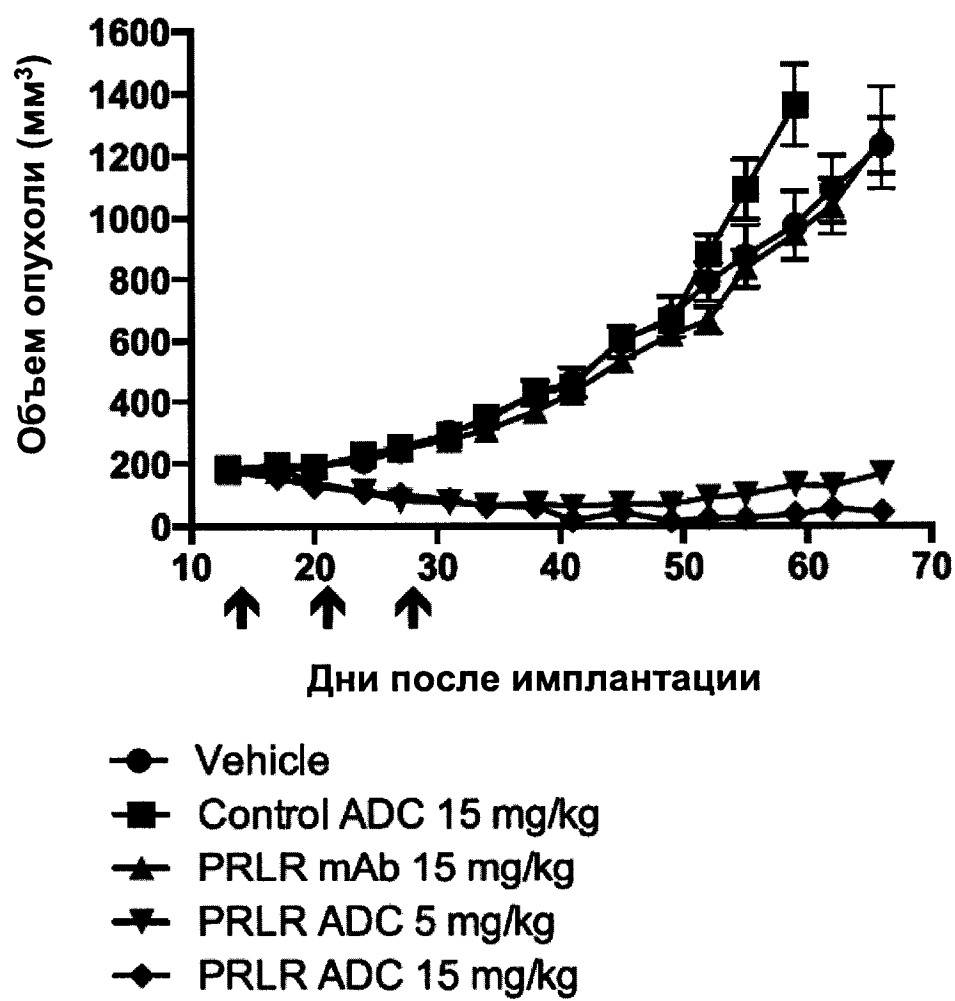


ФИГ.2D



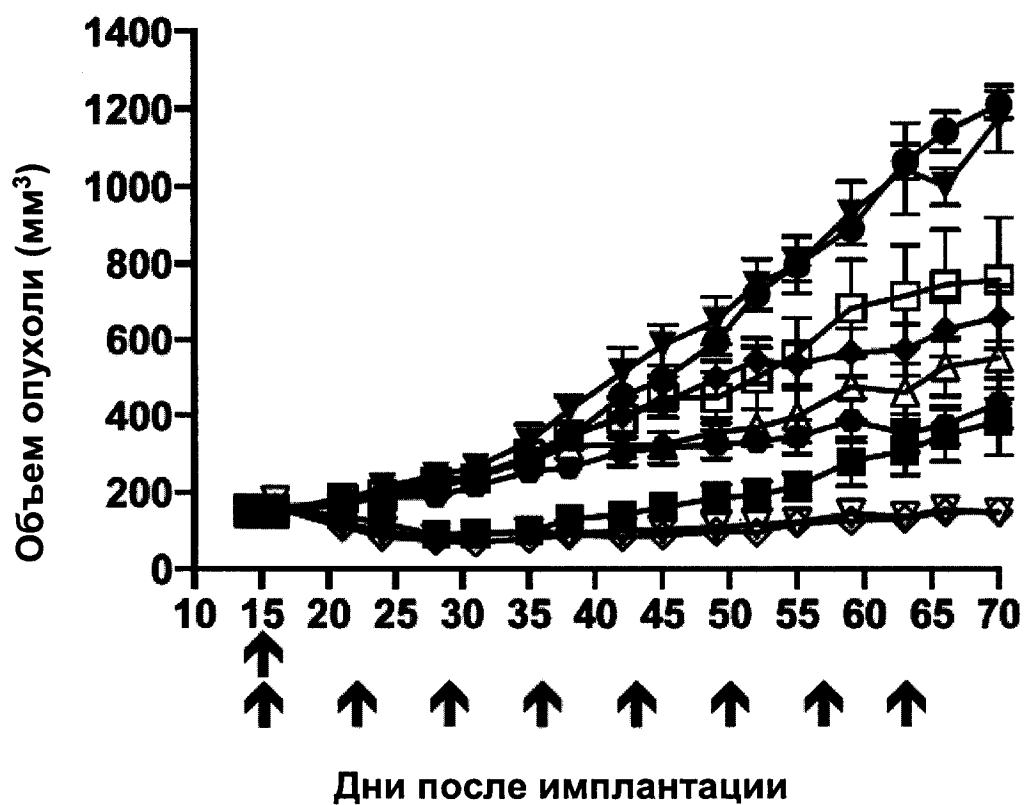
ФИГ.3А

9/14



ФИГ. 3В

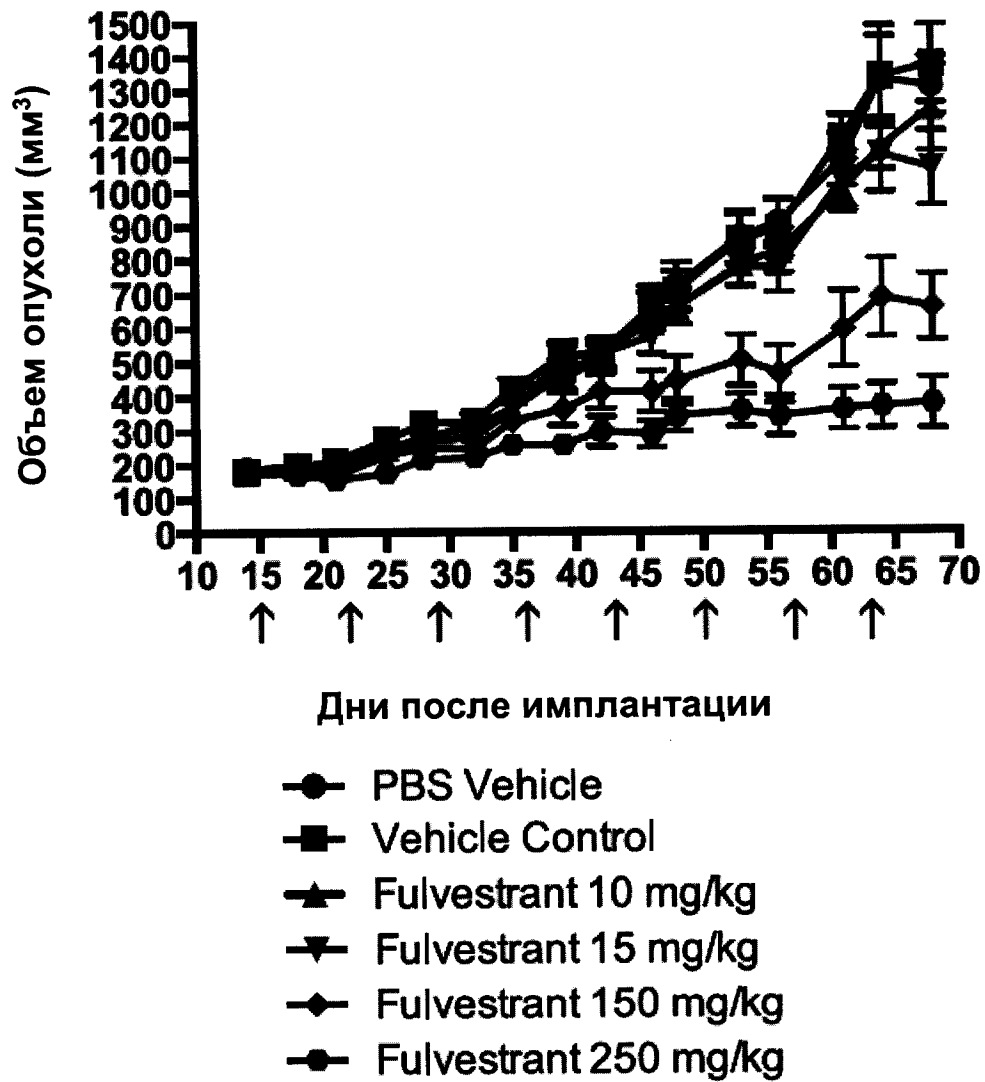
10/14



- PBS Vehicle
- PRLR mAb 2.5 mg/kg
- ▼ PRLR ADC 2.5 mg/kg
- ◆ Fulvestrant 150 mg/kg
- Fulvestrant 250 mg/kg
- ▣ PRLR ADC + Fulv 150 mg/kg
- △ PRLR ADC + Fulv 250 mg/kg
- ▽ PRLR mAb + Fulv 150 mg/kg
- ◇ PRLR mAb + Fulv 250 mg/kg

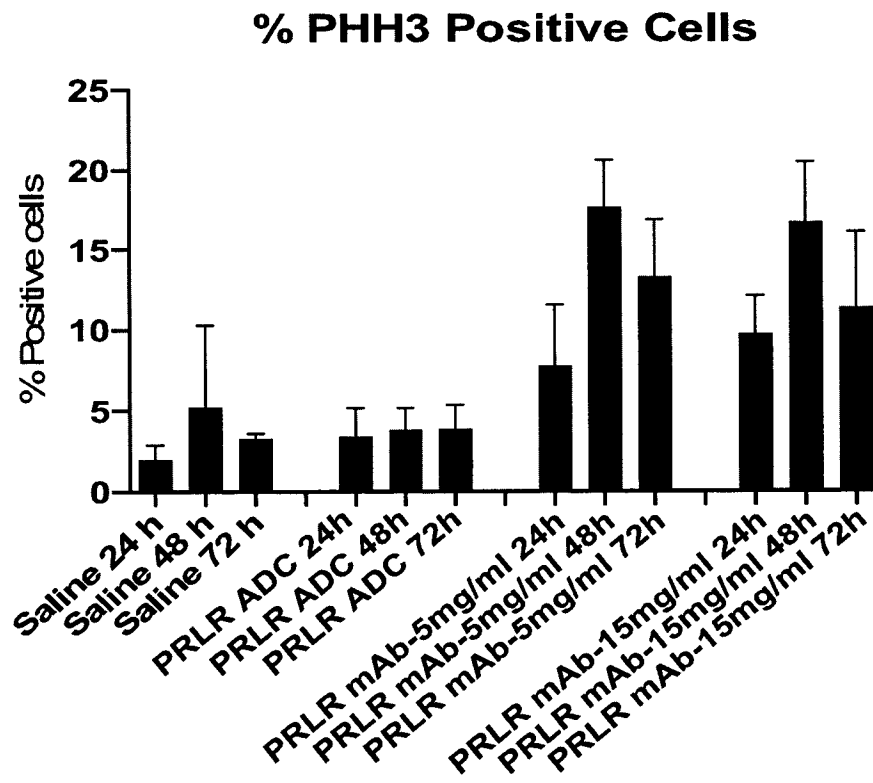
ФИГ. 3С

11/14



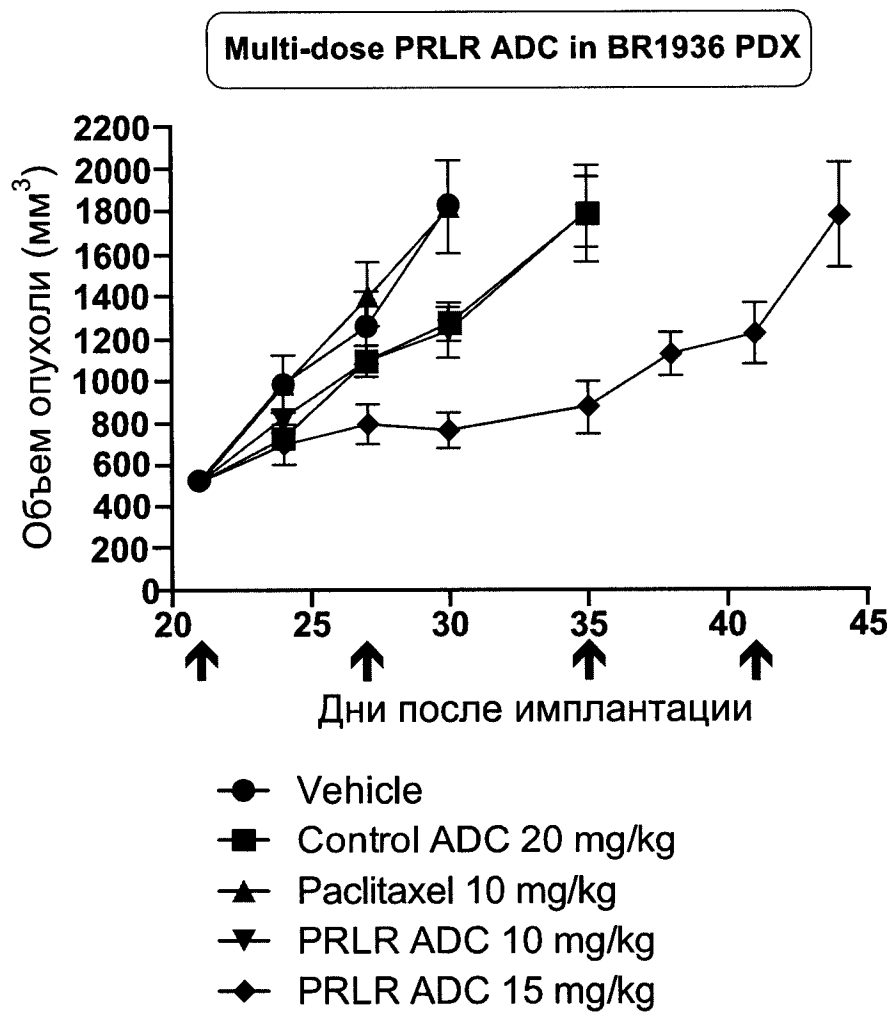
ФИГ. 4

12/14

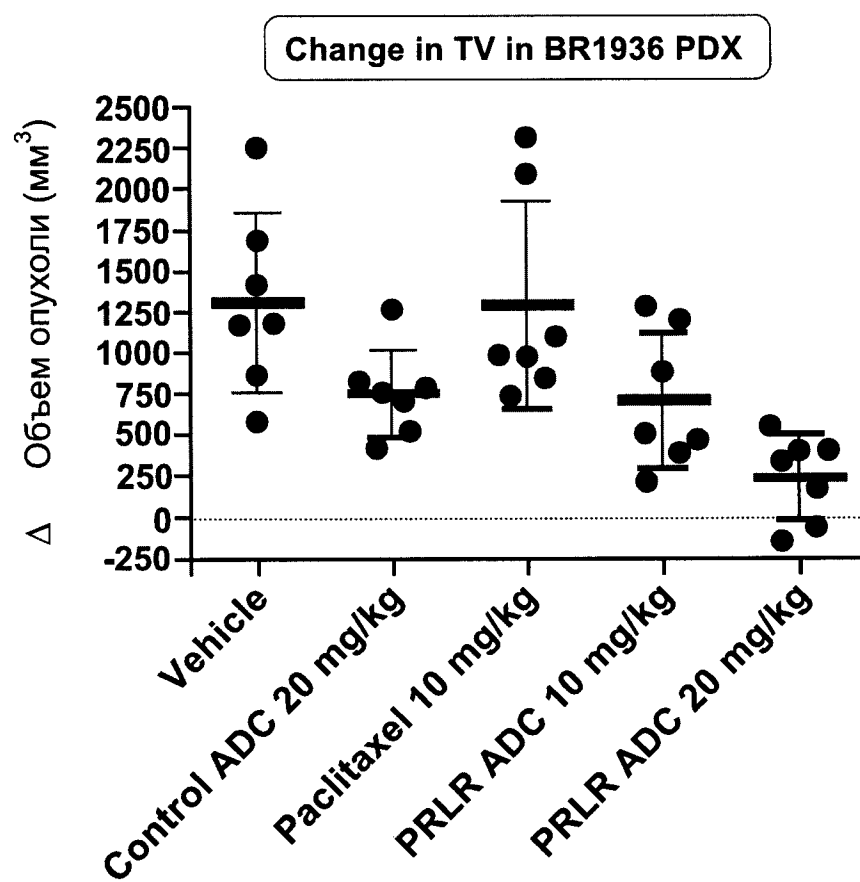


***P<0.0001

ФИГ.5



ФИГ.6А



ФИГ.6В