

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991845** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.03.09

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 31/505 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К LY75

(31) 1703876.1

(32) 2017.03.10

(33) GB

(86) РСТ/ЕР2018/055939

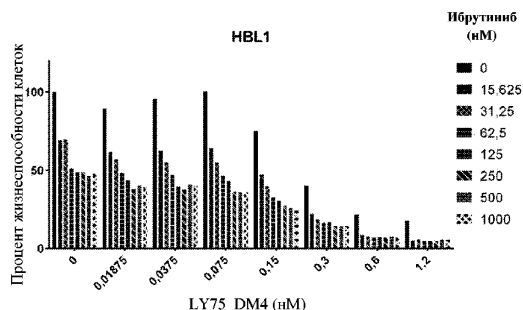
(87) WO 2018/162727 2018.09.13

(71) Заявитель:
БЕРЛИН-ХЕМИ АГ (DE)

(72) Изобретатель:
Бинаски Моника, Биджони Марио,
Мерлино Джузеппе, Симонелли
Чечилия (IT), Бертони Франческо
(CH), Пеллакани Андреа (IT)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее раскрытие в целом относится к областям иммунологии и молекулярной биологии. Более конкретно, в данном документе представлены фармацевтические комбинации, содержащие (А) антитела или их антигенсвязывающие части, направленные против LY75, и (В) второе противораковое средство; нуклеиновые кислоты, кодирующие комбинации антител; способы получения комбинаций антител и способы лечения заболеваний, таких как формы рака, опосредованные экспрессией или активностью LY75.



A1

201991845

201991845

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К LY75ВВЕДЕНИЕ

Настоящее раскрытие в целом относится к областям иммунологии и молекулярной биологии. Более конкретно, в данном документе представлены фармацевтические комбинации, содержащие (А) антитела или их антигенсвязывающие части, направленные против LY75, и (В) второе противораковое средство; нуклеиновые кислоты, кодирующие комбинации антител; способы получения комбинаций антител и способы лечения заболеваний, таких как формы рака, опосредованные экспрессией или активностью LY75.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Виды лейкоза и лимфомы принадлежат к обширной группе опухолей, которые поражают кровь, костный мозг и лимфоидную систему; они известны как опухоли кроветворной и лимфоидной тканей.

Лимфома представляет собой группу опухолей из клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Признаки и симптомы могут включать увеличенные лимфатические узлы, жар, потение, непреднамеренную потерю массы тела, зуд и постоянное ощущение усталости. Существует ряд подтипов лимфомы: двумя основными группами лимфом являются лимфомы Ходжкина (HL) и неходжкинские лимфомы (NHL). Всемирная организация здравоохранения (WHO) включает две другие группы в качестве типов лимфомы: множественную миелому и иммунопролиферативные заболевания. Приблизительно 90% видов лимфомы являются неходжкинскими лимфомами.

Лейкоз представляет собой группу форм рака, которые обычно появляются в костном мозгу и приводят к большому количеству аномальных белых кровяных телец. Симптомы могут включать проблемы кровотечения и кровоподтеков, ощущение усталости, жар и увеличенный риск инфекций. Такие симптомы проявляются из-за нехватки нормальных клеток крови. Диагностику, как правило, осуществляют посредством анализов крови или биопсии костного мозга. Существует четыре основных типа лейкоза: острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), а также ряд менее распространенных типов.

Лечение видов лейкоза и лимфомы может включать одно или более из химиотерапии, лучевой терапии, направленной терапии и хирургии (и трансплантацию костного мозга в случае видов лейкоза). Успех лечения лейкоза зависит от типа лейкоза и возраста пациента. Результат лечения лимфомы зависит от подтипа, при этом некоторые являются излечимыми, и в большинстве случаев лечение увеличивает выживаемость.

Ранее для лечения видов лейкоза применяли ряд химиотерапевтических средств, включая преднизон, винкристин, антрациклины, L-аспарагиназу, циклофосфамид, метотрексат, 6-меркаптопурин, флударабин, пентостатин и кладрибин. Химиотерапевтические средства для лечения видов лимфомы включают циклофосфамид, гидроксидаунорубицин (также известный как доксорубицин или адриамицин), онковин (винкристин), преднизон, преднизолон, блеомицин, дакарбазин, этопозид и прокарбазин.

Комбинированная химиотерапия предусматривает лечение пациента с помощью двух или более различных лекарственных средств одновременно. Лекарственные средства могут различаться их механизмом действия и побочными эффектами. Наибольшее преимущество такого подхода состоит в сокращении до минимума шансов развития устойчивости к какому-либо одному средству. Кроме того, лекарственные средства часто можно применять в меньших дозах, снижая токсичность. Виды комбинированной терапии для лечения болезни Ходжкина включают MOPP (мустарген, винкристин, прокарбазин, преднизолон) и ABVD (доксорубицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин). Виды комбинированной терапии для лечения неходжкинской лимфомы включают CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон). С учетом количества лекарственных средств, которые известны вследствие применения для лечения видов лейкоза и лимфомы, количество перестановок и комбинаций возможных видов лечения лекарственными средствами определенно является большим. Кроме того, вышеуказанные виды комбинированной терапии не предусматривают антител.

Остается, однако, потребность в новых видах лечения видов лейкоза и лимфомы, и в частности в эффективных видах комбинированной терапии.

Лимфоцитарный антиген 75 действует в качестве эндочиτιрующего рецептора, направляющего захваченные антигены из внеклеточного пространства в специализированный антиген-процессирующий компартмент, и, как полагают, вызывает снижение пролиферации В-лимфоцитов. Экспрессия лимфоцитарного антигена 75 наблюдалась при раке поджелудочной железы, яичника, молочной железы, ободочной и прямой кишки, пищевода, кожи, щитовидной железы и легкого (немелкоклеточном), а также при множественной миеломе и многих различных подтипах лимфомы и лейкоза. В WO2009/061996 раскрыты выделенные моноклональные антитела, связывающиеся с DEC-205 (LY75) человека, и соответствующие композиции и молекулы на основе антител. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антитела, а также терапевтические и диагностические способы применения антител. В WO2008/104806 раскрыты аффинные реагенты, способные к связыванию с LY75, для применения при лечении или профилактике рака. В WO2015/052537 раскрыты конкретные выделенные антитела, способные к связыванию с LY75, и их применение при лечении различных форм рака.

Ритуксимаб представляет собой моноклональное антитело к белку CD20, который широко экспрессируется на В-клетках (Oncogene (2003 Oct 20), Smith MR, «Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance», 22(47): 7359-68). Ритуксимаб разрушает как нормальные, так и злокачественные В-клетки, которые имеют CD20 на их поверхности, и, следовательно, применяется для лечения заболеваний, которые характеризуются наличием слишком большого количества В-клеток,

сверхактивных В-клеток или дисфункциональных В-клеток. Ритуксимаб ранее применялся для лечения ряда аутоиммунных заболеваний и некоторых типов рака, включая ревматоидный артрит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, обыкновенную пузырчатку, рассеянный склероз, системную красную волчанку, неходжкинскую лимфому, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хронический лимфоцитарный лейкоз и виды аутоиммунной анемии.

Ибрутиниб (Imbruvica) представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, которое перманентно связывается с тирозинкиназой Брутона (ВТК), которая играет важную роль в В-клетках. Ибрутиниб ранее применялся для лечения В-клеточных форм рака, таких как мантийноклеточная лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз и макроглобулинемия Вальденстрема.

В настоящее время было обнаружено, что комбинации (i) определенных антител к LY75 с ритуксимабом и (ii) определенных антител к LY75 с ибрутинибом демонстрируют синергические результаты в лечении видов лимфомы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую комбинацию, содержащую:

(A) антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, которые конкурируют за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2; или

антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5;
- ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и
- iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и

b) переменную область легкой цепи, содержащую:

- i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8;
- ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и
- iii) третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций;

и

(B) антитело к CD20 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 40;

ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 41; и

iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 42; и

b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 43;

ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 44; и

iii) третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 45;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций;

где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения.

Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую комбинацию, содержащую:

(A) антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, которые конкурируют за связывание с LY75 с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2;

или

антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5;

ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и

iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и

b) переменную область легкой цепи, содержащую:

i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8;

ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и

iii) третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций;

и

(B) ибрутиниб или его фармацевтически приемлемую соль,

где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения.

В одном варианте осуществления антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 CDR, выбранные из группы, состоящей из CDR, содержащих SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и/или переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 CDR, выбранные из группы, состоящей из CDR, содержащих SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

В некоторых вариантах осуществления антитела к LY75 связываются с LY75 (SEQ ID NO: 15) и способны к интернализации клеткой, экспрессирующей LY75.

В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит области, определяющие комплементарность (CDR), или переменные области (VR) тяжелых и/или легких цепей конкретного антитела, описанного в данном документе (например, упоминаемого в данном документе как «LY75_A1»). Соответственно, в одном варианте осуществления антитело к LY75 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH) антитела LY75_A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO:1, и/или домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи (VL) LY75_A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO:2.

В другом варианте осуществления антитела к LY75 связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, и/или ее консервативные модификации последовательности. Антитело может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:2 и/или ее консервативные модификации последовательности.

В дополнительном варианте осуществления антитела к LY75 связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные

последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 1 и/или 2 соответственно, и их консервативные модификации последовательности.

Антитела, содержащие переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или большей идентичностью последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также включены в настоящее изобретение. Промежуточные диапазоны вышеуказанных значений, например, переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-100% идентичностью последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1 или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:2 или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит каркасную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную каркасной области переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 1, показанной под SEQ ID NO: 16, 17, 18 и 19. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит каркасную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную каркасной области переменной области легкой цепи под SEQ ID NO:2, показанной под SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23.

В одном варианте осуществления антитело к LY75 конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO:1 и 2, или аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичные

им. В другом варианте осуществления антитело к LY75 конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO:1 и 2 (LY75_A1).

Другие антитела по настоящему изобретению связываются с тем же эпитопом или эпитопом на LY75, распознаваемым антителами, описанными в данном документе. В другом конкретном варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим переменные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO:1 и 2, или аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 80% идентичные им. В другом варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим переменные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO:1 и 2 (LY75_A1).

В дополнительном варианте осуществления антитела к LY75 специфично связываются с одним или более, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, пептидом(пептидами), выбранными из группы, включающей SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или 37, или их фрагментами, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами к LY75, содержит один или более пептидов, два или более или три или более пептидов, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29, 30, 34, 35, 36 или 37, или их фрагментов, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами к LY75, содержит один или более пептидов, например, два или три пептида, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 36 и 37, или их фрагментов, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот.

В дополнительном варианте осуществления антитела к LY75 содержат отличающиеся CDR по сравнению с исходными антителами, описанными в данном документе. Таким образом, в настоящем изобретении представлены варианты антител, содержащие варианты переменных областей исходного антитела, где исходное антитело содержит первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO:5, вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6, третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO:7, первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO:8, вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO:9 и третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO:10, и где вариант антитела в совокупности имеет 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен в наборе из первой vhCDR, второй vhCDR, третьей vhCDR, первой vlCDR, второй vlCDR и третьей vlCDR, при этом 1-4, 1-3 или 1-2 замены являются особенно применимыми, и где антитело сохраняет специфичное связывание с LY75.

Все антитела, раскрытые в данном документе, могут быть антителами полной длины, например, любого из следующих изотипов: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, секреторный компонент IgA, IgD и IgE.

В качестве альтернативы антитела могут представлять собой фрагменты, такие как антигенсвязывающая часть или одноцепочечное антитело (например, Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv-фрагмент, выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), или комбинация двух или более выделенных CDR). Антитела могут быть антителами любого типа, в том числе, без ограничений, человеческими, гуманизированными и химерными антителами.

В других вариантах осуществления антитела к LY75 находятся в форме иммуноконъюгата (т. е. дополнительно содержат ковалентно присоединенный компонент). В конкретном варианте осуществления функциональная часть представляет собой лекарственное средство, такое как майтанзиноид, доластатин, ауристатин, трихотецин, калихеамицин, CC1065 или их производные. В предпочтительном варианте осуществления функциональная часть, представляющая собой лекарственное средство, представляет собой DM1 или DM4.

В одном варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты, содержащими SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно, или последовательностями нуклеиновой кислоты, характеризующимися по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с вышеупомянутыми последовательностями нуклеиновой кислоты или последовательностями, отличающимися от SEQ ID NO: 3 и 4 по причине вырожденности генетического кода.

В одном варианте осуществления антитело к CD20 представляет собой химерное антитело мыши/человека, гуманизированное антитело или антитело человека. Предпочтительно антитело к CD20 представляет собой ритуксимаб.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены наборы векторов экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелых и/или легких цепей антител, описанных в данном документе, функционально связанные с одним или более регуляторными элементами.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин содержит векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие:

- (i) тяжелую цепь антитела к LY75 или его антигенсвязывающей части;
- (ii) легкую цепь антитела к LY75 или его антигенсвязывающей части;
- (iii) тяжелую цепь антитела к CD20 или его антигенсвязывающей части; и
- (iv) легкую цепь антитела к CD20 или его антигенсвязывающей части.

В дополнительном аспекте представлен способ лечения рака у пациента, включающий одновременное, последовательное или раздельное введение пациенту, нуждающемуся в этом,

терапевтически эффективных количеств компонентов (А) и (В) фармацевтической комбинации по настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению для применения при лечении рака.

Также представлено применение компонентов (А) и (В), как определено в данном документе, в изготовлении фармацевтической комбинации для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака. В одном варианте осуществления рак предпочтительно представляет собой лейкоз или лимфому.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточной лимфомы, богатой Т-клетками/гистиоцитами, лимфомы Беркитта, лимфоплазмочитарной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, Т-клеточной лимфомы, периферической Т-клеточной лимфомы, анапластической крупноклеточной лимфомы и ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза. Более предпочтительно рак представляет собой DLBCL или неходжкинскую лимфому.

Также в пределах объема настоящего изобретения находятся наборы, содержащие фармацевтическую комбинацию по настоящему изобретению и необязательно инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или более дополнительных антител.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидными из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 представлено выравнивание тяжелой цепи LY75_A1 (SEQ ID NO:1), VH 3-15 человека зародышевого типа (SEQ ID NO:11) и JH4 человека зародышевого типа (SEQ ID NO:12). CDR-области тяжелой цепи LY75_A1 подчеркнуты.

На фигуре 2 представлено выравнивание легкой цепи LY75_A1 (SEQ ID NO:2), VK O12 человека зародышевого типа (SEQ ID NO:13) и JK4 человека зародышевого типа (SEQ ID NO:14). CDR-области легкой цепи LY75_A1 подчеркнуты.

На фигуре 3a представлена цитотоксическая активность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1, в отношении HT-29 и показано, что при том, что большинство антител связываются с LY75, только некоторые из них проявляют эффективность.

На фигуре 3b представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении HT-29.

На фигуре 3c представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток RAJI.

На фигуре 3d представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Namalwa.

На фигуре 3e представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Каppaс 299.

На фигуре 3f представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток BxPC3.

На фигуре 3g представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HupT4.

На фигуре 3h представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HPAFFII.

На фигуре 3i представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток EHEB.

На фигуре 3j представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Mес-1.

На фигуре 3k представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток AML-193.

На фигуре 3l представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HCC 70.

На фигуре 3m представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HCC 1806.

На фигуре 3n представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток MDA-MB-468.

На фигуре 3o представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток RT4.

На фигуре 3p представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток 5637.

На фигуре 3q представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток SW780.

На фигуре 3r представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток SCC-9.

На фигуре 3s представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток OE 19.

На фигуре 3t представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток OVCAR-3.

На фигуре 3u представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток SK-OV-3.

На фигуре 3v представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток MOLP-8.

На фигуре 3w представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток RPMI8226.

На фигуре 4a представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Raji лимфомы Беркитта в ксенотрансплантатной модели на мышах с SCID.

На фигуре 4b представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Namalwa лимфомы Беркитта в ксенотрансплантатной модели на мышах с SCID.

На фигуре 4c представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HPAFII аденокарциномы поджелудочной железы в ксенотрансплантатной модели на бестимусных «голых» мышах.

На фигуре 4d представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток SW780 карциномы мочевого пузыря человека в ксенотрансплантатной модели на мышах с SCID.

На фигуре 4e представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток MDA-MB-468 в ксенотрансплантатной модели на бестимусных «голых» мышах.

На фигуре 4f представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток COLO205 аденокарциномы ободочной и прямой кишки в ксенотрансплантатной модели на бестимусных «голых» мышах.

На фигуре 5a показано конкурентное связывание mAb к LY75 и mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1.

На фигуре 5b показано неконкурентное связывание LY75_A1 и mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1.

На фигурах 6a-6j показаны графические представления связывания антитела LY75_A1 с пептидами LY75 в пептидной микроматрице.

На фигуре 7 показано выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов, с которыми связывается антитело LY75_A1, как в микроматричном анализе пептидов, так и в анализе пептидов по методу соосаждения. Выделенные пептиды, вероятно, образуют эпитоп, распознаваемый антителом LY75_A1.

На фигурах 8A и 8B показан антипролиферативный эффект различных (нМ) доз LY75_DM4 в качестве однократной обработки или в комбинации с ритуксимабом на двух различных линиях клеток с ABC-DLBCL (TMD8 и HBL1). (CI = показатель аддитивности Чоу-Талалая). Фигура 8A: медианный CI = 0,27. Фигура 8B: медианный CI = 0,57.

На фигуре 9 показан антипролиферативный эффект различных (нМ) доз LY75_DM4 в качестве однократной обработки или в комбинации с ибрутинибом на линиях клеток HBL-1 (ABC-DLBCL). (CI = показатель аддитивности Чоу-Талалая). Медианный CI = 0,24.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим комбинациям, содержащим компоненты (A) и (B), как определено в данном документе, где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения. Компонент (A) относится к антителу к LY75, как определено в данном документе. Компонент (B) относится либо к (i) антителу к CD20, как определено в данном документе, либо (ii) к ибрутинибу или его фармацевтически приемлемой соли.

Один пример белка LY75 приведен под SEQ ID NO: 15 в данном документе. Термины «антитела к LY75» и «антитела LY75» используются взаимозаменяемо в данном документе.

Антитела LY75, раскрытые в данном документе, могут интернализироваться при контакте с клетками, экспрессирующими рецептор LY75. Как обсуждается в данном документе, рецептор LY75 сверхэкспрессируется и/или дифференциально экспрессируется в определенных раковых клетках, в том числе, без ограничений, при лейкозе, предпочтительно остром миелоидном лейкозе или хроническом лимфоцитарном лейкозе, лимфоме, предпочтительно DLBCL, В-клеточной лимфоме, фолликулярной лимфоме, мантийноклеточной лимфоме, лимфоме из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-

клеточной лимфоме, богатой Т-клетками/гистиоцитами, лимфоме Беркитта, лимфоплазмоцитарной лимфоме, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфоме, лимфоме из клеток маргинальной зоны, Т-клеточной лимфоме, периферической Т-клеточной лимфоме, анапластической крупноклеточной лимфоме и ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме.

В связи с этим, если антитела к LY75, раскрытые в данном документе, конъюгированы с лекарственными средствами (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антитело-лекарственное средство» или «ADC»), то интернализация этих молекул ADC раковыми клетками приводит к гибели клеток и, таким образом, лечению опухоли.

Антитела к LY75 обладают конкретными структурными особенностями, такими как CDR-области с конкретными аминокислотными последовательностями. В данном документе описан набор CDR, которые могут образовывать аффинный реагент, например, антитело, который характеризуется связыванием с LY75.

Таким образом, в настоящем изобретении представлены антитела, предпочтительно выделенные антитела (которые, как вкратце изложено ниже, включают большое разнообразие хорошо известных структур, производных, миметиков и конъюгатов антител), нуклеиновые кислоты, кодирующие комбинации антител, клетки-хозяева, применяемые для получения комбинаций антител, способы получения комбинаций антител и фармацевтические комбинации, содержащие антитела и необязательно фармацевтический носитель, способы лечения, включающие применение фармацевтических комбинаций, и применение фармацевтических комбинаций для лечения форм рака.

Лимфоцитарный антиген 75 действует в качестве эндоцитирующего рецептора, направляющего захваченные антигены из внеклеточного пространства в специализированный антиген-процессирующий компартмент, и, как полагают, вызывает снижение пролиферации В-лимфоцитов.

Согласно SWISS-PROT лимфоцитарный антиген 75 экспрессируется в селезенке, тимусе, толстой кишке и лимфоцитах периферической крови. Он был выявлен в линиях миелоидных клеток и лимфоидных В-клеток. Изоформы, обозначенные в данном документе как OGTA076b и OGTA076c, экспрессируются в злокачественных клетках лимфомы Ходжкина, называемых клетками Ходжкина и Рид-Штернберга (HRS). LY75 действует в качестве эндоцитирующего рецептора, направляющего захваченные антигены из внеклеточного пространства в специализированный антиген-процессирующий компартмент. Он вызывает снижение пролиферации В-лимфоцитов.

Экспрессия LY75 наблюдалась при раке поджелудочной железы, мочевого пузыря, яичника, молочной железы (в том числе трижды негативном), ободочной и прямой кишки, пищевода, кожи, щитовидной железы и легкого (немелкоклеточном), а также при множественной миеломе и многих различных подтипах лимфомы (в том числе DLBCL) и лейкоза.

Антитело к LY75 в некоторых случаях может перекрестно реагировать с LY75 от вида, отличного от человека. Например, для облегчения проведения клинического исследования антитела к LY75 могут перекрестно реагировать с молекулами LY75 мышей или приматов. В альтернативном случае в

некоторых вариантах осуществления антитела могут обладать полной специфичностью к LY75 человека и могут не характеризоваться видовой перекрестной реактивностью или другими ее типами в отношении молекул, отличных от человеческих.

Настоящее изобретение относится к антителам к LY75 и, в некоторых вариантах осуществления, антителам к CD20, обычно терапевтическим антителам, как описано в данном документе. Антитела, находящие применение в настоящем изобретении, могут принимать ряд форматов, описанных в данном документе, включающих традиционные антитела, а также производные, фрагменты и миметики антител, описанные ниже. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены структуры антител, содержащие набор из 6 CDR, определенных в данном документе (содержащих небольшое количество аминокислотных изменений, описанных ниже).

«Антитело», как используется в данном документе, включает большое разнообразие структур, понятных специалистам в данной области, которые в некоторых вариантах осуществления содержат как минимум набор из 6 CDR, определенных в данном документе; включающих, без ограничений, традиционные антитела (в том числе как моноклональные, так и поликлональные антитела), гуманизированные и/или химерные антитела, фрагменты антител, сконструированные антитела (например, имеющие аминокислотные модификации, вкратце изложенные ниже), полиспецифические антитела (в том числе биспецифические антитела) и другие аналоги, известные из уровня техники.

Структурные единицы традиционных антител обычно включают тетрамер. Каждый тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну «легкую» (обычно имеющую молекулярную массу приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (обычно имеющую молекулярную массу приблизительно 50-70 кДа). Легкие цепи человека классифицируются как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и соответственно определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. IgG имеет несколько подклассов, включающих, без ограничений, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включающие, без ограничений, IgM1 и IgM2. Таким образом, «изотип», как используется в данном документе, означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определяемых химическими и антигенными характеристиками их константных областей. Известными изотипами иммуноглобулинов человека являются IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD и IgE. Следует понимать, что терапевтические антитела также могут включать гибриды из любой комбинации изотипов и/или подклассов.

Во многих вариантах осуществления в настоящем изобретении применяются изотипы IgG, при этом в ряде путей применения особенное применение находит IgG1.

Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область из приблизительно 100-110 или больше аминокислот, несущих основную ответственность за распознавание антигена. В переменной области в каждом из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи три петли собраны вместе с образованием антигенсвязывающего участка. Каждая из петель называется областью, определяющей комплементарность (далее в данном документе упоминаемой как «CDR»), в которой изменчивость

аминокислотной последовательности является наиболее значительной. «Вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельной области существенно различаются по последовательности среди антител. Вариабельность в пределах вариабельной области распределена неравномерно. На самом деле V-области состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной вариабельности, называемыми «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину 9-15 аминокислот или больше.

Каждая VH и VL состоит из трех гипервариабельных областей («областей, определяющих комплементарность», «CDR») и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Гипервариабельная область обычно охватывает аминокислотные остатки из аминокислотных остатков приблизительно 24-34 (LCDR1; «L» означает легкую цепь), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и около приблизительно 31-35B (HCDR1; «H» означает тяжелую цепь), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), и/или остатки, образующие гипервариабельную петлю (например, остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) и 96-101 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Конкретные CDR по настоящему изобретению описаны ниже.

Во всем настоящем описании при ссылке на остаток в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи) обычно применяется система нумерации по Kabat (например, Kabat et al., выше (1991)).

CDR вносят вклад в образование антигенсвязывающего или, более конкретно, эпитопсвязывающего участка антител. Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, расположенными рядом благодаря сворачиванию белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря сворачиванию в третичную структуру, обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Описанные в данном документе способы определения того, с какими эпитопами связывается указанное антитело (т. е. картирования эпитопов), хорошо известны из уровня техники и включают, например, анализы по методам иммуноблоттинга и иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды LY75 исследуют в отношении реактивности с указанным антителом к LY75. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные из уровня техники, и методики, описанные в данном документе, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in

Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Термин «картирование эпитопов» относится к способу идентификации молекулярных детерминант распознавания антигена антителом.

Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константные области, несущие основную ответственность за эффекторную функцию. Kabat и соавт. собрали данные о множестве первичных последовательностей переменных областей тяжелых цепей и легких цепей. На основании степени консервативности последовательностей они отнесли отдельные первичные последовательности к CDR и каркасным участкам и составили их перечень (см. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

В подклассе иммуноглобулинов IgG в тяжелой цепи находится несколько доменов иммуноглобулинов. Под «доменом иммуноглобулина (Ig)» в данном документе подразумевается область иммуноглобулина, имеющая четко выраженную третичную структуру. В настоящем изобретении интерес представляют домены тяжелых цепей, включающие константные домены (CH) и шарнирные домены тяжелых цепей. Применительно к антителам IgG каждый из изотипов IgG имеет три CH-области. Соответственно, «CH»-домены применительно к IgG являются следующими: «CH1» относится к положениям 118-220 согласно EU-индексу по Kabat. «CH2» относится к положениям 237-340 согласно EU-индексу по Kabat, а «CH3» относится к положениям 341-447 согласно EU-индексу по Kabat.

Другим типом домена тяжелой цепи Ig является шарнирная область. Под «шарнирным участком», или «шарнирной областью», или «шарнирной областью антитела», или «шарнирной областью иммуноглобулина» в данном документе подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. В структурном плане CH1-домен IgG заканчивается положением 220 согласно EU, а CH2-домен IgG начинается с положения остатка 237 согласно EU. Таким образом, для антитела IgG шарнирный участок в данном документе определяется как включающий положения с 221 (D221 в IgG1) по 236 (G236 в IgG1), где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, например, применительно к Fc-области, включен нижний шарнирный участок, при этом «нижний шарнирный участок» обычно относится к положениям 226 или 230.

Особенный интерес в настоящем изобретении представляют Fc-области. Под «Fc», или «Fc-областью», или «Fc-доменом», как используется в данном документе, подразумевается полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина и в некоторых случаях части шарнирного участка. Таким образом, Fc относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM и гибкому шарнирному участку, расположенному в направлении N-конца от этих доменов. В случае IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. В случае IgG Fc-домен содержит домены иммуноглобулинов C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю шарнирную область между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). Хотя границы Fc-области могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как включающая остатки от C226 или P230 до ее карбоксильного конца, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, как более полно

описано ниже, аминокислотные модификации производят в Fc-области, например, с изменением связывания с одним или более FcγR-рецепторами или с FcRn-рецептором.

В некоторых вариантах осуществления антитела являются антителами полной длины. Под «антителом полной длины» в данном документе подразумевается структура, являющаяся естественной биологической формой антитела, содержащая переменные и константные области, содержащие одну или более модификаций, вкратце изложенных в данном документе.

В альтернативном случае антитела могут представлять собой ряд структур, включающих, без ограничений, фрагменты антител, моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, продукты слияния антител (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антител») и соответственно фрагменты каждого из них. Структуры, в основе которых лежит применение набора CDR, включены в определение «антитела».

В одном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. Конкретные фрагменты антител включают, без ограничений, (i) Fab-фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов, (ii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов, (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов отдельного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, включенный посредством ссылки во всей своей полноте), состоящий из отдельной переменной области, (v) выделенные CDR-области, (vi) F(ab')₂-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащие два связанных Fab-фрагмента, (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), где VH-домен и VL-домен связаны пептидным линкером, обеспечивающим объединение двух доменов с образованием антигенсвязывающего участка (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, включенный посредством ссылки во всей своей полноте), (viii) биспецифические одноцепочечные Fv (WO 03/11161, включенная посредством ссылки во всей своей полноте) и (ix) «диатела» или «триатела», поливалентные или полиспецифические фрагменты, конструируемые путем слияния генов (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой комбинацию от различных видов, например, химерное антитело и/или гуманизированное антитело. Иными словами, в настоящем изобретении наборы CDR можно применять с каркасными и константными областями, отличными от конкретно описанных в данном документе по последовательности.

В целом, как «химерные антитела», так и «гуманизированные антитела» относятся к антителам, в которых объединены области от более чем одного вида. Например, «химерные антитела» традиционно содержат переменную(переменные) область(области) от мыши (или, в некоторых случаях, крысы) и константную(константные) область(области) от человека. «Гуманизированные антитела» обычно относятся к антителам, отличным от человеческих, у которых каркасные области переменных доменов были заменены последовательностями, обнаруживаемыми в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело, за исключением CDR, кодируется полинуклеотидом

человеческого происхождения или за исключением своих CDR идентично такому антители. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими от организма, отличного от человека, трансплантируют в каркасный участок со структурой бета-листа в варибельной области антитела человека с получением антитела, специфичность которого определяется трансплантированными CDR. Получение таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. «Обратная мутация» по типу замены выбранных остатков акцепторных каркасных участков на соответствующие донорные остатки часто необходима для восстановления аффинности, утрачиваемой конструкцией после первоначальной трансплантации (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте). Гуманизированное антитело в оптимальном случае также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека, и, соответственно, обычно содержит Fc-область человека. Гуманизированные антитела также можно получать с применением мышей с иммунной системой, подвергнутой генной инженерии. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, включенный посредством ссылки во всей своей полноте. Из уровня техники хорошо известен ряд методик и способов гуманизации и реконструирования антител, отличных от человеческих (см. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), и литературные источники, упоминаемые там, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте). Способы гуманизации включают, без ограничений, способы, описанные в Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности варибельных областей антител, отличных от человеческих, может включать способы изменения поверхности, описанные, например, в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, включенном посредством ссылки во всей своей полноте. В одном варианте осуществления исходное антитело было подвергнуто созреванию аффинности, известному из уровня техники. Для гуманизации и созревания аффинности можно использовать структурные способы, например, описанные в USSN 11/004590. Для гуманизации и/или созревания аффинности варибельных областей антител можно использовать способы на основе отбора, в том числе, без ограничений, способы, описанные в Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Другие способы гуманизации могут включать трансплантацию лишь частей CDR, в том числе, без ограничений, способы, описанные в USSN 09/810510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Антитела, раскрытые в данном документе, могут быть выделенными или рекомбинантными. «Выделенный», используемый для описания различных полипептидов, раскрытых в данном документе, означает полипептид, который был идентифицирован и отделен от и/или извлечен из клетки или культуры клеток, в которой он экспрессировался. Таким образом, выделенное антитело предназначено для обозначения антитела, практически свободного от других антител с другой специфичностью к антигенам (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с LY75, практически свободно от антител, специфично связывающихся с антигенами, отличными от LY75). Таким образом, «выделенное» антитело находится в форме, обычно не обнаруживаемой в природе (например, не встречающейся в природе). Выделенное антитело, определенное в данном документе, может в одном варианте осуществления содержать по меньшей мере одну аминокислоту, не встречающуюся во «встречающемся в природе» антителе. Эта аминокислота может быть введена посредством добавления или замены. Будет понятно, что вводимая аминокислота может быть встречающейся в природе или не встречающейся в природе аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению представляют собой рекомбинантные белки, выделенные белки или практически чистые белки. «Выделенный» белок не сопровождается по меньшей мере некоторой частью материала, с которым он обычно связан в своем естественном состоянии, например, составляя по меньшей мере приблизительно 5% или по меньшей мере приблизительно 50% по весу от общего белка в указанном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9% по весу от содержания общего белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок может быть получен в значительно более высокой концентрации путем применения индуцируемого промотора или промотора, обеспечивающего высокую экспрессию, благодаря чему белок получают при повышенных уровнях концентрации. В случае рекомбинантных белков определение включает получение антитела в большом разнообразии организмов и/или клеток-хозяев, известных в данной области техники, в которых оно не образуется в естественных условиях. Обычно выделенный полипептид получают с помощью по меньшей мере одного этапа очистки. «Выделенное антитело» относится к антителу, практически свободному от других антител с другой специфичностью к антигенам. Например, выделенное антитело, которое специфично связывается с LY75, практически свободно от антител, специфично связывающихся с антигенами, отличными от LY75, за исключением антител, которые связываются с CD20.

Выделенные моноклональные антитела с разной специфичностью можно объединить в четко определенную композицию. Таким образом, например, антитело по настоящему изобретению можно необязательно и по отдельности включать или не включать в состав, как дополнительно обсуждается ниже.

Антитела к LY75 по настоящему изобретению специфично связываются с LY75 (например, SEQ ID NO: 15). Антитела к CD20 по настоящему изобретению специфично связываются с CD20. «Специфичное связывание», или «специфично связывается с», или «специфичный к» в отношении конкретного антигена или эпитопа означает связывание, измеримо отличающееся от неспецифического взаимодействия. Специфичное связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы в сравнении со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу

сходной структуры, не обладающей активностью связывания. Например, специфичное связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, сходной с целевой.

Специфичное связывание с конкретным антигеном или эпитопом может проявляться, например, антителом, имеющим KD для антигена или эпитопа, составляющую по меньшей мере приблизительно 10^{-4} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-6} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-7} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-8} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-9} M, в альтернативном случае по меньшей мере приблизительно 10^{-10} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-11} M, по меньшей мере приблизительно 10^{-12} M или больше, где KD относится к константе скорости диссоциации при конкретном взаимодействии антитела и антигена. Антитело, которое специфично связывается с антигеном, обычно будет иметь KD, в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или больше раз большую для контрольной молекулы по сравнению с антигеном или эпитопом. Однако, в настоящем изобретении при введении ADC на основе антител к LY75 по настоящему изобретению важно, чтобы KD была достаточной для обеспечения интернализации и, следовательно, гибели клеток без значительных побочных эффектов.

Специфичное связывание с конкретным антигеном или эпитопом также может проявляться, например, антителом, имеющим KA или Ka для антигена или эпитопа, по меньшей мере в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или больше раз большую для эпитопа по сравнению с контролем, где KA или Ka относится к константе скорости ассоциации при конкретном взаимодействии антитела и антигена.

Стандартные анализы для оценки способности антител к связыванию с LY75 или CD20 могут выполняться на уровне белков или клеток и известны из уровня техники, в том числе, например, разновидности ELISA, вестерн-блоттинга, RIA, анализы на BIAcore® и анализ по методу проточной цитометрии. Подходящие анализы подробно описаны в разделе «Примеры». Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценить с помощью стандартных анализов, известных из уровня техники, как, например, с помощью анализа на системе BIAcore®. Для оценки связывания с клетками Raji или Daudi В-клеточной опухоли клетки Raji (номер депонирования в ATCC CCL-86) или Daudi (номер депонирования в ATCC CCL-213) можно получить из общедоступных источников, таких как Американская коллекция типовых культур, и применять в стандартных анализах, таких как анализы по методу проточной цитометрии.

Антитела к LY75, которые связываются с LY75 (SEQ ID NO: 15), могут интернализироваться при контакте с клетками, на клеточной поверхности которых экспрессируется LY75. Эти антитела упоминаются в данном документе как «антитела, связывающиеся с LY75» либо, для простоты описания, «антитела к LY75». Оба термина используются взаимозаменяемо в данном документе.

Антитела к LY75 интернализируются при контакте с клетками, в частности, опухолевыми клетками, на поверхности которых экспрессируется LY75. Иными словами, антитела к LY75, определенные в данном документе, которые также содержат конъюгированные лекарственные средства, интернализируются опухолевыми клетками, что приводит к высвобождению лекарственного средства и последующей гибели клеток, обеспечивая лечение форм рака, характеризующихся экспрессией LY75.

Интернализацию в данном случае можно измерить несколькими способами. В одном варианте осуществления антитела к LY75 приводят в контакт с клетками, такими как линия клеток, вкратце описанная в данном документе, с помощью стандартных анализов, как, например, с использованием MAbZap. Для специалиста в данной области будет очевидно, что анализ с использованием MAbZap иллюстрирует ожидаемый эффект, который можно наблюдать для конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). В последнем случае ADC будет интернализироваться, привнося таким образом лекарственное средство в клетку. Токсичное лекарственное средство будет иметь способность к уничтожению клетки, т. е. к уничтожению раковой клетки-мишени. Данные анализов MAbZap легко принимаются специалистами в данной области как иллюстративные для анализов ADC (Kohls, M and Larpi, D., [2000] Biotechniques, vol. 28, no. 1, 162-165).

В этих вариантах осуществления анализов *in vitro* антитела к LY75 добавляют вместе с антителом к антителам к LY75, содержащим токсин; например, антитело к LY75 может быть мышинным или гуманизированным, а антитело к антителам к LY75, может быть антителом к мышинным антителам или антителом к гуманизированным антителам и содержать токсин, такой как сапорин. После образования комплекса [антитело к LY75]-[конъюгат антитело к антителу к LY75-лекарственное средство] комплекс интернализируется, и лекарственное средство (например, сапорин) высвобождается, приводя к гибели клеток. Лекарственное средство высвобождается только после интернализации, и поэтому клетки в отсутствие интернализации остаются жизнеспособными. Как вкратце изложено ниже, без ограничения какой-либо теорией, в терапевтических путях применения антитело к антителу к LY75 содержит токсин, и после интернализации связь между антителом и токсином расщепляется с высвобождением токсина и уничтожением клетки.

В одном варианте осуществления антитело к LY75 содержит области, определяющие комплементарность (CDR), или переменные области (VR) тяжелых и легких цепей конкретного антитела, описанного в данном документе (например, упоминаемого в данном документе как «LY75_A1»). Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH) антитела LY75_A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO:1, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи (VL) антитела LY75_A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO:2.

В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO:7; и переменную область легкой цепи, содержащую первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO:8; вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO:10.

В другом варианте осуществления антитела к LY75 связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:1, и ее консервативные модификации последовательности. Антитело может дополнительно содержать переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:2, и ее консервативные модификации последовательности.

В дополнительном варианте осуществления антитела к LY75 связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO:1 и/или 2 соответственно, и их консервативные модификации последовательности. Как используется в данном документе, термин «консервативная модификация последовательности» относится, например, к замене аминокислоты аминокислотой, имеющей аналогичные характеристики. Для специалиста в данной области обычно общеизвестно, какие из этих замен могут считаться консервативными. Другие модификации, которые могут считаться консервативными модификациями последовательности, включают, например, гликозилирование.

Необязательно, одна или более из SEQ ID NO: 5-10 независимо содержат одну, две, три, четыре или пять консервативных аминокислотных замен; необязательно, одна или более из SEQ ID NO: 5-10 независимо содержат одну или две консервативные аминокислотные замены.

Предпочтительно, термин «консервативные модификации последовательности» подразумевается как включающий аминокислотные модификации, которые не влияют на характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность, или не изменяют их в значительной степени. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления или делеции. Модификации могут быть введены в антитело по настоящему изобретению посредством стандартных методик, известных из уровня техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены являются такими, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в уровне техники. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR-областях антитела по настоящему изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело можно исследовать в отношении сохранения функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе.

Выделенные антитела, содержащие переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или большей идентичностью последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также включены в настоящее изобретение. Промежуточные диапазоны вышеуказанных значений, например, переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-100% идентичностью

последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением. В одном варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1 или последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:2 или последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит каркасную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную каркасной области переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 1, содержащей SEQ ID NO: 16, 17 и 18. В другом варианте осуществления антитело к LY75 содержит каркасную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную каркасной области переменной области легкой цепи под SEQ ID NO:2, содержащей SEQ ID NO:19, 20 и 21.

В одном варианте осуществления антитело к LY75, называемое в данном документе «антителом LY75_A1», содержит следующие CDR, а также их варианты, содержащие небольшое количество аминокислотных вариантов:

A1	SEQ ID NO
CDR1 переменной области тяжелой цепи	5
CDR2 переменной области тяжелой цепи	6
CDR3 переменной области тяжелой цепи	7
CDR1 переменной области легкой цепи	8
CDR2 переменной области легкой цепи	9

CDR3 вариабельной области легкой цепи	10
---	----

В данном документе также раскрыты вариабельные области тяжелых и легких цепей, которые содержат наборы CDR по настоящему изобретению, а также тяжелые и легкие цепи полной длины (например, также содержащие константные области). Как будет понятно специалистам в данной области, наборы CDR антитела к LY75 можно внедрить в мышиные, гуманизированные или человеческие константные области (в том числе каркасные области). Соответственно, в настоящем изобретении представлены вариабельные области тяжелых и легких цепей, на по меньшей мере приблизительно 90%-99% идентичные SEQ ID, раскрытым в данном документе, при этом все из 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99% находят применение в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления антитело к LY75 представляет собой антитело, которое конкурирует за связывание с LY75 человека с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2. Антитела, конкурирующие за связывание, можно идентифицировать с применением стандартных методик. Такие методики включают, например, иммунологический анализ, демонстрирующий способность одного антитела к блокированию связывания другого антитела с антигеном-мишенью, т. е. анализ конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как LY75. Известно множество типов анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой EIA с использованием комплекса биотин-авидин (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой RIA с мечением с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA с использованием комплекса биотин-авидин (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)) и прямой RIA с мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Обычно такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченого исследуемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или с клетками, в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Исследуемый иммуноглобулин обычно присутствует в избытке. Если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно обычно будет ингибировать специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном на по меньшей мере 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-99% или больше.

Моноклональные антитела можно охарактеризовать по связыванию с LY75 или CD20 с помощью ряда известных методик. Как правило, антитела вначале характеризуют с помощью ELISA. Вкратце, титрационные микропланшеты можно покрыть очищенным LY75 или CD20 в PBS, а затем блокировать нерелевантными белками, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), разведенный в PBS. В каждую лунку добавляют разведения плазмы крови мышей, иммунизированных с помощью LY75 или CD20, и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Планшеты промывают с помощью PBS/Tween 20 и затем инкубируют с реагентом, представляющим собой поликлональное антитело козы к IgG человека, специфичное к Fc, конъюгированное с щелочной фосфатазой, в течение 1 часа при 37°C. После промывания планшеты проявляют с помощью субстрата ABTS и анализируют при OD 405. Предпочтительно, для процедур слияния будут использовать мышей, у которых проявляются наиболее высокие титры.

Анализ ELISA, описанный выше, можно применять для скрининга с выявлением антител и, следовательно, гибридом, образующих антитела, которые демонстрируют положительную реактивность в отношении иммуногена LY75/CD20. Гибридомы, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с LY75/CD20, можно затем субклонировать и дополнительно охарактеризовать. Один клон из каждой гибридомы, сохраняющий реактивность исходных клеток (по ELISA), можно затем выбрать для получения клеточного банка и для очистки антител.

Для очистки антител к LY75 или антител к CD20 выбранные гибридомы можно выращивать во вращающихся флаконах, двухлитровых вращающихся колбах или других системах культивирования. Образцы надосадочной жидкости можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А на сефарозе (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси) для очистки белка. После замены буфера на PBS концентрацию можно определить по OD280 с применением коэффициента экстинкции 1,43 или, предпочтительно, с помощью нефелометрического анализа. IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и с помощью антиген-специфического способа.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные антитела к LY75 или антитела к CD20 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с помощью коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Связывание биотинилированных mAb можно выявить с помощью зонда, меченного стрептавидином. Для определения изотипа очищенных антител можно проводить изотипирующий ELISA с применением методик, принятых в данной области техники. Например, лунки титрационных микропланшетов можно покрыть 10 мкг/мл антитела к Ig на ночь при 4°C. После блокирования с помощью 5% BSA в планшетах проводят реакцию с 10 мкг/мл моноклональных антител или очищенных изотипических контролей при температуре окружающей среды в течение двух часов. В лунках затем можно провести реакцию с конъюгированными зондами, специфичными к IgG1 или другим изотипам. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими LY75 или CD20, можно применять проточную цитометрию. Вкратце, линии клеток и/или PBMC человека, экспрессирующие мембраносвязанный LY75 или CD20 (выращиваемые в стандартных условиях роста), смешивают с моноклональными антителами в различных концентрациях в PBS, содержащем 0,1% BSA,

при 4°C в течение 1 часа. После промывания проводят реакцию клеток с антителом к IgG, меченным флуоресцеином, в тех же условиях, что и при окрашивании первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью прибора FACScan с использованием свойств светорассеяния и бокового рассеяния для введения логического ограничения по отдельным клеткам и определения связывания меченых антител. Можно применять альтернативный анализ с применением флуоресцентной микроскопии в дополнение к анализу по методу проточной цитометрии или вместо него. Клетки можно окрашивать в точности так, как описано выше, и изучать с помощью флуоресцентной микроскопии. Данный способ обеспечивает визуализацию отдельных клеток, но может характеризоваться сниженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Можно дополнительно исследовать реактивность антител IgG к LY75 в отношении антигена LY75 с помощью вестерн-блоттинга; то же самое можно осуществить с антителами к CD20. Вкратце, можно получить клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих LY75/CD20, и подвергнуть электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. После электрофореза отделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% мышиной сывороткой крови и зондируют моноклональными антителами, подлежащими исследованию. Связывание IgG можно выявить с помощью антитела к IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и проявить с помощью таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к LY75 включают стандартные анализы, известные в данной области техники, например, анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™ с применением прибора для SPR Biacore™ 2000 (Biacore AB, Уппсала, Швеция).

В одном варианте осуществления антитело специфично связывается с LY75 человека, содержащим SEQ ID NO: 15. Предпочтительно, антитело к LY75 связывается с LY75 человека с высокой аффинностью.

Предпочтительно, антитело к LY75 связывается с белком LY75 с K_D 5×10^{-8} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 2×10^{-8} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 5×10^{-9} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 4×10^{-9} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 3×10^{-9} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 2×10^{-9} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 1×10^{-9} М или меньше, связывается с белком LY75 с K_D 5×10^{-10} М или меньше или связывается с белком LY75 с K_D 1×10^{-10} М или меньше.

В одном варианте осуществления антитела к LY75 конкурируют (например, перекрестно конкурируют) за связывание с LY75 с конкретными антителами к LY75, описанными в данном документе (например, LY75_A1). Такие конкурирующие антитела можно идентифицировать на основании их способности к конкурентному ингибированию связывания одного или более mAb с LY75 в стандартных анализах связывания с LY75. Например, можно применять стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок LY75 человека иммобилизован на планшете, одно из антител является флуоресцентно меченным, и оценивается способность немеченых антител к выведению меченого антитела из конкуренции за связывание. Дополнительно или в альтернативном случае можно применять

анализ BIAcore для оценки способности антител к перекрестной конкуренции. Способность исследуемого антитела к ингибированию связывания антитела к LY75 по настоящему изобретению с LY75 человека демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с LY75 человека.

В одном варианте осуществления конкурирующее антитело представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом на LY75 человека, что и конкретные моноклональные антитела к LY75, описанные в данном документе (например, LY75_A1). Стандартные методики картирования эпитопов, такие как рентгеновская кристаллография и 2-мерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса, можно применять для определения того, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

В одном варианте осуществления антитело, которое конкурирует за связывание с LY75 и/или связывается с тем же эпитопом на LY75 человека, представляет собой антитело человека.

После выделения одного исходного mAb к LY75, имеющего желаемые свойства, описанные в данном документе, могут быть получены другие mAb с аналогичными свойствами, например, имеющие тот же эпитоп. Например, можно иммунизировать мышей с помощью LY75, как описано в данном документе, получать гибридомы и подвергать полученные mAb скринингу с выявлением способности к конкуренции с исходным mAb за связывание с LY75. Мышей также можно иммунизировать меньшим фрагментом LY75, содержащим эпитоп, с которым связывается исходное mAb. Локализацию эпитопа можно определить путем, например, скрининга с выявлением связывания с рядом перекрывающихся пептидов, охватывающих LY75. В альтернативном случае можно применять способ из Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994, для управления отбором mAb, имеющих тот же эпитоп и, следовательно, аналогичные свойства по сравнению с исходным mAb. С помощью фагового дисплея вначале тяжелую цепь исходного антитела спаривают с совокупностью (предпочтительно человеческих) легких цепей для отбора mAb, связывающихся с LY75, а затем новую легкую цепь спаривают с совокупностью (предпочтительно человеческих) тяжелых цепей для отбора (предпочтительно человеческих) mAb, связывающихся с LY75, имеющих тот же эпитоп, что и исходное mAb. В альтернативном случае варианты исходного mAb можно получить путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела.

Для оценки уровня конкуренции между двумя антителами можно применять, например, радиоиммунологические анализы или анализы с использованием других меток для антител. Например, антиген LY75 можно инкубировать с насыщающим количеством первого антитела к LY75 или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированных с соединением-меткой (например, ^3H , ^{125}I , биотином или рубидием), в присутствии такого же количества второго немеченого антитела к LY75. Затем оценивают количество меченого антитела, связывающегося с антигеном в присутствии немеченого блокирующего антитела, и сравнивают со связыванием в отсутствие немеченого блокирующего антитела. Конкуренцию определяют по процентному изменению сигналов связывания в присутствии немеченого блокирующего антитела по сравнению с отсутствием блокирующего антитела. Таким

образом, если имеет место 50% ингибирование связывания меченого антитела в присутствии блокирующего антитела по сравнению со связыванием в отсутствие блокирующего антитела, то имеет место конкуренция между двумя антителами, составляющая 50%. Таким образом, ссылка на конкуренцию между первым и вторым антителами, составляющую 50% или больше, 60% или больше, 70% или больше, как, например, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше, означает, что первое антитело ингибирует связывание второго антитела (или наоборот) с антигеном на 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше (по сравнению со связыванием с антигеном второго антитела в отсутствие первого антитела). Таким образом, ингибирование связывания первого антитела с антигеном вторым антителом, составляющее 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше, означает, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления компонент (B) фармацевтической комбинации представляет собой антитело к CD20, определенное в данном документе.

В-лимфоцитарный антиген CD20 или CD20 представляет собой активируемый гликозилированием фосфопротеин, экспрессируемый на поверхности всех В-клеток, начиная с фазы про-В (CD45R+, CD117+), концентрация которого постепенно увеличивается до достижения зрелости (Hardy, Richard (2008). «Chapter 7: B Lymphocyte Development and Biology». В Paul, William. Fundamental Immunology (Book) (6th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 237–269. ISBN 0-7817-6519-6.).

CD20 экспрессируется на всех стадиях развития В-клеток, за исключением первой и последней; он присутствует, начиная со стадии поздних про-В-клеток до стадии клеток памяти, но отсутствует на ранних про-В-клетках или плазмобластах и плазматических клетках. Он обнаруживается на раковых стволовых клетках при В-клеточной лимфоме, волосатоклеточном лейкозе, В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе и меланоме. Экспрессия CD20 регулируется посредством передачи сигнала хемокинами через ось CXCR4/SDF1.

Иммуногистохимическое исследование может применяться для определения присутствия CD20 на клетках в гистологических срезах тканей.

У людей CD20 кодируется геном MS4A1. Этот ген кодирует члена семейства генов трансмембранных белков 4A.

В одном варианте осуществления компонент (B) фармацевтической комбинации содержит антитело к CD20 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

а) переменную область тяжелой цепи, содержащую:

i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 40;

ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 41; и

iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 42; и

b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 43;

ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 44; и

iii) третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 45;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций.

Необязательно, одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO: 40-45 независимо содержат одну, две, три, четыре или пять консервативных аминокислотных замен; более предпочтительно, любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну или две консервативные аминокислотные замены.

Антитело к CD-20 предпочтительно представляет собой моноклональное антитело, более предпочтительно человеческое моноклональное антитело и еще более предпочтительно полностью человеческое моноклональное антитело IgG1.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD20 представляет собой ритуксимаб. Ритуксимаб представляет собой моноклональное антитело к белку CD20, который широко экспрессируется на В-клетках (Oncogene (2003 Oct 20), Smith MR, «Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance», 22(47): 7359-68). Ритуксимаб разрушает как нормальные, так и злокачественные В-клетки, которые имеют CD20 на их поверхности, и, следовательно, применяется для лечения заболеваний, которые характеризуются наличием слишком большого количества В-клеток, сверхактивных В-клеток или дисфункциональных В-клеток. Ритуксимаб ранее применялся для лечения ряда аутоиммунных заболеваний и некоторых типов рака, включая ревматоидный артрит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, обыкновенную пузычатку, рассеянный склероз, системную красную волчанку, неходжкинскую лимфому, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хронический лимфоцитарный лейкоз и виды аутоиммунной анемии. Ритуксимаб продается под торговым наименованием Rituxan® компанией Roche.

Предпочтительно, тяжелая и/или легкая цепь антитела ритуксимаба содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 38 и 39 соответственно, или состоит из нее.

Настоящим изобретением охватываются варианты антител, иногда также называемые «производными антител» или «аналогами антител». Иными словами, существует ряд модификаций, которые можно производить в отношении антител, раскрытых в данном документе, включающих, без ограничений, аминокислотные модификации CDR (созревание аффинности), аминокислотные модификации каркасных областей, аминокислотные модификации Fc-области, варианты гликозилирования,

ковалентные модификации других типов (например, для присоединения конъюгированных лекарственных средств и т. п.).

Под «вариантом» в данном документе подразумевается полипептидная последовательность, отличающаяся от таковой у исходного полипептида за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. В этом случае исходный полипептид представляет собой вариабельную область тяжелой либо легкой цепи полной длины, например, приведенную под SEQ ID NO: 1 или 2 соответственно, или CDR-области или каркасные области тяжелых и легких цепей, приведенные под SEQ ID NO 5-10 и 16-21 для LY75. Аминокислотные модификации могут включать замены, вставки и делеции, при этом первые во многих случаях являются предпочтительными. Будет понятно, что аминокислотная замена может представлять собой консервативную или неконсервативную замену, при этом консервативные замены являются предпочтительными. Дополнительно, указанная замена может представлять собой замену встречающейся в природе либо не встречающейся в природе аминокислотой.

В целом, варианты могут содержать любое количество модификаций, при условии, что функция антитела будет по-прежнему присутствовать, как описано в данном документе. Иными словами, в случае LY75_A1, например, антитело должно по-прежнему специфично связываться с LY75 человека. Аналогично, антитела к CD20 должны по-прежнему специфично связываться с CD20 человека. Если аминокислотные варианты получают с Fc-областью, например, то варианты антител должны сохранять функции связывания с рецепторами, необходимые для конкретного применения антитела или показания к нему.

«Варианты» в этом случае можно получить в приведенных последовательностях CDR, каркасных либо Fc-областях антитела.

Однако, в целом обычно используют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, поскольку часто целью является изменение функции с минимальным количеством модификаций. В некоторых случаях имеют место от 1 до 5 модификаций (например, отдельных аминокислотных замен, вставок или делеций), при этом 1-2, 1-3 и 1-4 также находят применение во многих вариантах осуществления. Количество модификаций может зависеть от размера модифицируемой области; например, как правило, в CDR-областях желательным является меньшее количество модификаций. Специалисту в данной области будет понятно, что даже в CDR-областях местоположение модификации может значительно изменять эффект. В одном варианте осуществления модификации можно производить в любой из CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелых и/или легких цепей. В дополнительном варианте осуществления модификации производят в любой из CDR1 или CDR2 тяжелых и/или легких цепей. В еще одном дополнительном варианте осуществления модификации расположены в CDR1 тяжелых и/или легких цепей.

Следует отметить, что ряд аминокислотных модификаций может находиться в функциональных доменах: например, может быть необходимо наличие 1-5 модификаций в Fc-области белков дикого типа или сконструированных белков, а также от 1 до 5 модификаций в Fv-области, например. Вариант полипептидной последовательности предпочтительно будет обладать по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с исходными

последовательностями (например, переменными областями, константными областями и/или последовательностями тяжелых и легких цепей и/или CDR LY75_A1 или ритуксимаба). Следует отметить, что, в зависимости от размера последовательности, процентная идентичность будет зависеть от количества аминокислот.

Под «аминокислотной заменой» или «заменой» в данном документе подразумевается замещение аминокислоты в конкретном положении исходной полипептидной последовательности другой аминокислотой, которая может быть природной или не встречающейся в природе аминокислотой. Например, замена S100A относится к варианту полипептида, в котором серин в положении 100 замещен аланином. Под «аминокислотной вставкой» или «вставкой», используемой в данном документе, подразумевается добавление аминокислоты в конкретное положение исходной полипептидной последовательности. Под «аминокислотной делецией» или «делецией», используемой в данном документе, подразумевается удаление аминокислоты в конкретном положении исходной полипептидной последовательности.

Под «исходным полипептидом», «исходным белком», «полипептидом-предшественником» или «белком-предшественником», используемым в данном документе, подразумевается немодифицированный полипептид, который впоследствии модифицируют с получением варианта. Как правило, исходные полипептиды в данном документе представляют собой LY75_A1 и ритуксимаб. Соответственно, под «исходным антителом», используемым в данном документе, подразумевается антитело, которое модифицируют с получением варианта антитела.

Под «диким типом», или «WT», или «нативным» в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность, обнаруживаемая в природе, в том числе аллельные варианты. Белок, полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG и т. п. WT имеют аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была преднамеренно модифицирована.

Под «вариантом Fc-области» в данном документе подразумевается последовательность Fc, отличающаяся от последовательности Fc дикого типа за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. Вариант Fc может относиться к полипептиду Fc как таковому, к композициям, содержащим вариант полипептида Fc, или к аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в одной или более CDR LY75_A1 или ритуксимаба производят одну или более аминокислотных модификаций. Как правило, в любой отдельной CDR заменяют только 1, или 2, или 3 аминокислоты, и в наборе из 6 CDR обычно производят не более 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изменений. Однако, следует понимать, что любую комбинацию из отсутствия замен, 1, 2 или 3 замен в любой CDR можно независимо и необязательно сочетать с любой другой заменой. Будет очевидно, что замены можно производить в любой из 6 CDR. В одном варианте осуществления замены производят в CDR1 тяжелых и/или легких цепей.

В некоторых случаях аминокислотные модификации в CDR называют «созреванием аффинности». Антитело, подвергнутое «созреванию аффинности», имеет одно или более изменений в одной или более CDR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим этого(этих) изменения(изменений). В некоторых случаях, хоть и редких, может быть желательным снижение аффинности антитела к его антигену, но это обычно не является предпочтительным.

Созревание аффинности можно выполнять для повышения аффинности связывания антитела с антигеном на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 110%, приблизительно 120%, приблизительно 130%, приблизительно 140%, приблизительно 150% или больше или в от 1, 2, 3, 4 до 5 раз по сравнению с «исходным» антителом. Предпочтительные антитела, подвергнутые созреванию аффинности, будут характеризоваться наномолярными или даже пикомолярными значениями аффинности к антигену-мишени. Антитела, подвергнутые созреванию аффинности, получают с помощью известных процедур. См., например, Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783, в котором описано созревание аффинности путем перетасовки доменов варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL). Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркасных участков описан в Barbas, et al. 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; и Hawkins et al, 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, например.

В альтернативном случае в одной или более CDR антител по настоящему изобретению можно производить аминокислотные модификации, которые являются «молчащими», например, которые незначительно изменяют аффинность антитела к антигену. Их можно производить по ряду причин, включающих оптимизацию экспрессии (которую можно выполнять для нуклеиновых кислот, кодирующих антитела по настоящему изобретению).

Таким образом, в определение CDR и антител, раскрытых в данном документе, включены варианты CDR и антител; иными словами, антитела могут содержать аминокислотные модификации в одной или более CDR LY75_A1 или ритуксимаба. В дополнение, как вкратце изложено ниже, аминокислотные модификации можно также независимо и необязательно производить в любой области за пределами CDR, в том числе в каркасных и константных областях, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к LY75 и/или антитела к CD20, раскрытые в данном документе, состоят из варианта Fc-домена. Как известно в данной области техники, Fc-область антитела взаимодействует с рядом Fc-рецепторов и лигандов, придавая целый ряд важных функциональных способностей, называемых эффекторными функциями. Эти Fc-рецепторы включают, без ограничений, (у людей) FcγRI (CD64), в том числе изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), в том числе изоформы FcγRIIa (в том числе аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (в том числе FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), в том числе изоформы FcγRIIIa (в том числе аллотипы V158 и F158, связанные с антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)) и FcγRIIIb (в том числе аллотипы FcγRIIIb-

NA1 и FcγRIIIb-NA2), FcRn (неонатальный рецептор), C1q (белок системы комплемента, участвующий в комплементзависимой цитотоксичности (CDC)) и FcRn (неонатальный рецептор, участвующий в регуляции периода полувыведения из сыворотки крови). Подходящие модификации можно производить в одном или более положениях, как в целом изложено, например, в заявке на патент США 11/841654 и литературных источниках, упоминаемых там, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341769, патенте США № 6737056, патенте США № 7670600, патенте США № 6086875, все из которых явным образом включены посредством ссылки во всей своей полноте, в частности, что касается конкретных аминокислотных замен, усиливающих связывание с Fc-рецепторами.

В дополнение к модификациям, изложенным выше, можно производить другие модификации. Например, молекулы можно стабилизировать путем включения в их состав дисульфидных мостиков, связывающих VH- и VL-домены (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, включенный посредством ссылки во всей своей полноте).

В дополнение, модификации цистеиновых остатков являются особенно применимыми в путях применения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), дополнительно описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела может быть сконструирована содержащей один или более особенно «тиол-реактивных» цистеиновых остатков в целях обеспечения более специфичного и регулируемого размещения компонента-лекарственного средства. См., например, патент США № 7521541, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В дополнение, существует ряд ковалентных модификаций антител, которые можно производить, как вкратце изложено ниже.

Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда, выполняются посттрансляционно. Например, некоторые типы ковалентных модификаций антитела внедряют в молекулу посредством реакции конкретных аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим средством, способным к реакции с определенными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

Цистеинильные остатки чаще всего подвергают реакции с α-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также можно дериватизировать посредством реакции с бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-имидазолил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркуробензоатом, 2-хлормеркуро-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом и т. п.

Гистидильные остатки дериватируют посредством реакции с диэтилпиروкарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку данное средство является относительно специфичным к боковой цепи гистидила. Также

применимым является пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация с помощью этих средств обладает эффектом изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппы, включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфовую кислоту; О-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргининильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или более традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация аргининовых остатков требует, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях, в связи с высокой pKa гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с эпсилон-аминогруппой аргинина.

Можно производить конкретные модификации тирозильных остатков, при этом особенный интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Для образования О-ацетилтирозильных молекул и 3-нитропроизводных чаще всего соответственно применяют N-ацетилимидазол и тетранитрометан. Тирозильные остатки йодируют с помощью ^{125}I или ^{131}I с получением меченых белков для применения в радиоиммунологическом анализе, при этом способ с применением хлорамина Т, описанный выше, является предпочтительным.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют посредством реакции с карбодинидами ($\text{R}'\text{—N}=\text{C}=\text{N--R}'$), где R и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодинимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодинимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания антител с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью для применения в ряде способов в дополнение к способам, описанным ниже. Широко используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, N-гидроксисукцинимидные сложные эфиры, например, сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидоэфиры, в том числе дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропионимидат, обеспечивают получение фотоактивируемых промежуточных соединений, способных образовывать поперечные связи в присутствии света. В альтернативном случае для иммобилизации белков используют реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активированные бромистым цианогеном углеводы и реакционноспособные

субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют с получением соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно. В альтернативном случае эти остатки дезамидируют в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], включенный посредством ссылки во всей своей полноте), ацетилирование N-концевой аминогруппы и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

В дополнение, как будет понятно специалистам в данной области, к антителам (а также к другим композициям по настоящему изобретению) можно добавлять любые метки (в том числе флуоресцентные, ферментные, магнитные, радиоактивные и т. п.).

Другим типом ковалентной модификации являются изменения гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, могут быть полностью или частично агликозилированными, например, афукозилированными.

Другой тип ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с различными небелковыми полимерами, в том числе, без ограничений, с различными полиолами, такими как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксикалкены, согласно изложенному в, например, каталоге PEG 2005-2006 от Nektar Therapeutics (доступном на веб-сайте Nektar), патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. В дополнение, как известно из уровня техники, аминокислотные замены можно производить в различных положениях в антителе для облегчения добавления полимеров, таких как PEG. См., например, публикацию заявки на патент США № 2005/0114037A1, включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

В дополнительных вариантах осуществления антитела могут содержать метку. Под «меченым» в данном документе подразумевается, что соединение имеет по меньшей мере один элемент, изотоп или химическое соединение, присоединенные для обеспечения выявления соединения. Как правило, метки подразделяются на три класса: а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы; b) магнитные, электрические, температурные метки и c) цветные или люминесцентные красители; хотя метки также включают ферменты и частицы, такие как магнитные частицы. Предпочтительные метки включают, без ограничений, флуоресцентные комплексы лантаноидов (в том числе европия и тербия) и флуоресцентные метки, включающие, без ограничений, квантовые точки, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люциферовый желтый, Cascade синий,

тexasский красный, красители Alexa, циановые красители и другие, описанные в 6-м издании Molecular Probes Handbook под редакцией Richard P. Haugland, явным образом включенном в данный документ посредством ссылки.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В некоторых вариантах осуществления антитела к LY75, раскрытые в данном документе, конъюгируют с лекарственными средствами с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Как правило, ADC применяют в путях применения в онкологии, где применение конъюгатов антитело-лекарственное средство для локальной доставки цитотоксических или цитостатических средств обеспечивает целенаправленную доставку функциональной части, представляющей собой лекарственное средство, в опухоли, что может обеспечить более высокую эффективность, более низкую токсичность и т. п. Обзор данной технологии приведен в Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carter et al., Cancer J. 14(3):154 (2008) и Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Таким образом, в настоящем изобретении представлены фармацевтические комбинации, содержащие, помимо прочего, антитела к LY75, конъюгированные с лекарственными средствами. Как правило, конъюгирование выполняется путем ковалентного присоединения к антителу, как подробно описано ниже, и обычно основано на применении линкера, часто пептидной связи (которая, как описана ниже, может быть предусмотрена чувствительной или нечувствительной к расщеплению протеазами в целевом участке). В дополнение, как описано выше, связывание структурной единицы линкер-лекарственное средство (LU-D) можно выполнить путем присоединения к цистеиновым остаткам в антителе. Как будет понятно специалистам в данной области, количество функциональных частей, представляющих собой лекарственные средства, на антитело может изменяться в зависимости от условий реакции, и соотношение лекарственное средство:антитело может варьироваться от 1:1 до 10:1. Как будет понятно специалистам в данной области, фактическое количество является средним значением.

Таким образом, антитела к LY75 могут быть конъюгированными с лекарственными средствами. Как описано ниже, лекарственное средство ADC может представлять собой любое количество средств, включающих, без ограничений, представленные цитотоксические средства, такие как химиотерапевтические средства, ингибиторы роста, токсины (например, ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты), или радиоактивные изотопы (иными словами, в радиоconъюгате). В других вариантах осуществления в настоящем изобретении дополнительно представлены способы применения ADC.

Лекарственные средства для применения в настоящем изобретении включают цитотоксические лекарственные средства, в частности, применяемые для терапии рака. Такие лекарственные средства включают, как правило, средства, повреждающие ДНК, антиметаболиты, натуральные продукты и их аналоги. Иллюстративные классы цитотоксических средств включают ингибиторы ферментов, такие как ингибиторы дигидрофолатредуктазы и ингибиторы тимидилатсинтазы, ДНК-интеркаляторы, средства, расщепляющие ДНК, ингибиторы топоизомеразы, лекарственные средства семейства антрациклинов,

лекарственные средства из барвинка, митомицины, блеомицины, цитотоксические нуклеозиды, лекарственные средства семейства птеридинов, диинены, подофиллотоксины, доластатины, майтанзиноиды, индукторы дифференцировки и таксолы.

Представители этих классов включают, например, таксол, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, арабинозид цитозина, мелфалан, лейрозин, лейросидеин, актиномицин, даунорубин, доксорубин, митомицин С, митомицин А, карминомицин, аминоптерин, таллизомин, подофиллотоксин и производные подофиллотоксина, такие как этопозид или фосфат этопозиды, винбластин, винкристин, виндезин, таксаны, в том числе таксол, таксотер, ретиноевую кислоту, масляную кислоту, N8-ацетилспермидин, камптотецин, калихеамицин, эсперамицин, ендины, дуокармицин А, дуокармицин SA, калихеамицин, камптотецин, гемиастерлины, майтанзиноиды (в том числе DM1), монометилауристатин Е (MMAE), монометилауристатин F (MMAF) и майтанзиноиды (DM4) и их аналоги.

Токсины могут применяться в составе конъюгатов антитело-токсин и включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как ризин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), гемиастерлины (WO2004/026293; Zask et al., (2004) J. Med. Chem, 47: 4774-4786). Токсины могут оказывать свои цитотоксические и цитостатические эффекты с помощью механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

Также можно применять конъюгаты антитела к LY75 и одного или более низкомолекулярных токсинов, таких как майтанзиноиды, доластатины, ауристатины, трихотецин, калихеамицин, дуокармицины, пирролбензодиазепины и CC1065, и производные этих токсинов, обладающие активностью токсинов.

Антитело к LY75 предпочтительно конъюгировано с DM1 или DM4, наиболее предпочтительно с DM4. Соединения майтанзина, подходящие для применения в качестве майтанзиноидных функциональных частей, представляющих собой лекарственное средство, хорошо известны в данной области техники и могут быть выделены из естественных источников в соответствии с известными способами, быть получены с помощью методик генной инженерии (см. Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973) или представлять собой майтанзинол и аналоги майтанзинола, получаемые синтетически в соответствии с известными способами. Как описано ниже, лекарственные средства можно модифицировать путем включения в их состав функционально активной группы, такой как тиольная группа или аминогруппа, для конъюгирования с антителом.

Иллюстративные майтанзиноидные функциональные части, представляющие собой лекарственные средства, включают компоненты, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, такие как C-19-дехлорпроизводные (патент США № 4256746) (получаемые посредством восстановления ансамитоцина Р2 алюмогидридом лития); C-20-гидрокс- (или C-20-деметил-) +/-C-19-

дехлорпроизводные (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (получаемые путем деметилирования с помощью *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с помощью LАН) и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (--OCOR), +/-дехлорпроизводные (патент США № 4294757) (получаемые путем ацилирования с помощью хлорангидридов), а также компоненты, которые имеют модификации в других положениях.

Иллюстративные майтанзиноидные функциональные части, представляющие собой лекарственные средства, также включают компоненты, которые имеют такие модификации, как С-9-SH (патент США № 4424219) (получаемые посредством реакции майтанзинола с H₂S или P₂S₅); С-14-алкоксиметил(деметокси/CH₂OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂ОН или CH₂ОАс) (патент США № 4450254) (получаемые из *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (получаемые путем превращения майтанзинола под действием *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделяемые из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (получаемые путем деметилирования майтанзинола под действием *Streptomyces*) и 4,5-дезоксид (патент США № 4371533) (получаемые путем восстановления майтанзинола трихлоридом титана/ЛАН).

Особенную применимость имеют DM1 (раскрытый в патенте США № 5208020, включенном посредством ссылки) и DM4 (раскрытый в патенте США № 7276497, включенном посредством ссылки). См. также ряд дополнительных майтанзиноидных производных и способов в 5416064, WO/01/24763, 7303749, 7601354, USSN 12/631508, WO02/098883, 6441163, 7368565, WO02/16368 и WO04/1033272, все из которых явным образом включены посредством ссылки во всей своей полноте.

ADC, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США №№ 5208020; 5416064; 6441163 и европейском патенте EP 0 425 235 B1, раскрытия которых явным образом включены в данный документ посредством ссылки. В Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996), описаны ADC, содержащие майтанзиноид, обозначенный как DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против рака ободочной и прямой кишки человека. Было обнаружено, что конъюгат является весьма цитотоксическим в отношении культивируемых раковых клеток толстой кишки и демонстрирует противоопухолевую активность в анализе роста опухоли *in vivo*.

В Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описаны ADC, в которых майтанзиноид был конъюгирован с помощью дисульфидного линкера с антителом мыши А7, связывающимся с антигеном в линиях раковых клеток толстой кишки человека, или с другим моноклональным антителом мыши ТА.1, которое связывается с онкогеном HER-2/неу. Цитотоксичность конъюгата ТА.1-майтаниноид исследовали *in vitro* в линии раковых клеток молочной железы человека SK-BR-3, в которой экспрессируется 3 x 10⁵ поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгированное лекарственное средство достигало степени цитотоксичности, сходной с таковой у свободного майтанзиноидного лекарственного средства, которую можно повысить путем увеличения количества молекул майтанзиноидов на молекулу антитела. Конъюгат А7-майтаниноид демонстрировал низкую системную цитотоксичность у мышей.

Для композиций, содержащих множество антител, нагрузка лекарственным средством представлена в виде p , среднего количества молекул лекарственного средства на антитело. Нагрузка лекарственным средством может варьироваться в диапазоне от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на антитело. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело в препарате, полученном посредством реакций конъюгирования, можно охарактеризовать с помощью традиционных способов, таких как масс-спектрометрия, анализ ELISA и HPLC. Также можно определить количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство по p .

В некоторых случаях отделение, очистку однородных конъюгатов антитело-лекарственное средство, где p представляет собой определенное значение, от конъюгатов антитело-лекарственное средство с другой нагрузкой лекарственным средством и установление их характеристик можно осуществлять с помощью таких способов, как обращенно-фазовая HPLC или электрофорез. В иллюстративных вариантах осуществления p равно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или является их дробью.

Получение соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство можно осуществлять согласно любой методике, известной специалисту в данной области. Вкратце, соединения-конъюгаты антитело-лекарственное средство могут содержать антитело к LY75 в качестве структурной единицы-антитела, лекарственное средство и необязательно линкер, который соединяет лекарственное средство и связывающее средство.

Множество различных реакций доступно для ковалентного присоединения лекарственных средств и/или линкеров к связывающим средствам. Это можно осуществить посредством реакции с аминокислотными остатками связывающего средства, например, молекулы антитела, включающими аминокислоты лизина, свободные группы карбоновой кислоты глутаминовой и аспарагиновой кислот, сульфгидрильные группы цистеина и различные функциональные части ароматических аминокислот. Широко применяемым неспецифическим способом ковалентного присоединения является карбодимидная реакция связывания карбоксильной (или амино-) группы соединения с амино- (или карбоксильными) группами антитела. Дополнительно, бифункциональные средства, такие как диальдегиды или имидоэфиры, применялись для связывания аминокислотной группы соединения с аминокислотными группами молекулы антитела.

Также для присоединения лекарственных средств к связывающим средствам доступна реакция образования основания Шиффа. Данный способ включает окисление периодатом лекарственного средства, содержащего гликолевые группы или гидроксигруппы, с образованием, таким образом, альдегида, который затем подвергают реакции со связывающим средством. Присоединение происходит посредством образования основания Шиффа с аминокислотными группами связывающего средства. Изотиоцианаты также можно применять в качестве средств сочетания для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим средствам. Другие методики известны специалисту в данной области и находятся в пределах объема настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления промежуточное соединение, представляющее собой предшественник линкера, подвергают реакции с лекарственным средством в соответствующих условиях. В других вариантах осуществления применяют реакционноспособные группы в лекарственном средстве

и/или промежуточном соединении. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением, или дериватизированное лекарственное средство, затем подвергают реакции с антителом к LY75 по настоящему изобретению в соответствующих условиях.

Будет понятно, что в желаемом соединении также можно производить химические модификации, чтобы сделать реакции этого соединения более пригодными для целей получения конъюгатов по настоящему изобретению. Например, функциональную группу, например, аминогруппу, гидроксильную или сульфгидрильную группу, можно присоединить к лекарственному средству в положении, оказывающем минимальный или допустимый эффект на активность или другие свойства лекарственного средства.

Как правило, соединения-конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат линкерную структурную единицу между структурной единицей-лекарственным средством и структурной единицей-антителом. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется во внутриклеточных или внеклеточных условиях, так что при расщеплении линкера из антитела высвобождается структурная единица-лекарственное средство в соответствующую среду. Например, солидные опухоли, секретирующие определенные протеазы, могут служить в качестве целевых для расщепляемого линкера; в других вариантах осуществления используются именно внутриклеточные протеазы. В еще нескольких других вариантах осуществления линкерная структурная единица не является расщепляемой, и лекарственное средство высвобождается, например, посредством разрушения антител в лизосомах.

В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется с помощью расщепляющего средства, присутствующего во внутриклеточной среде (например, в лизосоме или эндосоме или в кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, расщепляемый под действием внутриклеточного фермента пептидазы или протеазы, в том числе, без ограничений, лизосомальной или эндосомальной протеазы. В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или имеет длину по меньшей мере три аминокислоты или больше.

Расщепляющие средства могут включать, без ограничений, катепсины В и D и плазмин, обо всех из которых известно, что они гидролизуют дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутрь клеток-мишеней (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Пептидильные линкеры расщепляются ферментами, присутствующими в клетках, экспрессирующих LY75. Например, можно применять пептидильный линкер, расщепляемый тиол-зависимой протеазой катепсином В, характеризующейся высоким уровнем экспрессии в раковой ткани (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 52)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в патенте США № 6214345, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и во всех отношениях.

В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, представляет собой линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, патент США № 6214345, в котором описан синтез доксорубицина с помощью линкера Val-Cit).

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер является pH-чувствительным, иными словами, чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизует в кислых условиях. Например, можно применять кислотонеустойчивый линкер, гидролизующийся в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, амид цис-аконитовой кислоты, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т. п.). (См., например, патенты США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального pH, как, например, в крови, но являются нестабильными при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно pH в лизосоме. В определенных вариантах осуществления гидролизующий линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому средству с помощью ацилгидразоновой связи (см., например, патент США № 5622929)).

В еще нескольких других вариантах осуществления линкер расщепляется в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Из уровня техники известен ряд дисульфидных линкеров, в том числе, например, те, которые могут образовываться с применением SATA (N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуола)-, SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., в *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). См. также патент США № 4880935).

В других вариантах осуществления линкер представляет собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

В еще нескольких других вариантах осуществления линкерная структурная единица не является расщепляемой, и лекарственное средство высвобождается посредством разрушения антител. (См. публикацию заявки на патент США № 2005/0238649, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и во всех отношениях).

Во многих вариантах осуществления линкер является саморасщепляющимся. Используемый в данном документе термин «саморасщепляющийся спейсер» относится к бифункциональной химической функциональной части, способной к ковалентному соединению двух разнесенных химических функциональных частей в стабильную молекулу из трех частей. Она будет самопроизвольно отделяться от второй химической функциональной части при расщеплении его связи с первым компонентом. См., например, WO 2007/059404A2, WO06/110476A2, WO05/112919A2, WO2010/062171, WO09/017394, WO07/089149, WO 07/018431, WO04/043493 и WO02/083180, которые относятся к конъюгатам лекарственного средства-расщепляемый субстрат, где лекарственное средство и расщепляемый субстрат необязательно связаны с помощью саморасщепляющегося линкера, и все из которых явным образом включены посредством ссылки.

Линкер часто является практически нечувствительным к действию внеклеточной среды. Как используется в данном документе, «практически нечувствительный к действию внеклеточной среды» применительно к линкеру означает, что в образце соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство расщепляется не более чем приблизительно 20%, 15%, 10%, 5%, 3% или не более чем приблизительно 1% линкеров, если соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме крови).

То, является ли линкер практически нечувствительным к действию внеклеточной среды, можно определить, например, путем инкубирования соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство с плазмой крови в течение предварительно определенного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часов) и последующей количественной оценки количества свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме крови.

В других не взаимоисключающих вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации. В определенных вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, будучи конъюгированным с терапевтическим средством (иными словами, в среде функциональной части линкер-терапевтическое средство соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство, описанного в данном документе). В еще нескольких вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, будучи конъюгированным как с ауристатиновым соединением, так и с антителами к LY75 по настоящему изобретению.

Ряд иллюстративных линкеров, которые можно применять в композициях и способах по настоящему изобретению, описан в WO 2004/010957, публикации заявки на патент США № 2006/0074008, публикации заявки на патент США № 20050238649 и публикации заявки на патент США № 2006/0024317 (каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и во всех отношениях). Предпочтительно, линкер представляет собой SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират).

Нагрузка лекарственным средством представлена в виде r и является средним количеством функциональных частей, представляющих собой лекарственные средства, на антитело в молекуле. Нагрузка лекарственным средством (« r ») может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше функциональных частей (D) на антитело, хотя часто среднее количество является дробным числом или десятичной дробью. Обычно нагрузка лекарственным средством от 1 до 4 является часто применяемой, и от 1 до 2 также является применяемой. ADC по настоящему изобретению включают группы антител, конъюгированных с рядом компонентов-лекарственных средств в количестве от 1 до 20, например, 1-15, 1-10, 2-9, 3-8, 4-7, 5-6. Среднее количество функциональных частей, представляющих собой лекарственные средства, на антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгирования, можно охарактеризовать с помощью традиционных способов, таких как масс-спектропия и анализ ELISA.

Также можно определить количественное распределение ADC по r . В некоторых случаях отделение, очистка однородных ADC, где r представляет собой определенное значение, от ADC с другой нагрузкой

лекарственным средством и установление их характеристик можно осуществлять с помощью таких способов, как электрофорез.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство p может быть ограничено количеством участков присоединения в антителе. Например, если присоединение происходит по тиольной группе цистеина, как в вышеописанных иллюстративных вариантах осуществления, антитело может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, посредством которых может быть присоединен линкер. В определенных вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственным средством, например, $p > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство или утрату клеточной проницаемости для них. В определенных вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC по настоящему изобретению варьируется в диапазоне от 1 до приблизительно 8; от приблизительно 2 до приблизительно 6; от приблизительно 3 до приблизительно 5; от приблизительно 3 до приблизительно 4; от приблизительно 3,1 до приблизительно 3,9; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,8; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,7; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,6; от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,8 или от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,7. В действительности было показано, что для определенных ADC оптимальный показатель количества функциональных частей, представляющих собой лекарственные средства, на антитело может составлять менее 8 и может составлять от приблизительно 2 до приблизительно 5. См. US 2005/0238649 A1 (включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В определенных вариантах осуществления в ходе реакции конъюгирования с антителом конъюгируют функциональные части, представляющие собой лекарственные средства, в количестве, меньшем, чем теоретический максимум. Антитело может содержать, например, лизиновые остатки, не реагирующие с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Антитела обычно содержат немного свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с компонентом-лекарственным средством; в действительности большинство тиольных групп цистеиновых остатков в антителах существуют в качестве дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело можно восстановить с помощью восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в условиях частичного или полного восстановления с образованием реакционноспособных тиольных групп цистеина. В определенных вариантах осуществления антитело подвергают воздействию денатурирующих условий с выявлением реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как в лизине или цистеине.

Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно регулировать различными способами, например, путем: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по сравнению с антителом, (ii) ограничения продолжительности или температуры реакции конъюгирования, (iii) применения условий частичного или ограниченного восстановления для модификации тиольных групп цистеина, (iv) конструирования с

помощью рекомбинантных методик аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы модифицировать количество и положение цистеиновых остатков для регулирования количества и/или положения присоединяемых компонентов линкер-лекарственное средство (как, например, в случае тιο-Mab или тιο-Fab, получаемых согласно раскрытому в данном документе и в WO2006/034488 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте)).

Следует понимать, что в случае, если более чем одна нуклеофильная группа реагирует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, а затем с реагентом функциональной частью, представляющей собой лекарственное средство, то получаемый продукт представляет собой смесь соединений ADC с распределением одной или более функциональных частей, представляющих собой лекарственные средства, присоединенных к антителу. В смеси можно рассчитать среднее количество лекарственных средств на антитело с помощью двойного анализа антител ELISA, специфичного для антитела и специфичного для лекарственного средства. Отдельные молекулы ADC можно идентифицировать в смеси с помощью масс-спектропии и разделить с помощью HPLC, например, хроматографии гидрофобных взаимодействий.

В некоторых вариантах осуществления однородный ADC с единственным значением нагрузки можно выделить из смеси конъюгатов с помощью электрофореза или хроматографии.

Способы определения цитотоксического эффекта ADC

Известны способы определения того, вызывает ли лекарственное средство или конъюгат антитело-лекарственное средство цитостатический и/или цитотоксический эффект в отношении клетки. Как правило, цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата антитело-лекарственное средство можно измерить путем воздействия на клетки млекопитающих, экспрессирующих белок-мишень, конъюгата антитело-лекарственное средство в среде для культуры клеток; культивирования клеток в течение периода от приблизительно 6 часов до приблизительно 5 дней и измерения жизнеспособности клеток. Клеточные анализы *in vitro* можно применять для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспаз) конъюгатом антитело-лекарственное средство.

Для определения того, вызывает ли конъюгат антитело-лекарственное средство цитостатический эффект, можно применять анализ включения тимидина. Например, раковые клетки, экспрессирующие антиген-мишень при плотности 5000 клеток/лунка в 96-луночных планшетах, можно культивировать в течение периода 72 часов и подвергать воздействию 0,5 мкКи ³H-тимидина в течение последних 8 часов 72-часового периода. Включение ³H-тимидина в клетки культуры измеряют в присутствии и в отсутствие конъюгата антитело-лекарственное средство.

Для определения цитотоксичности можно измерять некроз или апоптоз (запрограммированную гибель клеток). Некроз обычно сопровождается повышением проницаемости плазматической мембраны; отеком клетки и разрывом плазматической мембраны. Апоптоз обычно характеризуется пузырением мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение любого из этих эффектов

в отношении раковых клеток указывает на то, что конъюгат антитело-лекарственное средство является применимым в лечении форм рака.

Жизнеспособность клеток можно измерить путем определения в клетке поглощения красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий или ALAMAR™ синий (см., например, Page et al., 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). В таком анализе клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, клетки промывают, и оставшийся краситель, отражающий поглощение клетками красителя, измеряют спектрофотометрически. Связывающийся с белками краситель сульфородамин В (SRB) также можно применять для измерения цитотоксичности (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

В альтернативном случае соль тетразолия, такую как МТТ, применяют в количественном колориметрическом анализе выживания и пролиферации клеток млекопитающих путем определения живых, но не мертвых, клеток (см., например, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

Апоптоз можно оценить количественно путем измерения, например, фрагментации ДНК. Доступны коммерческие фотометрические способы количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких анализов, в том числе TUNEL (в котором выявляют включение меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и анализы на основе ELISA, описаны в Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Апоптоз также можно определить путем измерения морфологических изменений в клетке. Например, как и в случае некроза, утрату целостности плазматической мембраны можно определить путем измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения количества апоптозных клеток был описан в Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Также можно метить клетки красителем для ДНК (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или йодидом пропидия) и наблюдать в клетках конденсацию хроматина и его краевое расположение вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые можно измерить для определения апоптоза, включают, например, конденсацию цитоплазмы, повышенное пузырение мембраны и сжатие клетки.

Наличие апоптозных клеток можно измерить как в закрепленном, так и в «плавающем» компартментах культур. Например, оба компартмента можно собрать путем удаления надосадочной жидкости, трипсинизации закрепленных клеток, объединения препаратов после этапа промывки путем центрифугирования (например, в течение 10 минут при 2000 об./мин.) и выявления апоптоза (например, путем измерения фрагментации ДНК). (См., например, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Эффект терапевтической композиции антитела к LY75 по настоящему изобретению *in vivo* можно оценить в подходящей животной модели. Например, можно применять ксеногенные модели рака, где эксплантаты раковых опухолей или пассированные ксенотрансплантатные ткани вводят животным с ослабленным иммунитетом, таким как «голые» или имеющие SCID мыши (Klein et al., 1997, *Nature*

Medicine 3: 402-408). Эффективность можно измерять с помощью анализов, в которых измеряют ингибирование образования опухоли, регрессии опухоли или метастазирования и т. п.

Терапевтические композиции, применяемые в практическом осуществлении вышеописанных способов, можно составлять в фармацевтические композиции, содержащие носитель, подходящий для желаемого способа доставки. Подходящие носители включают любой материал, который при объединении с терапевтической композицией сохраняет противоопухолевую функцию терапевтической композиции и на который обычно не реагирует иммунная система пациента. Примеры включают, без ограничений, любой из множества стандартных фармацевтических носителей, таких как стерильные фосфатно-солевые буферные растворы, бактериостатическая вода и т. п. (см. в общем плане Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Способы получения антител

Антитела, раскрытые в данном документе, могут быть получены с помощью любого подходящего способа. Такие способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную(выделенные) нуклеиновую(нуклеиновые) кислоту(кислоты), кодирующую антитела. Как будет понятно специалистам в данной области, это можно выполнять рядом способов в зависимости от природы антитела. В случае, когда антитела представляют собой традиционные антитела полной длины, например, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи находятся в таких условиях, что антитело образуется и может быть выделено.

Переменные области тяжелых и легких цепей LY75_A1 раскрыты в данном документе (последовательности как белка, так и нуклеиновой кислоты); как будет понятно в данной области, их можно легко увеличить с получением тяжелых и легких цепей полной длины. Иными словами, при наличии фрагментов ДНК, кодирующих VH- и VK-сегменты, вкратце описанные в данном документе, эти фрагменты ДНК можно подвергнуть дополнительным манипуляциям с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК, например, для превращения генов переменных областей в гены цепей антител полной длины, в гены Fab-фрагментов или в ген scFv. В ходе этих манипуляций образуют функциональную связь фрагмента ДНК, кодирующего VK или VH, с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Термин «функционально связанный», применяемый в данном контексте, подразумевается как означающий, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую VH-область, можно превратить в ген тяжелой цепи полной длины путем образования функциональной связи ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов мышечных константных областей тяжелых цепей известны из уровня техники [см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить путем стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может

представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно представляет собой константную область IgG1 или IgG4. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента можно образовать функциональную связь ДНК, кодирующей V_H, с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область C_{H1} тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую V_L/V_K-область, можно превратить в ген легкой цепи полной длины (а также ген легкой цепи Fab) путем образования функциональной связи ДНК, кодирующей V_L, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи C_L. Последовательности генов мышинных константных областей легких цепей известны из уровня техники [см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить путем стандартной ПЦР-амплификации. В предпочтительных вариантах осуществления константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или лямбда-цепи.

Для получения гена scFv образуют функциональную связь фрагментов ДНК, кодирующих V_H- и V_L/V_K, с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃, так что последовательности V_H и V_L/V_K могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, при этом V_L/V_K и V_H-области соединены гибким линкером [см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554].

Представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, раскрытые в данном документе. Такие полинуклеотиды кодируют как переменные, так и константные области каждой из тяжелой и легкой цепей, хотя другие комбинации также предусмотрены в соответствии с композициями, описанными в данном документе.

Полинуклеотиды могут находиться в форме РНК или ДНК. Полинуклеотиды в форме ДНК, кДНК, геномной ДНК, аналогов нуклеиновых кислот и синтетических ДНК также являются применимыми. ДНК может быть двухнитевой или однонитевой, и в случае однонитевой может представлять собой кодирующую (смысловую) нить или не кодирующую (антисмысловую) нить. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, представленной в данном документе, или может быть другой кодирующей последовательностью, при этом данная последовательность вследствие избыточности или вырожденности генетического кода кодирует те же полипептиды, что и ДНК, представленная в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая(нуклеиновые) кислота(кислоты), кодирующие антитела, раскрытые в данном документе, включены в состав векторов экспрессии, которые могут быть внехромосомными или предназначенными для интеграции в геном клетки-хозяина, в которую их вводят. Векторы экспрессии могут содержать любое количество соответствующих регуляторных последовательностей (в том числе, без ограничений, последовательности для контроля транскрипции и

трансляции, промоторы, сайты связывания рибосомы, энхансеры, точки начала репликации и т. п.) или другие компоненты (селектируемые гены и т. п.), все из которых функционально связаны, как хорошо известно из уровня техники. В некоторых случаях применяют две нуклеиновые кислоты, и каждую помещают в отдельный вектор экспрессии (например, тяжелую цепь в первый вектор экспрессии, легкую цепь во второй вектор экспрессии), или, в альтернативном случае, их можно поместить в один и тот же вектор экспрессии. Специалистам в данной области будет понятно, что конструкция вектора(векторов) экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т. п.

Нуклеиновые кислоты и/или системы экспрессии обычно можно вводить в подходящую клетку-хозяина с получением рекомбинантной клетки-хозяина с помощью любого способа, подходящего для выбранной клетки-хозяина (например, трансформации, трансфекции, электропорации, инфицирования), таким образом, что молекула(молекулы) нуклеиновой кислоты функционально связаны с одним или более элементами контроля экспрессии (например, в векторе, в конструкции, полученной с помощью процессов в клетке, интегрированной в геном клетки-хозяина). Полученную в результате рекомбинантную клетку-хозяина можно выдерживать в условиях, подходящих для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в подходящем отличном от человека животном, в подходящей культуральной среде, дополненной надлежащими солями, факторами роста, антибиотиками, пищевыми добавками и т. п.), в результате чего образуются кодируемый(кодируемые) полипептид(полипептиды). В некоторых случаях тяжелые цепи образуются в одной клетке, а легкие цепи в другой.

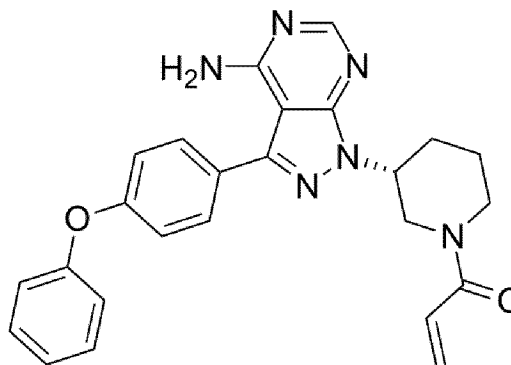
Линии клеток млекопитающих, доступных в качестве хозяев для экспрессии, известны из уровня техники и включают большое количество immortalized линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC), Манассас, Виргиния, в том числе, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HEK 293, клетки NSO, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и множество других линий клеток. Клетки, отличные от клеток млекопитающих, в том числе, без ограничений, клетки бактерий, дрожжей, насекомых и растений, также можно применять для экспрессии рекомбинантных антител. В некоторых вариантах осуществления антитела можно получать в трансгенных животных, таких как коровы или куры.

Общие способы молекулярной биологии, экспрессии, очистки и скрининга антител хорошо известны, см., например, патенты США №№ 4816567, 4816397, 6331415 и 7923221, а также Antibody Engineering под редакцией Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 и 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; и Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения компонент (B) фармацевтической комбинации представляет собой ибрутиниб или его фармацевтически приемлемую соль. Ибрутиниб (Imbruvica®) представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, которое перманентно связывается с тирозинкиназой Брутона (BTK). Он ранее применялся для лечения В-клеточных форм рака, таких как мантийноклеточная лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз и

макроглобулинемия Вальденстрема (форма неходжкинской лимфомы). Структурная и химическая формулы ибрутиниба представлены ниже:

(R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он.



Ибрутиниб продается под торговым наименованием Imbruvica®. Он доступен от Pharmascyclics, Inc. (США).

Фармацевтические композиции

Фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения. Аналогично, в рамках способов по настоящему изобретению компоненты (А) и (В) фармацевтической комбинации можно вводить пациенту одновременно, раздельно или последовательно.

Термин «комбинированный препарат» включает как фиксированные комбинации, так и нефиксированные комбинации.

Термин «фиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты (например, компоненты (А) и (В)) находятся в форме единого средства или дозы. Другими словами, активные ингредиенты присутствуют в единой композиции или составе.

Термин «нефиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты (например, компоненты (А) и (В)), присутствуют в разных средствах или дозах (например, в виде отдельных

композиций или составов), например, в виде набора из частей. Независимые компоненты (А) и (В) (в их желаемых композициях или составах) можно затем вводить отдельно или последовательно, в один и тот же момент времени или в различные моменты времени.

В случае, когда введение осуществляют последовательно, задержка введения второго компонента не должна быть такой, при которой теряется благоприятный эффект, получаемый вследствие применения комбинации. Следовательно, в одном варианте осуществления последовательное лечение включает введение каждого компонента комбинации в течение периода 11 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 10 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 9 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 8 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 7 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 6 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 5 дней. В другом варианте осуществления данный период составляет 4 дня. В другом варианте осуществления данный период составляет 3 дня. В другом варианте осуществления данный период составляет 2 дня. В другом варианте осуществления данный период составляет 24 часа. В другом варианте осуществления данный период составляет 12 часов.

Компоненты (А) и (В) можно вводить в любом порядке, например, вначале компонент (А), а затем компонент (В); или вначале компонент (В), а затем компонент (А).

Соотношение общих количеств компонента (А) и компонента (В), подлежащих введению в комбинированном препарате, может варьироваться, например, с целью удовлетворения потребностей субпопуляции пациентов, подлежащих лечению, или потребностей одного пациента, при этом различные потребности пациентов могут быть обусловлены их возрастом, полом, массой тела и т. д.

Компоненты (А) и (В), присутствующие в одной композиции или в отдельных композициях, могут быть независимо составлены с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтические комбинации по настоящему изобретению также могут содержать по меньшей мере одно другое противоопухолевое средство или противовоспалительное или иммунодепрессивное средство. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном путям применения антител, раскрытых в данном документе.

Как используется в данном документе, «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель предпочтительно подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т. е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, могут быть покрыты материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Компоненты (A) и/или (B) могут быть в форме одной или более фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет необходимую биологическую активность исходного соединения и не вызывает никаких нежелательных токсических эффектов [см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]. Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т. п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксикалановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т. п. Соли присоединения основания включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т. п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т. п.

Фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению или ее часть также могут содержать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических комбинациях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Эти комбинации или их части могут также содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергаторы. Недопущение наличия микроорганизмов можно обеспечивать как с помощью процедур стерилизации, описанных выше, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. п. В дополнение, пролонгированного всасывания инъекционной фармацевтической формы можно добиться путем включения средств, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для

немедленного приема. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среда или средство несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В состав композиций также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированного всасывания инъекционных композиций можно добиться путем включения в композицию средства, замедляющего всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно получить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Дисперсии, как правило, получают путем включения активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), с помощью которых получают порошковую форму активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Количество активного ингредиента, которое можно объединить с материалом носителя с получением единичной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно объединить с материалом носителя с получением единичной лекарственной формы, как правило, будет представлять собой такое количество композиции, которое вызывает терапевтический эффект. Из 100 процентов это количество обычно будет варьироваться в диапазоне от приблизительно 0,01 процента до приблизительно 99 процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 процента до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 процента до приблизительно 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования корректируют для получения оптимального желаемого ответа (например, синергическая комбинация, терапевтический ответ). Например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение некоторого времени, или дозу можно пропорционально понизить или повысить, на что указывают потребности терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и равномерности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве одноразовых доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, совместно с необходимым фармацевтическим носителем. Технические требования к стандартным лекарственным формам по настоящему изобретению обусловлены (а) уникальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, которого следует достичь, и (b) присущими ограничениями в области приготовления такого активного соединения в отношении лечения индивидуумов с чувствительностью, и непосредственно зависят от них.

Для введения антитела к LY75 или антитела к CD20 доза варьируется в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, например, от 0,001 до 50 мг/кг, от 0,005 до 20 мг/кг, от 0,01 до 10 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела получающего ее пациента. Например, дозы могут составлять 0,05 мг/кг массы тела, 0,1 мг/кг массы тела, 0,3 мг/кг массы тела, 0,3 мг/кг массы тела, 0,5 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 2 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 4 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела, 6 мг/кг массы тела, 7 мг/кг массы тела, 8 мг/кг массы тела, 9 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела, 12 мг/кг массы тела, 15 мг/кг массы тела, 20 мг/кг массы тела, 25 мг/кг массы тела, 30 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 0,1-20 мг/кг, 0,5-15 мг/кг, 1-10 мг/кг, 2-8 мг/кг, 3-7 мг/кг, 4-6 мг/кг. Иллюстративный режим лечения включает введение один раз в день, один раз в 2 дня, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 6 недель, один раз в 3 месяца или один раз в три-6 месяцев. Предпочтительные режимы дозирования антитела к LY75 по настоящему изобретению включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела посредством внутривенного введения, при этом антитело принимают с использованием одной из следующих схем дозирования: (i) каждые четыре недели в количестве шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела однократно, а затем 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В некоторых вариантах осуществления дозу антитела к LY75 (например, LY75-DM4) корректируют для достижения концентрации антитела в плазме крови, составляющей от 0,01 до 1,5 нМ или от 0,018 до 1,2 нМ (например, приблизительно 0,018, 0,037, 0,075, 0,15, 0,3, 0,6 или 1,2 нМ). Предпочтительно, дозу антитела к LY75 корректируют для достижения концентрации антитела в плазме крови, составляющей от 0,03 нМ до 0,30 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD20 составляют в растворе с концентрацией 10 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD20 вводят внутривенно в дозе, составляющей 350-400 мг/м², предпочтительно один раз в неделю. В некоторых вариантах

осуществления дозу антитела к CD20 (например, ритуксимаба) корректируют для достижения концентрации антитела в плазме крови, составляющей от приблизительно 2,34 до 150 нМ (например, приблизительно 2,34, 4,68, 9,37, 18,75, 37,5, 75 или 150 нМ). Антитело к CD20 (например, ритуксимаб) можно вводить подкожно в дозе, составляющей приблизительно 1400 мг/23400 единиц. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 200 мг, 400 мг, 600 мг, 800 мг, 1000 мг или 1200 мг. Антитело к CD20 (например, ритуксимаб) можно вводить с одним или более из циклофосфида, гидроксидаунорубина, онковина и преднизона или преднизолон (т. е. в рамках терапии CHOP).

В некоторых вариантах осуществления дозу ибрутиниба корректируют для достижения концентрации в плазме крови, составляющей от приблизительно 15,6 до 1000 нМ (например, приблизительно 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500 или 1000 нМ). В других вариантах осуществления дозу ибрутиниба корректируют для достижения концентрации в плазме крови, составляющей от приблизительно 1,56 до 100 нМ (например, приблизительно 1,5, 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 или 100 нМ). Доза ибрутиниба может составлять приблизительно 560 мг (например, четыре капсулы по 140 мг). Ее можно вводить перорально. В некоторых вариантах осуществления доза ибрутиниба составляет приблизительно 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг.

Предпочтительно, комбинация компонентов (А) и (В) представляет собой синергическую комбинацию. Специалисту в данной области будет понятно, что синергическая комбинация представляет собой комбинацию, в которой эффект комбинации является большим, чем сумма эффектов ее отдельных компонентов. Синергический эффект может быть определен количественно с применением показателя аддитивности Чоу-Талалая (CI) (см. «Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses», Zhao L, et al. Clin Cancer Res. (2004) Dec 1;10(23):7994-8004; и «Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design», Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ., J. Natl. Cancer Inst. (1994) Oct 19;86(20):1517-24). Этот способ с применением показателя аддитивности (CI) основан на уравнении множественного эффекта лекарственного средства, выведенном на основании принципа медианного эффекта закона действующих масс. Он обеспечивает количественное определение сильного синергического эффекта ($CI < 0,3$), синергического эффекта ($CI = 0,3-0,9$), аддитивного эффекта ($CI = 0,9-1,1$) или антагонизма/отсутствия благоприятного эффекта ($CI > 1,1$), и это предоставляет алгоритм для компьютерного программного обеспечения для автоматизированного моделирования комбинаций лекарственных средств. Учитываются как эффективность (значение $D(m)$), так и форма кривой доза-эффект (значение m) каждого лекарственного средства в отдельности и их комбинации. Показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) можно оценить с применением пакета Synergy R (см. «Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies», Chou TC. Leuk. Lymphoma. (2008);49(11):2059-2080, и источники в нем, все из которых конкретно включены в данный документ посредством ссылки). CI комбинации может быть исследован в подходящей линии клеток, например, в линии клеток ABC-DLBCL (такой как TMD8 или HBL1), например, в условиях, используемых в примере 26.

Предпочтительно, фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению представляет собой синергическую комбинацию, в которой показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) составляет меньше 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 или 0,2. Предпочтительно, CI составляет 0,1-0,5, 0,1-0,3 или 0,1-0,2.

В частности, представлен способ лечения рака у пациента, включающий одновременное, последовательное или раздельное введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных синергических количеств компонентов (A) и (B) фармацевтической комбинации по настоящему изобретению. Также представлена фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению для применения при лечении рака, где синергические количества компонентов (A) и (B) вводят пациенту одновременно, раздельно или последовательно для лечения рака. Предпочтительно, количества компонентов (A) и (B) вводят пациенту с целью обеспечить концентрации в плазме крови, раскрытые выше.

Также представлено применение синергических количеств компонентов (A) и (B) фармацевтической комбинации по настоящему изобретению в изготовлении фармацевтической комбинации для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака. Также представлена синергическая фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению для применения в терапии или для применения в качестве лекарственного препарата.

В некоторых способах одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания, и в этом случае доза каждого вводимого антитела входит в указанные диапазоны. Антитело обычно вводят несколько раз. Интервалы между приемами отдельных доз могут соответствовать, например, введению один раз в день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в месяц, каждые три месяца, каждые шесть месяцев или один раз в год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В некоторых способах дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме крови, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл, 5-750 мкг/мл, 10-600 мкг/мл, 15-500 мкг/мл, 20-400 мкг/мл и в некоторых способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

В качестве альтернативы, антитела к LY75 и или антитела к CD20 можно вводить в качестве составов с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота варьируются в зависимости от периода полувыведения антитела из организма пациента. Как правило, наиболее длительный период полувыведения демонстрируют антитела человека, за которыми следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, отличные от человеческих. Доза и частота введения может варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических путях применения относительно низкую дозу вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических путях применения иногда требуется введение относительно высоких доз с относительно короткими интервалами до уменьшения или прекращения прогрессирования заболевания и предпочтительно до тех пор, пока пациент не продемонстрирует частичного или полного уменьшения интенсивности проявления симптомов заболевания. После этого в отношении пациента можно применять профилактический режим.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических комбинациях по настоящему изобретению можно варьировать для того, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

«Терапевтически эффективная доза» антитела к LY75 или антитела к CD20 предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения состояния или потери трудоспособности в связи с поражением заболеванием. Например, для лечения опухолей, опосредованных LY75 или CD20, «терапевтически эффективная доза» предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 20%, на по меньшей мере приблизительно 30%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 40%, на по меньшей мере приблизительно 50%, еще более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 60%, на по меньшей мере приблизительно 70% и даже еще более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 80% или на по меньшей мере приблизительно 90% по сравнению с субъектами, не получающими лечение. Способность соединения к ингибированию роста опухоли можно оценить в животной модельной системе, предсказывающей эффективность в отношении опухолей человека. В альтернативном случае данное свойство композиции можно оценить путем изучения способности соединения к ингибированию роста клеток, при этом такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных практикующему специалисту. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может обеспечивать уменьшение размера опухоли или иным образом уменьшать интенсивность проявления симптомов у субъекта. Средний специалист в данной области будет способен определить такие количества на основании таких факторов, как габариты субъекта, тяжесть симптомов субъекта и конкретная композиция или выбранный путь введения.

Фармацевтическую комбинацию по настоящему изобретению можно вводить посредством одного или более путей введения с помощью одного или более из ряда способов, известных из уровня техники. Компоненты (A) и (B) можно вводить посредством одного того же пути или посредством различных путей. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения антител по настоящему изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение», используемая в данном документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно

посредством инъекции, и включает, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы антителу к LY75 или антителу к CD20 можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или чресслизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно получать с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, в составе с контролируемым высвобождением, в том числе имплантатах, трансдермальных пластырях и микроинкапсулированных системах доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена и винилацетата, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области [см., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных из уровня техники. Например, в предпочтительном варианте осуществления компонент (A) и/или (B) можно вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, применимых в настоящем изобретении, включают: имплантируемую микроинфузионную помпу для дозирования лекарства с контролируемой скоростью, раскрытую в патенте США № 4487603; терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу, раскрытое в патенте США № 4486194; помпу для инфузии лекарства для доставки лекарства с точной скоростью инфузии, раскрытую в патенте США № 4447233; имплантируемый инфузионный прибор с переменным объемом подачи для непрерывной доставки лекарственного средства, раскрытый в патенте США № 4447224; осмотическую систему доставки лекарственных средств, имеющую многокамерные отделения, раскрытую в патенте США № 4439196; и осмотическую систему доставки лекарственных средств, раскрытую в патенте США № 4475196. Эти патенты включены в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В некоторых вариантах осуществления антитела к LY75 и/или антитела к CD20 можно составлять для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения BBB терапевтическими соединениями (при необходимости) их можно составлять, например, в липосомах. В отношении способов получения липосом см., например, патенты США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или более функциональных частей, избирательно транспортируемых в конкретные клетки или органы, что, таким образом, повышает качество целенаправленной доставки

лекарственных средств [см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]. Иллюстративные нацеливающие функциональные части включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016.); маннозиды [Umezawa et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; антитела [P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; рецептор поверхностно-активного белка A [Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Пути применения и способы

Используемый в данном документе термин «субъект» подразумевается как включающий человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не являющихся млекопитающими, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, земноводные и пресмыкающиеся. Предпочтительные субъекты включают пациентов-людей, имеющих нарушения, опосредованные активностью LY75 и/или активностью CD20.

Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, имеющих нарушение, ассоциированное с аномальной экспрессией LY75 и/или экспрессией CD20. С учетом экспрессии LY75 на опухолевых клетках, комбинации и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта с онкогенным нарушением, например, нарушением, характеризующимся наличием опухолевых клеток, экспрессирующих LY75, или при изготовлении лекарственного препарата для лечения такого нарушения, включающего, например, лейкоз, в том числе хронический лимфоцитарный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, неходжкинскую лимфому, в том числе DLBCL, В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Было продемонстрировано, что LY75 интернализируется при связывании с антителом, как проиллюстрировано в примерах 5 и 7 ниже, что, таким образом, обеспечивает применение антител к LY75 в любом механизме действия с нагрузкой, например, в подходе с ADC, в радиоиммуноконъюгате или в подходе ADEPT.

Антитела к LY75, обычно вводимые в виде ADC, можно применять для ингибирования или блокирования функции LY75, для которого, в свою очередь, может быть установлена связь с предупреждением или уменьшением интенсивности определенных симптомов заболевания, что, таким образом, подразумевает LY75 в качестве медиатора заболевания. Этого можно достичь путем приведения образца и контрольного образца в контакт с антителом к LY75 в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом и LY75. В образце и контрольном образце выявляют и сравнивают любые комплексы, образующиеся между антителом и LY75.

Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител и иммуноконъюгатов) *in vivo* и *in vitro* хорошо известны из уровня техники и могут быть выбраны средними специалистами в данной области. Например, композиции антител можно вводить посредством инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы применяемых молекул будут зависеть от возраста и массы тела субъекта, а также концентрации и/или состава композиции антитела.

Как было описано ранее, антитела к LY75 и/или антитела к CD20 можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммунодепрессивным средством. Антитело может быть связано со средством (в виде иммунного комплекса) или может вводиться отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после введения средства или одновременно с ним или можно вводить совместно с применением других известных видов терапии, например, противораковой терапии, например, лучевой терапии. Такие терапевтические средства включают, среди прочих, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, сульфат блеомицина, кармустин, хлорамбуцил, а также циклофосфамид и гидроксимочевина, которые сами по себе являются эффективными только на уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в виде дозы 100 мг/кг один раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в виде дозы 60-75 мг/м² один раз в 21 день. Другие средства, подходящие для совместного введения с антителами по настоящему изобретению, включают другие средства, применяемые для лечения форм рака, например, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака яичника или рака легкого, такие как Avastin®, 5FU и гемцитабин. Совместное введение антител к LY75 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два противораковых средства, действующих посредством различных механизмов, которые обеспечивают достижение цитотоксического эффекта в отношении опухолевых клеток человека. Такое совместное введение может решать проблемы, обусловленные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, которое может сделать их не реагирующими с антителом.

Фармацевтические комбинации по настоящему изобретению также можно вводить вместе с сывороткой крови и/или системой комплемента. Эти композиции могут быть преимущественными, если система комплемента находится в непосредственной близости к антителам. В качестве альтернативы, антитела и систему комплемента или сыворотку крови можно вводить раздельно.

Также в пределах объема настоящего изобретения находятся наборы, содержащие компоненты (A) и (B) вместе с инструкциями по применению. Набор может дополнительно содержать один или более дополнительных реагентов, таких как иммунодепрессивный реагент, цитотоксическое средство или радиотоксичное средство, или одно или более дополнительных антител (например, антитело, обладающее дополняющей активностью, которое связывается с эпитопом на антигене LY75, отличным от такового для первого антитела).

Соответственно, пациентам, получающим лечение с помощью фармацевтических комбинаций по настоящему изобретению, можно дополнительно вводить (до введения антитела, раскрытого в данном

документе, одновременно с ним или после него) другое терапевтическое средство, такое как цитотоксическое или радиотоксичное средство, которое усиливает или увеличивает терапевтический эффект антител.

В других вариантах осуществления субъект может получать дополнительное лечение с помощью средства, которое модулирует, например, усиливает или ингибирует, экспрессию или активность Fcγ или Fcγ-рецепторов, посредством, например, лечения субъекта цитокином. Предпочтительные цитокины для введения в ходе лечения полиспецифической молекулой включают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон-γ (IFN-γ) и фактор некроза опухоли (TNF).

Все литературные источники, упоминаемые в настоящем описании, в том числе, без ограничений, все документы, публикации, патенты, заявки на патенты, презентации, тексты, отчеты, рукописи, брошюры, книги, интернет-публикации, журнальные статьи, периодические издания, информационные бюллетени о продуктах и т. п., настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение литературных источников в данном документе предназначено лишь для обобщения утверждений, сделанных их авторами, и не делается признание того факта, что любой литературный источник составляет часть предшествующего уровня техники, а заявители сохраняют за собой право оспаривать достоверность и значимость упоминаемых литературных источников.

Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, средним специалистам в данной области в свете идей настоящего изобретения будет без труда понятно, что в его отношении можно производить определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема зависимых пунктов формулы изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью следующих примеров, которые не следует толковать как дополнительно ограничивающие.

Пример 1. Получение человеческих моноклональных антител против антигена LY75

В соответствии со стандартными процедурами мышей (XenoMouse IgG1) иммунизировали клетками СНО, трансфицированными LY75 полной длины.

Специфичность антител, выработанных против LY75, исследовали при помощи проточной цитометрии с использованием клеток НЕК293, трансфицированных LY75, и, впоследствии, с использованием клеток НТ29, экспрессирующих LY75. Для того чтобы исследовать способность антител связываться с белком LY75 на клеточной поверхности, антитела инкубировали с клетками, экспрессирующими LY75. Клетки промывали буфером для FACS (DPBS, 2% FBS), центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл разведенного первичного антитела к LY75 (также разведенного в буфере для FACS). Комплекс антитело-линия клеток инкубировали на льду в течение 60 мин. и затем дважды промывали буфером для FACS, описанным выше. Осадок клетка-антитело ресуспендировали в 100 мкл разведенного вторичного антитела (также разведенного в буфере для FACS) и инкубировали на льду в течение 60 мин. на льду. Осадок промывали, как описано выше, и ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS. Образцы

загружали в проточный цитометр BD FACScanto II, и при этом данные анализировали при помощи программного обеспечения BD FACSDiva (результаты не показаны).

Пример 2. Установление структурных характеристик моноклональных антител к LY75

Последовательности кДНК, кодирующие переменные области тяжелых и легких цепей моноклонального антитела LY75_A1, получали при помощи стандартных методик ПЦР и секвенировали при помощи стандартных методик секвенирования ДНК.

Последовательности антитела можно подвергнуть мутагенезу для возвращения к остаткам зародышевого типа в положении одного или более остатков.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжелой цепи LY75_A1 показаны под SEQ ID NO: 3 и 1 соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области легкой цепи LY75_A1 показаны под SEQ ID NO: 4 и 2 соответственно.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина LY75_A1 с известными последовательностями зародышевого типа тяжелой цепи иммуноглобулина человека продемонстрировало, что в тяжелой цепи LY75_A1 используется VH-сегмент из VH 3-15 человека зародышевого типа и JH-сегмент из JH JH4 человека зародышевого типа. Дальнейший анализ последовательности VH LY75_A1 при помощи системы Kabat для определения CDR-области привел к выявлению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, показанных под SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно. Выравнивания последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 VH LY75_A1 с последовательностью VH 3-15 зародышевого типа и JH JH4 зародышевого типа показаны на фигуре 1.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина LY75_A1 с известными последовательностями зародышевого типа легкой цепи иммуноглобулина человека продемонстрировало, что в легкой цепи LY75_A1 используется VK-сегмент из VK O12 человека зародышевого типа и JK-сегмент из JK JK4 человека зародышевого типа. Дальнейший анализ последовательности VK LY75_A1 при помощи системы Kabat для определения CDR-области привел к выявлению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, показанных под SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно. Выравнивания последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 VK LY75_A1 с последовательностями VK O12 зародышевого типа и JH JK4 зародышевого типа показаны на фигуре 2.

Пример 3. Иммуногистохимическое исследование при помощи моноклонального антитела к LY75

При помощи человеческих моноклональных антител, специфичных в отношении LY75, осуществляли иммуногистохимическое исследование с использованием клеточных осадков FFPE HT-29 и A549, матриц с образцами FFPE неходжкинской лимфомы и раковой опухоли поджелудочной железы и свежемороженых опухолевых образцов лимфомы/лейкоза, срезов раковой опухоли яичника, раковой опухоли поджелудочной железы и раковой опухоли молочной железы и матрицы с нормальными тканями.

*Материалы и способы**Материалы*

Ксилолы (X5P-1gal) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

100% этанол HistoPrep (HC-800-1GAL) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

10x цитратный буфер для термического демаскирования эпитопов (AP9003125) от Thermo Scientific, Массачусетс, США.

Ингибитор пероксидазы Thermo Scientific* Pierce* (35000) от Thermo Scientific, Массачусетс, США.

Бессывороточный белковый блокирующий раствор (X0909) от Dako, Калифорния, США.

Вторичное антитело: Fab-специфичное антитело козы к IgG человека, конъюгированное с FITC (109-097-003), от Jackson ImmunoResearch, Пенсильвания, США.

IgG человека ChromPure, целая молекула (09-000-003), от Jackson ImmunoResearch, Пенсильвания, США.

Третичное антитело: антитело мыши к FITC (ab10257) от Abcam, Массачусетс, США.

Очищенный IgG человека для изотипического контроля (1-001A) от R&D Systems, Миннесота, США.

Tween-20 (BP337-100) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Ацетон (BP2403-4) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

HRP-конъюгированный полимер Dual Link EnVision+ для антител мыши и кролика (K4063) от Dako, Калифорния, США.

Набор DAB с 2 растворами (882014) от Invitrogen, Нью-Йорк, США.

Гематоксилин Гарриса (23-245-677) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Заливочная среда Faramount (S302580) от Dako, Калифорния, США.

Тканевые срезы и матрицы приобретали от US Biomax Inc., Мэриленд, США или Origene, Мэриленд, США.

Получение микропрепаратов FFPE - удаление парафина и регидратация

Осуществляли удаление парафина из микропрепаратов FFPE в ксилоле (2 x 3 минуты), а затем осуществляли регидратацию с использованием смеси 1:1 ксилола и 100% этанола (1 x 3 минуты), 100% этанола (2 x 3 минуты), 95% этанола (1 x 3 минуты), 70% этанола (1 x 3 минуты), 50% этанола (1 x 3 минуты), а также водопроводной воды (1 x 3 минуты).

Получение микропрепаратов FFPE - демаскирование антигена (микроволновое излучение)

Антиген LY75 демаскировали с использованием нагревания микроволновым излучением с высокой мощностью до кипения, затем с низкой мощностью в течение 10 минут в 50 мл 1x цитратного буфера в сосуде Коплина. Микропрепараты затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры в течение дополнительных 15 мин., затем промывали водопроводной водой 3 минуты. Каждый тканевой срез/ТМА обводили окружностью при помощи карандаша для создания гидрофобного барьера, и затем микропрепараты 3 раза промывали в PBS в течение 3 минут для каждой промывки.

Получение микропрепаратов FF

Микропрепараты извлекали из хранилища при -80 C, и обеспечивали их сушку при комнатной температуре в вытяжном шкафу в течение 20-30 минут. Микропрепараты фиксировали в течение 10 мин. в ледяном ацетоне при -20 C, затем обеспечивали их сушку в течение 20 мин. в вытяжном шкафу при комнатной температуре. Микропрепараты промывали, и осуществляли их регидратацию в PBS с 3 промывками, каждая в течение 3 мин. Срезы обводили по контуру при помощи карандаша для создания гидрофобного барьера.

Получение комплексов антител

Первичное антитело к LY75 разводили в бессывороточном белковом блокирующем растворе (SFPB) с получением раствора с концентрацией, в 20 раз превышающей необходимую конечную концентрацию (20 мкг/мл для конечной концентрации 1 мкг/мл). Вторичное антитело козы к антигенсвязывающему фрагменту (Fab) иммуноглобулина G человека (IgG) получали аналогичным образом в SFPB для создания раствора с равной концентрацией.

Равные объемы первичного и вторичного антитела объединяли в пробирке с этикеткой, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре, в результате чего получали концентрацию первичного антитела, в 10 раз превышающую необходимую конечную концентрацию (10 мкг/мл для конечной концентрации 1 мкг/мл). Эту смесь разводили 1:5 при помощи SFPB, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, в результате чего получали концентрацию первичного антитела, в два раза превышающую необходимую конечную концентрацию (2 мкг/мл для конечной концентрации 1 мкг/мл).

Для получения конечных окрашивающих комплексов 1% (10 мкг/мкл) раствор IgG человека получали в SFPB, и при этом равный объем добавляли к смеси первичного/вторичного антитела. Эту комбинацию осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут с разведением смеси первичного/вторичного антитела до половины концентрации первичного антитела, и в результате получали необходимую конечную концентрацию первичного антитела (1 мкг/мл).

Иммуноокрашивание

Тем временем активность эндогенной тканевой пероксидазы блокировали посредством инкубирования тканей с ингибитором пероксидазы в течение 5-10 минут при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали в PBS 3 раза в течение 3 минут для каждой промывки. Ткани инкубировали в SFPB в течение 30 минут при комнатной температуре в увлажнительной камере. Конечные окрашивающие комплексы наносили на каждый тканевой срез и/или микроматрицу, и при этом микропрепараты инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали один раз в PBS и один раз в PBST (PBS + 0,125% Tween-20) в течение 3 минут для каждой промывки. Третичное антитело мыши к FITC наносили при концентрации 2 мкг/мл на 30 мин. при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем срезы промывали один раз в PBS и один раз в PBST в течение 3 мин. для каждой промывки. Затем на ткани наносили HRP-конъюгированный полимер Dual Link EnVision+ для антител мыши и кролика, и микропрепараты инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали один раз в PBS, один раз в PBST в течение 3 мин. для каждой промывки. Ткани инкубировали в растворе DAB, полученном в соответствии с инструкциями производителя, при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем микропрепараты один раз промывали проточной водопроводной водой в течение 2 минут и один раз в PBS в течение 3 минут. Осуществляли контрастное окрашивание микропрепаратов при помощи гематоксилина в течение 30 секунд при комнатной температуре и промывали проточной водопроводной водой. Микропрепараты сушили при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем микропрепараты заключали под покровные стекла с использованием заливочной среды Faramount.

Результаты

LY75_A1 характеризовалось положительным результатом при использовании образцов FFPE трижды негативной раковой опухоли молочной железы, причем 77% срезов характеризовались положительным окрашиванием, и 55% демонстрировали интенсивное (+++) окрашивание.

Окрашивание в отношении LY75 нормальных тканей FF, как правило, было в диапазоне от отсутствующего до низкого уровня. Эпителий протоков молочной железы, слюнной железы и поджелудочной железы демонстрировал уровень окрашивания от выраженного низкого до умеренного, и при этом наблюдался низкий уровень положительного окрашивания селезенки. Таким образом, антитела, направленные на LY75, можно использовать в качестве терапевтических средств и диагностических средств при некоторых из исследуемых форм рака и, возможно, других типах рака, характеризующихся экспрессией LY75.

Пример 4. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1, в отношении клеток HT-29

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

Результаты представлены на фигуре 3а, на которой показана субпопуляция антител, которые, как известно, связываются с LY75, что может индуцировать уничтожение клеток HT-29. Это позволяет предположить, что при том, что эти антитела могут связываться с LY75, только некоторые из них проявляют эффективность, будучи конъюгированными с DM1. Затем из субпопуляции выбирали антитела для дальнейшего анализа цитотоксической активности.

Пример 5. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении раковых клеток ободочной и прямой кишки

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3b показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток HT-29. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с токсином (выбранными из примера 1).

Пример 6. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий клеток лимфомы

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминиметре Glomax.

Результаты

На фигуре 3с показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток RAJI. На фигуре 3d показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток Namalwa. На фигуре 3е показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток Karpas 299. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с DM1 и DM4 (выбранными из примера 1).

Пример 7. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток поджелудочной железы

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной

температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3f показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток ВхРС3. На фигуре 3g показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток НирТ4. На фигуре 3h показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток НРАFFII. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с DM1 и DM4 (выбранными из примера 1).

Пример 8. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий клеток, являющихся субстратом хронического лимфоцитарного лейкоза

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3i показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток ЕНЕВ. На фигуре 3j показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток Мес-1. Эти результаты демонстрируют увеличение

цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с DM1 и DM4 (выбранными из примера 1).

Пример 9. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий клеток, являющихся субстратом острого моноцитарного лейкоза

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3k показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток AML-193. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с DM1 и DM4 (выбранными из примера 1).

Пример 10. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток молочной железы

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 31 показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток HCC 70 (ER-отрицательных, PR-отрицательных и Her2-отрицательных). На фигуре 3m показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток HCC 1806 (ER-отрицательных, PR-отрицательных и Her2-отрицательных). На фигуре 3n показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток MDA-MB-468. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 11. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток мочевого пузыря

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3o показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток RT4. На фигуре 3p показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток 5637. На фигуре 3q показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток SW780. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 12. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток головы и шеи

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3г показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток SCC-9. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 13. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток пищевода

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3s показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток OE 19. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 14. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий раковых клеток яичника

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминометре Glomax.

Результаты

На фигуре 3t показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток OVCAR-3. На фигуре 3u показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток SK-OV-3. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 15. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении линий клеток множественной миеломы

Материалы

CellStripper (неферментативное средство для диссоциации клеток) (MT-25-056CI) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI 1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

CellTiter Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ

Осуществляли диссоциацию клеток при помощи CellStripper и подсчет их количества. 5×10^3 клеток/лунка центрифугировали с получением осадка (в случае клеток в суспензии можно использовать большее количество в зависимости от времени удвоения количества клеток, как, например, 10×10^3 клеток/лунка). Осадок ресуспендировали в культуральной среде с получением концентрации 1×10^5 клеток/мл.

50 мкл/лунка суспензии клеток добавляли в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном. Антитела разводили и титровали в 8 точках (титрования с 3-кратными разведениями), соответствующих концентрациям 0-20 нМ (в два раза превышающим исследуемые концентрации). Разведенные антитела или среду (для необработанных образцов) (50 мкл/лунка) добавляли в соответствующие лунки. Избыток среды (200 мкл/лунка) добавляли во внешние ряды и колонки планшета для предотвращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч. при 37 °C.

Планшет извлекали из инкубатора и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Тем временем размораживали раствор CellTiter Glo. Планшет встряхивали и промывали 1 раз с использованием 100 мкл/лунка PBS (в случае клеток в суспензии планшет сначала центрифугировали для осаждения клеток). В каждую лунку добавляли 100 мкл/лунка PBS и 100 мкл CellTiter Glo и тщательно перемешивали с получением смеси. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут и наблюдали посредством микроскопии, чтобы убедиться в том, что произошел эффективный лизис клеток. Затем планшет прочитывали на люминиметре Glomax.

Результаты

На фигуре 3v показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток MOLP-8. На фигуре 3w показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток RPMI8226. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител.

Пример 16. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях Raji

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток Raji лимфомы Беркитта.

Иммунодефицитным мышам с SCID подкожно инокулировали опухолевые клетки Raji (лимфомы Беркитта человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 3-6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 129-132 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)); группа 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг), группа 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Вторую дозу вводили спустя одну неделю. Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии, когда их опухоли достигали конечной точки объема опухоли 2000 мм³ или через 60 дней, в зависимости от того, что происходило первым. Эффективность определяли, исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до достижения конечной точки (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых была достигнута конечная точка, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4a показано, что каждый из LY75_DM1 и LY75_DM4 продемонстрировал значительную противоопухолевую активность и значительно пролонгированное выживание в ксенотрансплантатной модели лимфомы Беркитта из клеток Raji на мышах с SCID по сравнению с контролями; тем не менее, дозы 5 мг/кг LY75_DM4 были значительно более эффективными, чем дозы 10 мг/кг LY75_DM1, в результате чего у 5 из 6 мышей наблюдалась полная, но временная регрессия опухоли. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клинически благоприятный эффект при лечении раковых пациентов-людей с неходжкинской лимфомой.

Пример 17. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях Namalwa

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток Namalwa лимфомы Беркитта.

Иммунодефицитным мышам с SCID подкожно инокулировали опухолевые клетки Namalwa (лимфомы Беркитта человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 114 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)); группа 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг), группа 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии, когда их опухоли достигали конечной точки объема опухоли 2000 мм³ или через 60 дней, в зависимости от того, что происходило первым. Эффективность определяли, исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до достижения конечной точки (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых была достигнута конечная точка, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4b показано, что каждый из LY75_DM1 и LY75_DM4 продемонстрировал значительную противоопухолевую активность и пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели лимфомы Беркитта из клеток Namalwa на мышах с SCID по сравнению с контролями; тем не менее, доза 5 мг/кг LY75_DM4 была значительно более эффективной, чем доза 10 мг/кг LY75_DM1, вызывая кратковременное уменьшение объема опухоли. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клинически благоприятный эффект при лечении раковых пациентов-людей с неходжкинской лимфомой.

Пример 18. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях рака поджелудочной железы

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток HPAFII аденокарциномы поджелудочной железы.

Иммунодефицитным бестимусным голым мышам подкожно инокулировали опухолевые клетки HPAFII (аденокарциномы поджелудочной железы человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и

мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя ~ 114 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)); группа 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг), группа 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли три раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии, когда их опухоли достигали конечной точки объема опухоли 2000 мм³ или через 90 дней, в зависимости от того, что происходило первым. Эффективность определяли, исходя из эффекта обработки в отношении объема опухоли и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы опухолей у контрольных мышей, обработанных наполнителем, и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4с показано, что LY75_DM1 и LY75_DM4 проявляли значительную и сходную по силе противоопухолевую активность, и при этом наблюдалось пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели HPAFII на голых мышах по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клинически благоприятный эффект при лечении пациентов-людей с раком поджелудочной железы.

Пример 19. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях рака мочевого пузыря

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток SW780 карциномы мочевого пузыря человека.

Иммунодефицитным бестимусным голым мышам подкожно инокулировали опухолевые клетки HPAFII (аденокарциномы поджелудочной железы человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя ~ 114 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)); группа 2 (LY75_DM1; 1 мг/кг), группа 3 (LY75_DM1; 2,5 мг/кг), группа 4 (LY75_DM1; 5 мг/кг), группа 5 (LY75_DM4; 1 мг/кг), группа 6 (LY75_DM4; 2,5 мг/кг), группа 7 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 8 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг). Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли три раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии, когда их опухоли достигали конечной точки объема опухоли 2000 мм³ или через 90 дней, в зависимости от того, что происходило первым. Эффективность определяли, исходя из эффекта обработки в отношении объема

опухоли и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы опухолей у контрольных мышей, обработанных наполнителем, и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4d показано, что LY75_DM1 и LY75_DM4 проявляли значительную и сходную по силе противоопухолевую активность, и при этом наблюдалось пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели SW780 на голых мышах по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клинически благоприятный эффект при лечении пациентов-людей с раком мочевого пузыря.

Пример 20. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток MDA-MB-468.

Иммунодефицитным бестимусным голым мышам подкожно инокулировали опухолевые клетки MDA-MB-468 (трижды негативной аденокарциномы молочной железы человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и мышей распределяли в семь групп обработки по 10 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 167 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; 20 mM сукцинат натрия, pH 5,0, 6% трегалоза, 0,04% полисорбат); группа 2 (LY75_DM1; 5 мг/кг), группа 3 (LY75_DM1; 10 мг/кг), группа 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 5 (LY75_DM4; 2,5 мг/кг), группа 6 (LY75_DM4; 1 мг/кг), группа 7 (изотипический контроль-DM4; 5 мг/кг). Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии через 82 дня после инокуляции опухоли. Эффективность определяли, исходя из противоопухолевой активности (среднее значение размера опухоли в группе обработки/среднее значение размера опухоли в контрольной группе x 100) и увеличения среднего значения времени до достижения конечной точки (TTE) у мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы пяти самых больших опухолей от контрольных мышей, обработанных наполнителем, в день 71 после инокуляции и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4e показано, что каждый из LY75_DM1 и LY75_DM4 демонстрировал существенную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-468 на голых мышах по сравнению с контролями. При использовании LY75_DM4 наблюдали зависимость от дозы активность, при

этом 2,5 и 5 мг/кг характеризовались намного более сильным эффектом, чем 1 мг/кг. При 5 мг/кг LY75_DM1 и LY75_DM4 характеризовались сходной эффективностью. Длительные регрессии среднего объема опухоли наблюдали в случае LY75_DM1 при 10 и 5 мг/кг и LY75_DM4 при 5 и 2,5 мг/кг. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с трижды негативным раком молочной железы.

Пример 21. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в ксенотрансплантатных моделях рака ободочной и прямой кишки

Эффективность LY75_DM1 и LY75_DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток COLO205 аденокарциномы ободочной и прямой кишки.

Иммунодефицитным бестимусным голым мышам подкожно инокулировали опухолевые клетки COLO205 (аденокарциномы ободочной и прямой кишки человека). Опухолям давали возможность сформироваться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 117 мм³ на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах: группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)); группа 2 (LY75_DM1; 10 мг/кг), группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг), группа 4 (LY75_DM4; 5 мг/кг), группа 5 (изотипический контроль-DM4; 5 мг/кг). Вторую дозу вводили через двенадцать дней после первой. Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных эффектов, и опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей подвергали эвтаназии, когда их опухоли достигали конечной точки объема опухоли 1000 мм³ или через 60 дней, в зависимости от того, что происходило первым. Эффективность определяли, исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до достижения конечной точки (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых была достигнута конечная точка, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты

На фигуре 4f показано, что LY75_DM1 и LY75_DM4 демонстрировали сходную умеренную противоопухолевую активность и пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели аденокарциномы ободочной и прямой кишки из клеток COLO205 на голых мышах по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми, и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75_DM1 и LY75_DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с раком ободочной и прямой кишки.

Пример 22. Токсичность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с DM4, в отношении макак-крабоедов

Шесть самцов обезьян распределяли в исследовании по 2 обезьяны/группа. Наполнитель (PBS), LY75_DM4 (расщепляемый) или LY75_DM1 (нерасщепляемый) вводили два раза (в день 1 и день 29) посредством внутривенной инфузии продолжительностью 15 минут при 0 мг/кг/доза (PBS, наполнитель), 5 мг/кг/доза (LY75_DM4, расщепляемый) или 10 мг/кг/доза (LY75_DM1, нерасщепляемый). Отбирали образцы крови для токсикокинетических исследований перед началом введения доз (день 1) и через 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 дней после каждой дозы. Отбирали образцы крови для клинико-патологических анализов перед началом введения доз (день 1) и через 1, 3, 7, 14, 21 и 28 дней после каждой дозы (момент времени 28 дней после 1-й дозы также использовали в качестве момента времени перед введением дозы для 2-й дозы). Всех исследуемых животных подвергали эвтаназии, и проводили вскрытие после последнего забора крови в день 57. Выделяли плазму крови, отделенную из каждого образца крови, замораживали и транспортировали в Oxford BioTherapeutics, Inc. для анализа в отношении концентрации ADC при помощи ELISA.

Наблюдаемые клинико-патологические проявления, связанные с обработкой, включали слабовыраженную регенеративную анемию и временные уменьшения количества клеток лейкоцитарного профиля крови, наиболее существенные для количества нейтрофилов. Анемию наблюдали как у животных, обработанных 5 мг/кг LY75_DM4, так и у одного из двух животных, обработанных 10 мг/кг LY75_DM1. Тяжелую нейтропению с максимальным снижением количества нейтрофилов через одну неделю после введения дозы и быстрое восстановление их количества наблюдали у всех животных; при этом максимальное снижение абсолютного количества нейтрофилов было меньшим у животных, обработанных LY75_DM4. Не наблюдали эффектов в отношении параметров коагуляции АРТТ и РТ, связанных с исследуемым препаратом. Изменения химического состава сыворотки крови включали временное повышение уровня AST, CK, LDH (у 1 из 2 животных в каждой группе обработки) и глобулина после введения 5 мг/кг LY75_DM4 и 10 мг/кг LY75_DM1. Кроме того, наблюдали временное повышение уровня фермента ALT, специфичного для печени, только у животных, обработанных LY75_DM4. Небольшая продолжительность и/или величина повышений параметров химического состава сыворотки крови позволяли предположить, что они не относились к нежелательным явлениям. При анализе мочи отсутствовали наблюдаемые проявления, связанные с исследуемым препаратом. В ходе обследования при вскрытии после 4-недельного периода восстановления отсутствовали наблюдаемые макропатологические проявления, связанные с обработкой, или изменения абсолютных и относительных значений массы органов. Наблюдаемые гистопатологические проявления только для щитовидной железы (изменение морфологических характеристик коллоидного содержимого в фолликулах) и почки (расширенные каналы во внешнем слое коркового вещества) классифицировали как характеризующиеся минимальной тяжестью; не связанные с изменениями других исследуемых параметров; а также не относящиеся к нежелательным явлениям и имеющие минимальную токсикологическую значимость. Заключение. Обработка повторными дозами при двух дозах - 5 мг/кг LY75_DM4 или 10 мг/кг LY75_DM1 хорошо переносилась макаками-крабоедами. Все наблюдаемые

проявления токсичности, связанной с обработкой, были обратимыми после 4-недельного периода восстановления.

Пример 23. Установление характеристик эпитопа для LY75 A1 при помощи анализа конкурентного связывания с использованием сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)

Способ

Клетки COLO205 (ATCC, № в каталоге CCL-222) отделяли от матрасов для тканевых культур при помощи CellStripper (Cellgro, № в каталоге MT-25-056CI). Клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS (PBS + 2% FBS), нейтрализовали питательной средой и подсчитывали. Клетки высевали при 50000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с V-образным дном лунок. Клетки промывали один раз буфером для FACS (PBS (Fisher, № в каталоге SH30028-03) + 2% FBS). Добавляли mAb к LY75 (выбранное из примера 1) или LY75_A1 в лунки при исходной концентрации 250 нМ, и осуществляли 3-кратные серийные разведения, и вносили в соответствующие лунки в течение 45 минут на льду. Исследуемое содержимое лунок, для которого требовались один или несколько этапов окрашивания, при необходимости выдерживали в буфере для FACS для обеспечения одновременного завершения заключительного окрашивания для всех исследуемых условий. Содержимое двух лунок с буфером для FACS оставляли неокрашенным в качестве контролей.

После инкубирования с блокирующим антителом клетки два раза промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем mAb к LY75, конъюгированное с MCC-DM1 (1 нМ), и инкубировали на льду в течение 45 минут. Клетки промывали, как описано выше, и ресуспендировали в буфере для FACS с добавлением 1 мкг/мл антитела мыши к майтанзину, и инкубировали на льду в течение 45 минут. Клетки промывали, как описано выше, и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем 2 мкг/мл антитела козы к каппа-цепи Ig мыши, конъюгированного с RPE. Клетки инкубировали на льду в течение 45 минут, затем промывали, как описано выше. Клетки ресуспендировали в буфере для FACS при 200 мкл на лунку. Среднее значение интенсивности флуоресценции для каждого образца определяли при помощи проточного цитометра Guava EasyCyte Plus HT (форматы 96-луночного планшета), и необработанные данные анализировали при помощи Guava Cytosoft.

Результаты

На фигуре 5a показано, что блокирование с использованием mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1, приводило к снижению связывания mAb к LY75. Анализ связывания LY75_A1 с клетками COLO205 продемонстрировал, что LY75_A1 неспособно блокировать связывание mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1 (см. фигуру 5b). Таким образом, можно определить, что mAb к LY75 и LY75_A1 не являются конкурирующими антителами, и при этом LY75_A1 распознает отличный и уникальный эпитоп LY75 по сравнению с другими антителами к LY75.

Пример 24. Установление характеристик эпитопа для LY75 A1 при помощи микроматричного анализа пептидов

Способ

Микроматричный анализ пептидов осуществляли в LC Sciences, Хьюстон, Техас, при этом, вкратце, способ включал следующие этапы: синтезировали смежные 8-мерные пептиды белка LY75, перекрывающиеся по одной аминокислоте, охватывающие остатки 216-1666 белка LY75 полной длины, и иммобилизовали на микроматричном чипе. Чип содержал три панели, так что эксперимент проводили в трех повторностях. Микроматрицу исследовали с использованием LY75_A1 для идентификации пептидов, с которыми связывалось антитело. Анализ связывания проводили при следующих условиях:

микроматрицу, содержащую смежные пептиды в трех повторностях, промывали 1 мл буфера для связывания при 4°C в течение 20 мин. Затем ее инкубировали с 1 мкг/мл LY75_A1 в буфере для связывания (pH 7,0) при 4°C в течение 2 ч. Матрицу еще раз промывали 0,5 мл промывочного буфера при 4°C в течение 30 мин., затем инкубировали с 25 нг/мл конъюгата антитела к IgG человека с Alexa 647 в буфере для связывания (pH 7,0) при 4°C в течение 1 ч. Матрицу еще раз промывали 0,5 мл промывочного буфера при 4°C в течение 30 мин.

Затем матрицу сканировали при 635 нм и PMT 500 и регистрировали интенсивность сигнала. Пептид классифицировали как выявляемый, если он присутствовал по меньшей мере в 2/3 допустимых дублирующих проб. Среднюю интенсивность сигнала для повторностей представляли как конечную интенсивность сигнала.

Результаты

Как показано на фигуре 6, антитело LY75_A1 характеризовалось специфичным связыванием с рядом пептидов, расположенных на матрице. Максимальный уровень сигнала, наблюдаемый для связывания с LY75_A1, составлял 25000 (шкала 1-65535), при этом средний уровень сигнала для всех пятен на матрице составлял приблизительно 885. Интенсивность сигнала, равную 3000, устанавливали в качестве точки отсечения фона, обусловленного неспецифичным связыванием. Исходя из наблюдаемого уровня интенсивности сигнала связывания с антителом, идентифицировали потенциальные последовательности, образующие эпитоп для LY75_A1. Эти области показаны на фигурах 6а – 6j и под SEQ ID NO: 22-31.

Пример 25. Анализ пептидов по методу соосаждения с использованием LY75 A1*Способ**1.1 Анализ по методу соосаждения*

Рекомбинантный белок LY75 расщепляли путем триптического протеолиза белка, связанного с гранулами (Promega, США). Полученные в результате расщепления пептиды извлекали при помощи колонки для захвата C18 (Thermo Fisher Scientific). Затем очищенные пептиды инкубировали с 200 мкл гранул с белком А, сшитым с антителом LY75A1, в течение ночи при 4°C. На следующий день отбирали несвязанные пептиды, и при этом гранулы два раза промывали 1 мл PBS. Пептиды, связанные с

антителом, элюировали из гранул путем их нагревания при 90°C в 100 мкл PBS в течение 5 минут. Повторяли этот этап элюирования.

1.2 Масс-спектрометрия

Образцы анализировали при помощи жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с использованием системы Waters nanoACQUITY UPLC, оснащенной колонкой nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18, 75 мкм x 250 мм (186003545) и LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Пептиды элюировали с использованием градиента с увеличением количества ацетонитрила от 3% до 35% при скорости 300 нл/мин. в течение 120 мин. Получали масс-спектры в режиме полного сканирования при разрешающей способности 60000 в диапазоне массы 400-2000 масса/заряд с использованием Orbitrap. В каждом цикле отбирали двадцать пептидов, характеризующихся наибольшей интенсивностью, для сканирований посредством CID MS/MS в линейной ионной ловушке с нанораспылительным источником ионов, установленным на приборе.

1.3 Анализ аминокислотной последовательности пептида

Необработанные данные, полученные с использованием LTQ Orbitrap Velos, обрабатывали при помощи программного обеспечения Mascot (Matrix Science), в котором используется алгоритм Mowse (Curt Biol. 1993 Jun 1;3(6):327-3) для выведения последовательностей аминокислот, исходя из набора пиков, путем поиска по базе данных последовательностей, состоящей из Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) и SwissProt (<http://www.uniprot.org>) вместе с последовательностями белков-контаминантов. Критерии идентификации пептидов включали расщепление трипсином, до 2 отсутствующих сайтов расщепления и различные биологические и химические модификации (окисленный метионин, модификация цистеина с помощью MMTS или йодацетамида и фосфорилирование серина, треонина и тирозина). Пептиды, которым присваивали ранг 1 при ожидаемом значении 0,05% или меньше, степени совпадения спектров 28 или больше, загружали в базу данных OGAP.

1.4 Распознавание пептидов, ассоциированных с LY75

В способе идентификации LY75 использовали пептидные последовательности, полученные экспериментальным путем при помощи масс-спектрометрии, как описано выше, встречающихся в природе белков человека для идентификации и упорядочивания кодирующих экзонов в опубликованной геномной последовательности человека. Эти экспериментально определенные последовательности сравнивали с базой данных OGAP®, которая была скомпилирована путем обработки и интеграции масс пептидов, сигнатур пептидов, EST и общедоступных данных геномных последовательностей, как описано в международной патентной заявке WO2009/087462.

Результаты

Результаты анализа пептидов по методу соосаждения с использованием антитела LY75_A1 показаны в таблице 1 ниже и на фигуре 7. Пептиды, которые были идентифицированы при обоих

элюированиях пептидов 1a и 1b в анализе по методу соосаждения и в микроматричном анализе, считались наиболее вероятными кандидатами для образования эпитопа.

Таблица 1. Сравнение экспериментов с микроматричным анализом пептидов и соосаждением пептидов

SEQ ID NO:	Пептид, идентифицированный при помощи микроматричного анализа	Пептид, идентифицированный при помощи анализа по методу соосаждения
	Область 1 (аминокислоты 609-618)	-
	Область 2 (аминокислоты 651-662)	-
46	Область 3 (аминокислоты 761-780)	GWHFYDDR (765-772)
47	Область 4 (аминокислоты 883-901)	ISEWPIDDHFTYSR(877-890)
48		FPVTFGEECLYMSAK(896-910)
49	Область 5 (аминокислоты 1029-1040)	ELTYSNFHPLLVSGR (1030-1044)
50	Область 6 (аминокислоты 1077-1093)	HFVSLCQK (1084-1091)
51	Область 7 (аминокислоты 1107-1118)	QTLQNASETVK (1099-1109)
	Область 8 (аминокислоты 1368-1378)	-
	Область 9 (аминокислоты 1518-1528)	-
	Область 10 (аминокислоты 1535-1554)	-

В таблице 1 показано, что ряд перекрывающихся областей пептидов LY75 был идентифицирован как в микроматричном анализе пептидов, так и при обоих элюированиях 1a и 1b в анализе пептидов по методу соосаждения. Считалось, что эти области с наибольшей долей вероятности содержат эпитоп, распознаваемый антителом LY75_A1, поскольку они связываются с LY75_A1 при исследовании с помощью обеих используемых методик.

Пример 26

Определенное количество активированных В-клеток из линий клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ABC-DLBCL) (т. е. линий клеток TMD8 и HBL1) подвергали воздействию возрастающих доз LY75_DM4 (т. е. 0,018 – 0,037 – 0,075 – 0,15 – 0,3 – 0,6 – 1,2 нМ) либо

отдельно, либо в комбинации с увеличивающимися дозами ритуксимаба (2,34 – 4,68 – 9,37 – 18,75 – 37,5 – 75 – 150) или ибрутиниба (15,6 – 31,2 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 нМ) в течение 72 часов. За этим следовал анализ с использованием МТТ [3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолбромид].

Показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) оценивали с применением пакета Synergy R (Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies. Chou TC. Leuk. Lymphoma. 2008;49(11):2059-2080). Он обеспечивает количественное определение сильного синергического эффекта ($< 0,3$), синергического эффекта (0,3-0,9), аддитивного эффекта (0,9-1,1) или антагонизма/отсутствия благоприятного эффекта ($> 1,1$).

На фигурах 8А-В показаны синергические эффекты, наблюдаемые между LY75_DM4 и ритуксимабом. На фигуре 9 показаны синергические эффекты, наблюдаемые между LY75_DM4 и ибрутинибом. Дополнительные данные показаны в таблицах 2, 3 и 4 ниже.

Таблица 2. Показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) для различных доз LY75_DM4 в комбинации с ритуксимабом в отношении трех линий клеток TMD8 ABC-DLBCL

№	Ритуксимаб (нМ)	LY75_DM4 (нМ)	CI
1	2,3438	0,01875	17,124
2	2,3438	0,075	0,225
3	2,3438	0,15	0,346
4	2,3438	0,3	0,583
5	2,3438	0,6	1,165
6	2,3438	1,2	2,514
7	2,3438	0,0375	0,145
8	4,6875	0,01875	1,499
9	4,6875	0,0375	0,147
10	4,6875	0,075	0,216
11	4,6875	0,15	0,346
12	4,6875	0,3	0,628

13	4,6875	0,6	1,165
14	4,6875	1,2	2,514
15	9,375	0,01875	2,918
16	9,375	0,0375	0,144
17	9,375	0,075	0,219
18	9,375	0,15	0,332
19	9,375	0,3	0,583
20	9,375	0,6	1,025
21	9,375	1,2	2,514
22	18,75	0,01875	0,8
23	18,75	0,0375	0,145
24	18,75	0,075	0,213
25	18,75	0,15	0,346
26	18,75	0,3	0,628
27	18,75	0,6	1,165
28	18,75	1,2	2,514
29	37,5	0,01875	11,427
30	37,5	0,075	0,216
31	37,5	0,15	0,332
32	37,5	0,3	0,583
33	37,5	0,6	1,165
34	37,5	1,2	2,655
35	37,5	0,0375	0,151

36	75	0,01875	0,216
37	75	0,0375	0,147
38	75	0,075	0,209
39	75	0,15	0,332
40	75	0,3	0,628
41	75	0,6	1,165
42	75	1,2	2,514
43	150	0,01875	45,466
44	150	0,0375	0,152
45	150	0,075	0,209
46	150	0,15	0,332
47	150	0,3	0,628
48	150	0,6	1,257
49	150	1,2	2,770

Таблица 3. Показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) для различных доз LY75_DM4 в комбинации с ритуксимабом в отношении трех линий клеток HBL-1 ABC-DLBCL

№	Ритуксимаб (нМ)	LY75_DM4 (нМ)	CI
1	2,3438	0,0188	0,534
2	2,3438	0,0750	0,958
3	2,3438	0,1500	0,603
4	2,3438	0,3000	0,509

5	2,3438	0,6000	0,454
6	2,3438	1,2000	0,817
7	2,3438	0,0375	0,413
8	4,6875	0,0188	0,568
9	4,6875	0,0375	0,837
10	4,6875	0,0750	0,919
11	4,6875	0,1500	0,635
12	4,6875	0,3000	0,580
13	4,6875	0,6000	0,501
14	4,6875	1,2000	0,908
15	9,375	0,0188	0,249
16	9,375	0,0375	1,576
17	9,375	0,0750	0,717
18	9,375	0,1500	0,439
19	9,375	0,3000	0,618
20	9,375	0,6000	0,501
21	9,375	1,2000	0,908
22	18,75	0,0188	0,787
23	18,75	0,0375	0,497
24	18,75	0,0750	0,562
25	18,75	0,1500	0,545
26	18,75	0,3000	0,510
27	18,75	0,6000	0,366

28	18,75	1,2000	0,817
29	37,50	0,0375	0,734
30	37,50	0,0750	0,548
31	37,50	0,0188	0,543
32	37,50	0,1500	0,465
33	37,50	0,3000	0,476
34	37,50	0,6000	0,324
35	37,50	1,2000	0,648
36	75	0,0188	0,442
37	75	0,0375	1,578
38	75	0,0750	0,432
39	75	0,1500	0,493
40	75	0,3000	0,383
41	75	0,6000	0,409
42	75	1,2000	0,908
43	150	0,0188	0,680
44	150	0,0375	0,640
45	150	0,0750	0,911
46	150	0,1500	0,498
47	150	0,3000	0,355
48	150	0,6000	0,366
49	150	1,2000	0,817

Таблица 4. Показатель аддитивности Чоу-Талалая (CI) для различных доз LY75_DM4 в комбинации с ибрутинибом в отношении трех линий клеток HBL-1 ABC-DLBCL

№	Ибрутиниб (нМ)	LY75_DM4 (нМ)	CI
1	1,5625	0,01875	0,481
2	1,5625	0,0375	0,627
3	1,5625	0,075	0,862
4	1,5625	0,15	0,360
5	1,5625	0,3	0,287
6	1,5625	0,6	0,270
7	1,5625	1,2	0,343
8	3,125	0,01875	0,411
9	3,125	0,0375	0,358
10	3,125	0,075	0,461
11	3,125	0,15	0,287
12	3,125	0,3	0,251
13	3,125	0,6	0,246
14	3,125	1,2	0,394
15	6,25	0,01875	0,204
16	6,25	0,0375	0,219
17	6,25	0,075	0,275
18	6,25	0,15	0,226
19	6,25	0,3	0,216

20	6,25	0,6	0,222
21	6,25	1,2	0,343
22	12,5	0,01875	0,205
23	12,5	0,0375	0,152
24	12,5	0,075	0,287
25	12,5	0,15	0,217
26	12,5	0,3	0,228
27	12,5	0,6	0,222
28	12,5	1,2	0,343
29	25	0,01875	0,152
30	25	0,0375	0,183
31	25	0,075	0,202
32	25	0,15	0,199
33	25	0,3	0,193
34	25	0,6	0,222
35	25	1,2	0,343
36	50	0,01875	0,374
37	50	0,0375	0,473
38	50	0,075	0,287
39	50	0,15	0,192
40	50	0,3	0,194
41	50	0,6	0,246
42	50	1,2	0,394

43	100	0,01875	0,715
44	100	0,0375	0,748
45	100	0,075	0,457
46	100	0,15	0,187
47	100	0,3	0,195
48	100	0,6	0,222
49	100	1,2	0,394

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	A. к. A1_VH	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCTIFGVVSFDYWGQGTLVTVSS
2	A. к. A1_VL	DVQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISDYLSWYQQRPGKAPNLLI YAASNLKTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQSYRSPW TFGQGTKVEIKR
3	Нуклеотиды A1_VH	gaggtgcagctggtgagctctgggggaggttggttaagccgggggggtcccttagactctctgtgcagcc tctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgccaggtccagggaaggggctggagtgggttg gccgtattaaaagcaaaactgatggtgggacacagactacgctgcacccgtgcaaggcagattcaccatctc aagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacagccgtgtattac tgtacgattttggagtggtagctttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctctca
4	Нуклеотиды A1_VL	gacgtccagatgaccagctctccatctccctgtctgcatctgttgagacagagtcaccatcacttgccgggc aagtcagagcattagcgactatttaagttggtatcagcagagaccagggaagcccctaacctcctgatctatg ctgcatccaatttaaagactgggtcccatcaagggttcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctacca tcagcactctgcaacctgaagattttgcaacgtactactgtcaacagagttacaggtccccgtggacgttcggcc aagggaaccaaggtggaaatcaaacga
5	A. к. A1_VH_CDR1	NAWMS
6	A. к. A1_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVQG
7	A. к. A1_VH_CDR3	FGVVSFDY
8	A. к. A1_VL_CDR1	RASQISDYLS
9	A. к. A1_VL_CDR2	AASNLKT
10	A. к. A1_VL_CDR3	QSYRSPWT

11	VH313- 15/D41411	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCTTTT
12	JH4	YFDYWGQGLTVTVSS
13	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYS
14	JK1	WTFGQGTKVEIKR
15	LY75 (DEC- 205)	MRTGWATPRRPAGLLMLLFWFFDLAEPSTGRAANDPFTIVHGNTGKCI KPVYGWIVADDCDEDEDKLWKWVSQHRFLHLSQKCLGLDITKSVN ELRMFSCDSSAMLWWKCEHSLYGAARYRLALKDGHGTAISNASDV WKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNSYGRPCEFPFLIDGTWHHDCILDE DHSGPWCAATLNYEYDRKWGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFN TQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSAEELTYLKEKEGIKIFWIGLN QLYSARGWEWSDHKPLNFLNWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLW QSFSCEAQLPYVCRKPLNNTVELTDVWTYSOTRCAGWLPNNGFCY LLVNESNSWDKAHAKCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEEV WIGLKNINIPITLQWSDGTEVTLYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGE LGQWKVQSCEEKLYVCKRKGEKLNDASSDKMCPPEDEGWKRHGET CYKIYEDEVFPGTNCNLITSRFEQEYLNLDLMKKYDKSLRKYFWTGL RDVDSCGEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLEPASPGGCVAMSTGKSV GKWEVKDCRSFKALSICKKMSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPAS LSCYKVFHAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEFLHFL TDQFSGQHWLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYD IRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPFACDTKLEWVCQIPKG RTPKTPDWYNPDRAIGHGPPLIIEGSEYWFVADLHLNYEEAVLYCASN HSFLATITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYP WHRFPVTFGEECLYMSAKTWLIDLKGPTDCSTKLPFICEKYNVSSLEK YSPDSAAKVQCSEQWIPFQNKCFKIKPVSLTFSQASDTCHSYGGTLP SVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYEKINKWTDNRELTYSNF HPLLVSGRRLRIPENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHF VSLCQKYSEVKSRQTLQNASETVKYLNLYKIIPKTLTWHSKRECL KSNMQLVSITDPYQQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDG KRLHFSRWAETNGQLEDVVLDTDGFWKTVDCNDNQGAICYYSNG ETEKEVKPVDSVKCPSVLPNTPWIPFQNCYNFIITKNRHMATTQDEV HTKCQKLNPKSHLSIRDEKENNFVLEQLLYFNMYMASWVMLGITYRN KSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFFKVE EAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQKKVT

		WYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWVGLSSHD GSESSFESDSTFDYIPWKGQTSPGNCVLLDPKGTWKHEKCNVSKD GAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWIQYKGHCYKSDQALH SFSEAKKLCCKHDHSATIVSIKDEDEKFKVSRMLRENNITMRVWL LSQHSVDQSWSWLDGSEVTFVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKK VECEHGFGRVVCKVPLGPDYTAIAIIVATLSILVLMGGLIWFLFQRHRL HLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPSFHD
16	A1_VH_FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS
17	A1_VH_FR2	WVRQAPGKGLEWVG
18	A1_VH_FR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTI
19	A1_VH_FR4	WGQGTLLTVSS
20	A1_VL_FR1	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITC
21	A1_VL_FR2	WYQQRPGKAPNLLIY
22	A1_VL_FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC
23	A1_VL_FR4	FGQGTKVEIKR
24	LY75, 609-618	WEVKDCRSFK
25	LY75, 651-662	PASLSCYKVFHA
26	LY75, 761-780	PWRRGWHFYDDREFIYLRPF
27	LY75, 883-901	DDHFTYSRYPWHRFPVTFG
28	LY75, 1029-1040	RELTYSNHFHPLL
29	LY75, 1077-1093	FTSCSERHFVSLCQKYS
30	LY75, 1107-1118	TVKYLNNLYKII
31	LY75, 1368-1378	EAVYFHQHSIL

32	LY75, 1518-1528	KKLSRLTYSSC
33	LY75, 1535-1554	NGSRWIQYKGHCYKSDQALH
34	LY75, 877-901	ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG
35	LY75, 1099-1118	QTLQNASETVKYLNLYKII
36	LY75, 883-892	DDHFTYSRYP
37	LY75, 1077-1091	FTSCSERHFVSLCQK
38	VH ритуксимаба	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	VL ритуксимаба	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVFQQKPGSSPKPWIYA TSNLASGVVPRFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	Ритуксимаб, VH_CDR1	SYNMH
41	Ритуксимаб, VH_CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG

42	Ритуксимаб, VH_CDR3	STYYGGDWYFNV
43	Ритуксимаб, VL_CDR1	RASSSVSYIH
44	Ритуксимаб, VL_CDR2	ATSNLAS
45	Ритуксимаб, VL_CDR3	QQWTSNPPTF
46	(765-772)	GWHFYDDR
47	(877-890)	ISEWPIDDHFTYSR
48	(896-910)	FPVTFGEECLYMSAK
49	(1030-1044)	ELTYSNFHPLLVSGR
50	(1084-1091)	HFVSLCQK
51	(1099-1109)	QTLQNASETVK
52	Линкер	Gly-Phe-Leu-Gly

Перечень последовательностей в произвольном формате текста

SEQ ID NO: 38 <223> последовательность VH ритуксимаба

SEQ ID NO: 39 <223> последовательность VL ритуксимаба

SEQ ID NO: 40 <223> VH_CDR1 ритуксимаба

SEQ ID NO: 41 <223> VH_CDR2 ритуксимаба

SEQ ID NO: 42 <223> VH_CDR3 ритуксимаба

SEQ ID NO: 43 <223> VL_CDR1 ритуксимаба

SEQ ID NO: 44 <223> VL_CDR2 ритуксимаба

SEQ ID NO: 45 <223> VL_CDR3 ритуксимаба

SEQ ID NO: 52 <223> Линкер

SEQ ID NO: 53-163 <223> Пептид

SEQ ID NO: 165-207 <223> Пептид

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Берлин-Хеми АГ

<120> Фармацевтические комбинации, содержащие антитело к LY75

<130> 489.131183/01

<160> 207

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 1

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 Phe Thr Tyr Ser Asn Ala
20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ile Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 2

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 3
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 3
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc cggggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggctt cacttacagt aacgcctgga tgagctgggt cgcgcaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgtgca aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtacgatt 300
 tttggagtgg ttagctttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 4
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Человек

<400> 4
 gacgtccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc gactatttaa gttggatatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccaatt taaagactgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcac tctgcaacct 240
 gaagattttg caacgtacta ctgtcaacag agttacaggt ccccgtaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa acga 324

<210> 5
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Человек

<400> 5

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 6

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 6

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Gln Gly

<210> 7

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 7

Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 8

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 8

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

<210> 9

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 9

Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 11
<211> 104
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 11

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 Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Thr Thr Val Thr
100

<210> 12
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 12

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 93
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 13

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
 85 90

<210> 14

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 14

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

<210> 15

<211> 1722

<212> БЕЛОК

<213> Человек

<400> 15

Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala
 20 25 30

Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys
 35 40 45

Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp
 50 55 60

Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg
 85 90 95

Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His
 100 105 110

His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly
 115 120 125

His	Gly	Thr	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Lys	Lys	Gly	Gly	130	135	140	
Ser	Glu	Glu	Ser	Leu	Cys	Asp	Gln	Pro	Tyr	His	Glu	Ile	Tyr	Thr	Arg	145	150	155	160
Asp	Gly	Asn	Ser	Tyr	Gly	Arg	Pro	Cys	Glu	Phe	Pro	Phe	Leu	Ile	Asp	165	170	175	
Gly	Thr	Trp	His	His	Asp	Cys	Ile	Leu	Asp	Glu	Asp	His	Ser	Gly	Pro	180	185	190	
Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Lys	Trp	Gly	Ile	195	200	205	
Cys	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Gly	Cys	Glu	Asp	Asn	Trp	Glu	Lys	Asn	Glu	210	215	220	
Gln	Phe	Gly	Ser	Cys	Tyr	Gln	Phe	Asn	Thr	Gln	Thr	Ala	Leu	Ser	Trp	225	230	235	240
Lys	Glu	Ala	Tyr	Val	Ser	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	245	250	255	
Ile	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Gly	Ile	260	265	270	
Ala	Lys	Ile	Phe	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	275	280	285	
Trp	Glu	Trp	Ser	Asp	His	Lys	Pro	Leu	Asn	Phe	Leu	Asn	Trp	Asp	Pro	290	295	300	
Asp	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Cys	Ala	Arg	Met	305	310	315	320
Asp	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Trp	Gln	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	Gln	Leu	325	330	335	
Pro	Tyr	Val	Cys	Arg	Lys	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	340	345	350	
Val	Trp	Thr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Arg	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp	Leu	Pro	Asn	355	360	365	
Asn	Gly	Phe	Cys	Tyr	Leu	Leu	Val	Asn	Glu	Ser	Asn	Ser	Trp	Asp	Lys	370	375	380	

Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His
385 390 395 400

Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp
405 410 415

Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr
420 425 430

Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp
435 440 445

Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser
450 455 460

Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys
465 470 475 480

Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser
485 490 495

Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu
500 505 510

Thr Cys Tyr Lys Ile Tyr Glu Asp Glu Val Pro Phe Gly Thr Asn Cys
515 520 525

Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu
530 535 540

Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu
545 550 555 560

Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly
565 570 575

Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala
580 585 590

Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys
595 600 605

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys
610 615 620

Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp
625 630 635 640

Asp	Pro	Cys	Pro	Glu	Gly	Trp	Gln	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	
				645					650					655		
Tyr	Lys	Val	Phe	His	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Asn	Trp	Glu	
			660					665					670			
Glu	Ala	Glu	Arg	Phe	Cys	Gln	Ala	Leu	Gly	Ala	His	Leu	Ser	Ser	Phe	
		675					680					685				
Ser	His	Val	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	Phe	Leu	His	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	
	690					695					700					
Phe	Ser	Gly	Gln	His	Trp	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Lys	Arg	Ser	Pro	
705					710					715					720	
Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Trp	Gln	Trp	Ser	Asp	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	
				725					730					735		
Ile	Ile	Met	Pro	Asn	Glu	Phe	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Cys	
			740					745					750			
Ala	Ala	Val	Lys	Val	Phe	His	Arg	Pro	Trp	Arg	Arg	Gly	Trp	His	Phe	
		755					760					765				
Tyr	Asp	Asp	Arg	Glu	Phe	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Phe	Ala	Cys	Asp	Thr	
	770					775					780					
Lys	Leu	Glu	Trp	Val	Cys	Gln	Ile	Pro	Lys	Gly	Arg	Thr	Pro	Lys	Thr	
785					790					795					800	
Pro	Asp	Trp	Tyr	Asn	Pro	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	His	Gly	Pro	Pro	Leu	
				805					810					815		
Ile	Ile	Glu	Gly	Ser	Glu	Tyr	Trp	Phe	Val	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Asn	
			820					825					830			
Tyr	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	His	Ser	Phe	Leu	Ala	
		835					840					845				
Thr	Ile	Thr	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Lys	Ala	Ile	Lys	Asn	Lys	Ile	Ala	
	850					855					860					
Asn	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gln	Lys	Trp	Trp	Ile	Arg	Ile	Ser	Glu	Trp	
865					870					875					880	
Pro	Ile	Asp	Asp	His	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Pro	Trp	His	Arg	Phe	
				885					890					895		

Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp
900 905 910

Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe
915 920 925

Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp
930 935 940

Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
945 950 955 960

Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala
965 970 975

Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser
980 985 990

Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala
995 1000 1005

Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn
1010 1015 1020

Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
1025 1030 1035

Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu
1040 1045 1050

Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
1055 1060 1065

Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg
1070 1075 1080

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg
1085 1090 1095

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn
1100 1105 1110

Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
1115 1120 1125

Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp
1130 1135 1140

Pro	Tyr	Gln	Gln	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Asn
1145						1150					1155			
Ser	Ser	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ser	Gln	Asp	Asp	Glu	Leu	Asn
1160						1165					1170			
Phe	Gly	Trp	Ser	Asp	Gly	Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ser	Arg	Trp	Ala
1175						1180					1185			
Glu	Thr	Asn	Gly	Gln	Leu	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Leu	Asp	Thr	Asp
1190						1195					1200			
Gly	Phe	Trp	Lys	Thr	Val	Asp	Cys	Asn	Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Ala
1205						1210					1215			
Ile	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Glu	Lys	Glu	Val	Lys	Pro
1220						1225					1230			
Val	Asp	Ser	Val	Lys	Cys	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Asn	Thr	Pro	Trp
1235						1240					1245			
Ile	Pro	Phe	Gln	Asn	Cys	Cys	Tyr	Asn	Phe	Ile	Ile	Thr	Lys	Asn
1250						1255					1260			
Arg	His	Met	Ala	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	His	Thr	Lys	Cys	Gln
1265						1270					1275			
Lys	Leu	Asn	Pro	Lys	Ser	His	Ile	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Glu	Lys
1280						1285					1290			
Glu	Asn	Asn	Phe	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Met
1295						1300					1305			
Ala	Ser	Trp	Val	Met	Leu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Arg	Asn	Lys	Ser	Leu
1310						1315					1320			
Met	Trp	Phe	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Tyr	Thr	His	Trp	Arg	Ala
1325						1330					1335			
Gly	Arg	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn	Glu	Lys	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser
1340						1345					1350			
Thr	Asp	Gly	Phe	Trp	Asp	Ile	Gln	Thr	Phe	Lys	Val	Ile	Glu	Glu
1355						1360					1365			
Ala	Val	Tyr	Phe	His	Gln	His	Ser	Ile	Leu	Ala	Cys	Lys	Ile	Glu
1370						1375					1380			

Met	Val	Asp	Tyr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe
	1385					1390					1395			
Met	Pro	Tyr	Glu	Asp	Gly	Ile	Tyr	Ser	Val	Ile	Gln	Lys	Lys	Val
	1400					1405					1410			
Thr	Trp	Tyr	Glu	Ala	Leu	Asn	Met	Cys	Ser	Gln	Ser	Gly	Gly	His
	1415					1420					1425			
Leu	Ala	Ser	Val	His	Asn	Gln	Asn	Gly	Gln	Leu	Phe	Leu	Glu	Asp
	1430					1435					1440			
Ile	Val	Lys	Arg	Asp	Gly	Phe	Pro	Leu	Trp	Val	Gly	Leu	Ser	Ser
	1445					1450					1455			
His	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser	Phe	Glu	Trp	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr
	1460					1465					1470			
Phe	Asp	Tyr	Ile	Pro	Trp	Lys	Gly	Gln	Thr	Ser	Pro	Gly	Asn	Cys
	1475					1480					1485			
Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Gly	Thr	Trp	Lys	His	Glu	Lys	Cys	Asn
	1490					1495					1500			
Ser	Val	Lys	Asp	Gly	Ala	Ile	Cys	Tyr	Lys	Pro	Thr	Lys	Ser	Lys
	1505					1510					1515			
Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ser	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Lys
	1520					1525					1530			
Glu	Asn	Gly	Ser	Arg	Trp	Ile	Gln	Tyr	Lys	Gly	His	Cys	Tyr	Lys
	1535					1540					1545			
Ser	Asp	Gln	Ala	Leu	His	Ser	Phe	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Cys
	1550					1555					1560			
Ser	Lys	His	Asp	His	Ser	Ala	Thr	Ile	Val	Ser	Ile	Lys	Asp	Glu
	1565					1570					1575			
Asp	Glu	Asn	Lys	Phe	Val	Ser	Arg	Leu	Met	Arg	Glu	Asn	Asn	Asn
	1580					1585					1590			
Ile	Thr	Met	Arg	Val	Trp	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln	His	Ser	Val	Asp
	1595					1600					1605			
Gln	Ser	Trp	Ser	Trp	Leu	Asp	Gly	Ser	Glu	Val	Thr	Phe	Val	Lys
	1610					1615					1620			

Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu
1625 1630 1635

Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly
1640 1645 1650

Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr
1655 1660 1665

Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met
1670 1675 1680

Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu
1685 1690 1695

Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp
1700 1705 1710

Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp
1715 1720

<210> 16
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 16

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 Phe Thr Tyr Ser
20 25 30

<210> 17
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 17

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 18
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 19

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

<210> 20
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 21
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 21

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 22
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 22

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 23
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 23

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

<210> 24
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 24

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 25

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
1 5 10

<210> 26
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 26

Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr
1 5 10 15

Leu Arg Pro Phe
20

<210> 27
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 27

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
1 5 10 15

Thr Phe Gly

<210> 28
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 28

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
1 5 10

<210> 29
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 29

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
1 5 10 15

Ser

<210> 30
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 30

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 31

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 32

Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Cys
1 5 10

<210> 33
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 33

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
1 5 10 15

Gln Ala Leu His

<210> 34
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Человек

<400> 34

Ile	Ser	Glu	Trp	Pro	Ile	Asp	Asp	His	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Pro
1				5					10					15	

Trp	His	Arg	Phe	Pro	Val	Thr	Phe	Gly
			20					25

<210> 35
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Человек

<400> 35

Gln	Thr	Leu	Gln	Asn	Ala	Ser	Glu	Thr	Val	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asn	Leu
1				5					10					15	

Tyr	Lys	Ile	Ile
			20

<210> 36
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Человек

<400> 36

Asp	Asp	His	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Pro
1				5					10

<210> 37
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Человек

<400> 37

Phe	Thr	Ser	Cys	Ser	Glu	Arg	His	Phe	Val	Ser	Leu	Cys	Gln	Lys
1				5					10					15

<210> 38
 <211> 451
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность VN ритуксимаба

<400> 38

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

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 39
<211> 213
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность VL ритуксимаба

<400> 39

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

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

<210> 40
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> VH_CDR1 ритуксимаба

 <400> 40

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH_CDR2 ритуксимаба

<400> 41

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH_CDR3 ритуксимаба

<400> 42

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL_CDR1 ритуксимаба

<400> 43

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 44
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL_CDR2 ритуксимаба

<400> 44

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> VL_CDR3 ритуксимаба

<400> 45

Gln	Gln	Trp	Thr	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe
1				5					10

<210> 46
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly	Trp	His	Phe	Tyr	Asp	Asp	Arg
1				5			

<210> 47
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 47

Ile	Ser	Glu	Trp	Pro	Ile	Asp	Asp	His	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg
1				5					10				

<210> 48
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 48

Phe	Pro	Val	Thr	Phe	Gly	Glu	Glu	Cys	Leu	Tyr	Met	Ser	Ala	Lys
1				5					10					15

<210> 49
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 49

Glu	Leu	Thr	Tyr	Ser	Asn	Phe	His	Pro	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Arg
1				5					10					15

<210> 50
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 50

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
1 5

<210> 51

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys
1 5 10

<210> 52

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 52

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 53

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 53

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser
1 5

<210> 54

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 54

Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe
1 5

<210> 55

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 55

Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 56

Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 57

Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 58

Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser
1 5

<210> 59
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 59

Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 60

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 61

Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 62

Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 63

Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 64

Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
1 5

<210> 65

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 65

Cys Tyr Lys Val Phe His Ala Glu
1 5

<210> 66

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 66

Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg
1 5

<210> 67

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 67

Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile
1 5

<210> 68

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 68

Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val
1 5

<210> 69

<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 69

Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 70

Asp Cys Ala Ala Val Lys Val Phe
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 71

Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 72

Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 73

Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 74

His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 75

Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 76

Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 77

Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 78

His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe
1 5

<210> 79

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 79

Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr
1 5

<210> 80

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 80

Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg
1 5

<210> 81

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 81

Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe
1 5

<210> 82

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 82

Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr

1

5

<210> 83
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 83

Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser
1 5

<210> 84
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 84

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg
1 5

<210> 85
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 85

Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr
1 5

<210> 86
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 86

His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 87

Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp
1 5

<210> 88
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 88

Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His
1 5

<210> 89
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 89

Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg
1 5

<210> 90
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 90

Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe
1 5

<210> 91
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 91

Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro
1 5

<210> 92
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 92

Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 93

Pro Trp His Arg Phe Pro Val Thr
1 5

<210> 94
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 94

Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe
1 5

<210> 95
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 95

His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly
1 5

<210> 96
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 96

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe
1 5

<210> 97

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 97

Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His
1 5

<210> 98

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 98

Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
1 5

<210> 99

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 99

Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu
1 5

<210> 100

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 100

Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
1 5

<210> 101

<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 101

Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val
1 5

<210> 102
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 102

Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser
1 5

<210> 103
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 103

Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly
1 5

<210> 104
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 104

His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg
1 5

<210> 105
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 105

Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu
1 5

<210> 106
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 106

Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg
1 5

<210> 107
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 107

Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile
1 5

<210> 108
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 108

Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro
1 5

<210> 109
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 109

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His
1 5

<210> 110
<211> 8
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 110

Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe
1 5

<210> 111

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 111

Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val
1 5

<210> 112

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 112

Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser
1 5

<210> 113

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 113

Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu
1 5

<210> 114

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 114

Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys

1

5

<210> 115
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 115

Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 116

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
1 5

<210> 117
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 117

Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
1 5

<210> 118
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 118

Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser
1 5

<210> 119
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 119

Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu
1 5

<210> 120
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 120

Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val
1 5

<210> 121
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 121

Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys
1 5

<210> 122
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 122

Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser
1 5

<210> 123
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 123

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu
1 5

<210> 124
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 124

Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr
1 5

<210> 125
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 125

Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys
1 5

<210> 126
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 126

Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile
1 5

<210> 127
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 127

Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
1 5

<210> 128
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 128

Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro
1 5

<210> 129

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 129

Asn Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys
1 5

<210> 130

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 130

Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr
1 5

<210> 131

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 131

Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu
1 5

<210> 132

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 132

Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr
1 5

<210> 133

<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 133

Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp
1 5

<210> 134
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 134

Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His
1 5

<210> 135
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 135

Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 136

Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 137

Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
1 5

<210> 138
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 138

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His
1 5

<210> 139
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 139

Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 140

Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 141

Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
1 5

<210> 142
<211> 8
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 142

Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala
1 5

<210> 143

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 143

Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr
1 5

<210> 144

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 144

Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser
1 5

<210> 145

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 145

Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser
1 5

<210> 146

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 146

Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg

1

5

<210> 147
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 147

Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys
1 5

<210> 148
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 148

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr
1 5

<210> 149
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 149

Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys
1 5

<210> 150
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 150

Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly
1 5

<210> 151
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 151

Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His
1 5

<210> 152
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 152

Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys
1 5

<210> 153
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 153

Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr
1 5

<210> 154
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 154

Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys
1 5

<210> 155
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 155

Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser
1 5

<210> 156
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 156

Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
1 5

<210> 157
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 157

Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln
1 5

<210> 158
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 158

His Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala
1 5

<210> 159
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 159

Cys Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu
1 5

<210> 160
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 160

Tyr Lys Ser Asp Gln Ala Leu His
1 5

<210> 161

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 161

Lys Ser Asp Gln Ala Leu His Ser
1 5

<210> 162

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 162

Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe
1 5

<210> 163

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 163

Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser
1 5

<210> 164

<211> 1722

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 164

Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala
20 25 30

Asn	Asp	Pro	Phe	Thr	Ile	Val	His	Gly	Asn	Thr	Gly	Lys	Cys	Ile	Lys	35	40	45
Pro	Val	Tyr	Gly	Trp	Ile	Val	Ala	Asp	Asp	Cys	Asp	Glu	Thr	Glu	Asp	50	55	60
Lys	Leu	Trp	Lys	Trp	Val	Ser	Gln	His	Arg	Leu	Phe	His	Leu	His	Ser	65	70	75
Gln	Lys	Cys	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Thr	Lys	Ser	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	85	90	95
Met	Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Ser	Ala	Met	Leu	Trp	Trp	Lys	Cys	Glu	His	100	105	110
His	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ala	Ala	Arg	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Asp	Gly	115	120	125
His	Gly	Thr	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Lys	Lys	Gly	Gly	130	135	140
Ser	Glu	Glu	Ser	Leu	Cys	Asp	Gln	Pro	Tyr	His	Glu	Ile	Tyr	Thr	Arg	145	150	155
Asp	Gly	Asn	Ser	Tyr	Gly	Arg	Pro	Cys	Glu	Phe	Pro	Phe	Leu	Ile	Asp	165	170	175
Gly	Thr	Trp	His	His	Asp	Cys	Ile	Leu	Asp	Glu	Asp	His	Ser	Gly	Pro	180	185	190
Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Lys	Trp	Gly	Ile	195	200	205
Cys	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Gly	Cys	Glu	Asp	Asn	Trp	Glu	Lys	Asn	Glu	210	215	220
Gln	Phe	Gly	Ser	Cys	Tyr	Gln	Phe	Asn	Thr	Gln	Thr	Ala	Leu	Ser	Trp	225	230	235
Lys	Glu	Ala	Tyr	Val	Ser	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	245	250	255
Ile	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Gly	Ile	260	265	270
Ala	Lys	Ile	Phe	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	275	280	285

Trp	Glu	Trp	Ser	Asp	His	Lys	Pro	Leu	Asn	Phe	Leu	Asn	Trp	Asp	Pro	290	295	300
Asp	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Cys	Ala	Arg	Met	305	310	315
Asp	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Trp	Gln	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	Gln	Leu	325	330	335
Pro	Tyr	Val	Cys	Arg	Lys	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	340	345	350
Val	Trp	Thr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Arg	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp	Leu	Pro	Asn	355	360	365
Asn	Gly	Phe	Cys	Tyr	Leu	Leu	Val	Asn	Glu	Ser	Asn	Ser	Trp	Asp	Lys	370	375	380
Ala	His	Ala	Lys	Cys	Lys	Ala	Phe	Ser	Ser	Asp	Leu	Ile	Ser	Ile	His	385	390	395
Ser	Leu	Ala	Asp	Val	Glu	Val	Val	Val	Thr	Lys	Leu	His	Asn	Glu	Asp	405	410	415
Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Trp	Ile	Gly	Leu	Lys	Asn	Ile	Asn	Ile	Pro	Thr	420	425	430
Leu	Phe	Gln	Trp	Ser	Asp	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Trp	Asp	435	440	445
Glu	Asn	Glu	Pro	Asn	Val	Pro	Tyr	Asn	Lys	Thr	Pro	Asn	Cys	Val	Ser	450	455	460
Tyr	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Gln	Trp	Lys	Val	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Lys	465	470	475
Leu	Lys	Tyr	Val	Cys	Lys	Arg	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Ser	485	490	495
Ser	Asp	Lys	Met	Cys	Pro	Pro	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Arg	His	Gly	Glu	500	505	510
Thr	Cys	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Glu	Asp	Glu	Val	Pro	Phe	Gly	Thr	Asn	Cys	515	520	525
Asn	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Arg	Phe	Glu	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	530	535	540

Met	Lys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Ser	Leu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Trp	Thr	Gly	Leu	545	550	555	560
Arg	Asp	Val	Asp	Ser	Cys	Gly	Glu	Tyr	Asn	Trp	Ala	Thr	Val	Gly	Gly	565	570	575	
Arg	Arg	Arg	Ala	Val	Thr	Phe	Ser	Asn	Trp	Asn	Phe	Leu	Glu	Pro	Ala	580	585	590	
Ser	Pro	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Met	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Val	Gly	Lys	595	600	605	
Trp	Glu	Val	Lys	Asp	Cys	Arg	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Ser	Ile	Cys	Lys	610	615	620	
Lys	Met	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Pro	Lys	Pro	Asp	625	630	635	640
Asp	Pro	Cys	Pro	Glu	Gly	Trp	Gln	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	645	650	655	
Tyr	Lys	Val	Phe	His	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Asn	Trp	Glu	660	665	670	
Glu	Ala	Glu	Arg	Phe	Cys	Gln	Ala	Leu	Gly	Ala	His	Leu	Ser	Ser	Phe	675	680	685	
Ser	His	Val	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	Phe	Leu	His	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	690	695	700	
Phe	Ser	Gly	Gln	His	Trp	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Asn	Lys	Arg	Ser	Pro	705	710	715	720
Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Trp	Gln	Trp	Ser	Asp	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	725	730	735	
Ile	Ile	Met	Pro	Asn	Glu	Phe	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Cys	740	745	750	
Ala	Ala	Val	Lys	Val	Phe	His	Arg	Pro	Trp	Arg	Arg	Gly	Trp	His	Phe	755	760	765	
Tyr	Asp	Asp	Arg	Glu	Phe	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Phe	Ala	Cys	Asp	Thr	770	775	780	
Lys	Leu	Glu	Trp	Val	Cys	Gln	Ile	Pro	Lys	Gly	Arg	Thr	Pro	Lys	Thr	785	790	795	800

Pro	Asp	Trp	Tyr	Asn	Pro	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	His	Gly	Pro	Pro	Leu
				805					810					815	
Ile	Ile	Glu	Gly	Ser	Glu	Tyr	Trp	Phe	Val	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Asn
			820					825					830		
Tyr	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr	Cys	Ala	Ser	Asn	His	Ser	Phe	Leu	Ala
			835				840					845			
Thr	Ile	Thr	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Lys	Ala	Ile	Lys	Asn	Lys	Ile	Ala
			850			855					860				
Asn	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gln	Lys	Trp	Trp	Ile	Arg	Ile	Ser	Glu	Trp
865					870					875					880
Pro	Ile	Asp	Asp	His	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Pro	Trp	His	Arg	Phe
				885					890					895	
Pro	Val	Thr	Phe	Gly	Glu	Glu	Cys	Leu	Tyr	Met	Ser	Ala	Lys	Thr	Trp
			900					905					910		
Leu	Ile	Asp	Leu	Gly	Lys	Pro	Thr	Asp	Cys	Ser	Thr	Lys	Leu	Pro	Phe
		915					920					925			
Ile	Cys	Glu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Tyr	Ser	Pro	Asp
	930					935					940				
Ser	Ala	Ala	Lys	Val	Gln	Cys	Ser	Glu	Gln	Trp	Ile	Pro	Phe	Gln	Asn
945					950					955					960
Lys	Cys	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Thr	Phe	Ser	Gln	Ala
				965					970					975	
Ser	Asp	Thr	Cys	His	Ser	Tyr	Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	Ser	Val	Leu	Ser
			980					985					990		
Gln	Ile	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Thr	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Met	Glu	Ala
		995					1000					1005			
Thr	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Arg	Trp	Thr	Ala	Tyr	Glu	Lys	Ile	Asn	
	1010					1015					1020				
Lys	Trp	Thr	Asp	Asn	Arg	Glu	Leu	Thr	Tyr	Ser	Asn	Phe	His	Pro	
	1025					1030					1035				
Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Arg	Leu	Arg	Ile	Pro	Glu	Asn	Phe	Phe	Glu	
	1040					1045					1050				

Glu	Glu	Ser	Arg	Tyr	His	Cys	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn	Leu	Gln	Lys
1055						1060					1065			
Ser	Pro	Phe	Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Phe	Thr	Ser	Cys	Ser	Glu	Arg
1070						1075					1080			
His	Phe	Val	Ser	Leu	Cys	Gln	Lys	Tyr	Ser	Glu	Val	Lys	Ser	Arg
1085						1090					1095			
Gln	Thr	Leu	Gln	Asn	Ala	Ser	Glu	Thr	Val	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asn
1100						1105					1110			
Leu	Tyr	Lys	Ile	Ile	Pro	Lys	Thr	Leu	Thr	Trp	His	Ser	Ala	Lys
1115						1120					1125			
Arg	Glu	Cys	Leu	Lys	Ser	Asn	Met	Gln	Leu	Val	Ser	Ile	Thr	Asp
1130						1135					1140			
Pro	Tyr	Gln	Gln	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Asn
1145						1150					1155			
Ser	Ser	Leu	Trp	Ile	Gly	Leu	Phe	Ser	Gln	Asp	Asp	Glu	Leu	Asn
1160						1165					1170			
Phe	Gly	Trp	Ser	Asp	Gly	Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ser	Arg	Trp	Ala
1175						1180					1185			
Glu	Thr	Asn	Gly	Gln	Leu	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Leu	Asp	Thr	Asp
1190						1195					1200			
Gly	Phe	Trp	Lys	Thr	Val	Asp	Cys	Asn	Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Ala
1205						1210					1215			
Ile	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Glu	Lys	Glu	Val	Lys	Pro
1220						1225					1230			
Val	Asp	Ser	Val	Lys	Cys	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Asn	Thr	Pro	Trp
1235						1240					1245			
Ile	Pro	Phe	Gln	Asn	Cys	Cys	Tyr	Asn	Phe	Ile	Ile	Thr	Lys	Asn
1250						1255					1260			
Arg	His	Met	Ala	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	His	Thr	Lys	Cys	Gln
1265						1270					1275			
Lys	Leu	Asn	Pro	Lys	Ser	His	Ile	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Glu	Lys
1280						1285					1290			

Glu	Asn	Asn	Phe	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Met
1295						1300					1305			
Ala	Ser	Trp	Val	Met	Leu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Arg	Asn	Lys	Ser	Leu
1310						1315					1320			
Met	Trp	Phe	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Tyr	Thr	His	Trp	Arg	Ala
1325						1330					1335			
Gly	Arg	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn	Glu	Lys	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser
1340						1345					1350			
Thr	Asp	Gly	Phe	Trp	Asp	Ile	Gln	Thr	Phe	Lys	Val	Ile	Glu	Glu
1355						1360					1365			
Ala	Val	Tyr	Phe	His	Gln	His	Ser	Ile	Leu	Ala	Cys	Lys	Ile	Glu
1370						1375					1380			
Met	Val	Asp	Tyr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe
1385						1390					1395			
Met	Pro	Tyr	Glu	Asp	Gly	Ile	Tyr	Ser	Val	Ile	Gln	Lys	Lys	Val
1400						1405					1410			
Thr	Trp	Tyr	Glu	Ala	Leu	Asn	Met	Cys	Ser	Gln	Ser	Gly	Gly	His
1415						1420					1425			
Leu	Ala	Ser	Val	His	Asn	Gln	Asn	Gly	Gln	Leu	Phe	Leu	Glu	Asp
1430						1435					1440			
Ile	Val	Lys	Arg	Asp	Gly	Phe	Pro	Leu	Trp	Val	Gly	Leu	Ser	Ser
1445						1450					1455			
His	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser	Phe	Glu	Trp	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr
1460						1465					1470			
Phe	Asp	Tyr	Ile	Pro	Trp	Lys	Gly	Gln	Thr	Ser	Pro	Gly	Asn	Cys
1475						1480					1485			
Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Gly	Thr	Trp	Lys	His	Glu	Lys	Cys	Asn
1490						1495					1500			
Ser	Val	Lys	Asp	Gly	Ala	Ile	Cys	Tyr	Lys	Pro	Thr	Lys	Ser	Lys
1505						1510					1515			
Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ser	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Lys
1520						1525					1530			

Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys
1535 1540 1545

Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys
1550 1555 1560

Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu
1565 1570 1575

Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn
1580 1585 1590

Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp
1595 1600 1605

Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys
1610 1615 1620

Trp Glu Asn Lys Ser Lys Ser Gly Val Gly Arg Cys Ser Met Leu
1625 1630 1635

Ile Ala Ser Asn Glu Thr Trp Lys Lys Val Glu Cys Glu His Gly
1640 1645 1650

Phe Gly Arg Val Val Cys Lys Val Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Thr
1655 1660 1665

Ala Ile Ala Ile Ile Val Ala Thr Leu Ser Ile Leu Val Leu Met
1670 1675 1680

Gly Gly Leu Ile Trp Phe Leu Phe Gln Arg His Arg Leu His Leu
1685 1690 1695

Ala Gly Phe Ser Ser Val Arg Tyr Ala Gln Gly Val Asn Glu Asp
1700 1705 1710

Glu Ile Met Leu Pro Ser Phe His Asp
1715 1720

<210> 165
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 165

Cys Ile Lys Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu
1 5 10 15

Thr Glu Asp Lys Leu Trp Lys
20

<210> 166
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 166

Cys Glu His His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 167
<211> 34
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 167

Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr
20 25 30

Thr Arg

<210> 168
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 168

Lys Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile
1 5 10 15

Tyr Thr Arg

<210> 169
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 169

Gly Gly Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr
1 5 10 15

Thr Arg

<210> 170
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 170

Asp Gly His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys
1 5 10 15

<210> 171
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 171

Trp Gly Ile Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu
1 5 10 15

Lys

<210> 172
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 172

Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg
1 5 10

<210> 173
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 173

Leu His Asn Glu Asp Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys
1 5 10 15

<210> 174
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 174

Thr Pro Asn Cys Val Ser Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys
1 5 10 15

<210> 175
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 175

Tyr Phe Trp Thr Gly Leu Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn
1 5 10 15

Trp Ala Thr Val Gly Gly Arg
20

<210> 176
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 176

Ser Val Gly Lys Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 177

Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 178

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 178

Ala Leu Ser Ile Cys Lys Lys
1 5

<210> 179

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 179

Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
1 5 10

<210> 180

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 180

Arg Asn Trp Glu Glu Ala Glu Arg
1 5

<210> 181

<211> 33

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 181

Arg Ser Pro Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro
1 5 10 15

Val Ser Thr Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile
20 25 30

Arg

<210> 182
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 182

Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Ile	Ile	Met	Pro	Asn	Glu	Phe	Gln	Gln	Asp	Tyr
1				5					10					15	

Asp Ile Arg

<210> 183
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 183

Pro	Trp	Arg	Arg	Gly	Trp	His	Phe	Tyr	Asp	Asp	Arg	Glu	Phe	Ile	Tyr
1				5					10					15	

Leu Arg Pro Phe
20

<210> 184
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 184

Gly	Trp	His	Phe	Tyr	Asp	Asp	Arg
1				5			

<210> 185
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 185

Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg
1 5 10

<210> 186

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 186

Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
1 5 10 15

Thr Phe Gly

<210> 187

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 187

Phe Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr
1 5 10 15

Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys
20 25 30

<210> 188

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 188

Thr Trp Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys
1 5 10 15

<210> 189

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 189

Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys
1 5

<210> 190

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 190

Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
1 5 10

<210> 191

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 191

Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
1 5 10

<210> 192

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 192

Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu
1 5 10 15

Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala
20 25 30

Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
35

<210> 193

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 193

Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
1 5 10

<210> 194

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 194

Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
1 5 10 15

Ser

<210> 195

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 195

His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
1 5

<210> 196

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 196

Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys
1 5 10

<210> 197

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 197

Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
1 5 10

<210> 198
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 198

Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
1 5

<210> 199
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 199

Asn Arg His Met Ala Thr Thr Gln Asp Glu Val His Thr Lys
1 5 10

<210> 200
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 200

Ser His Ile Leu Ser Ile Arg
1 5

<210> 201
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 201

Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg
1 5 10 15

<210> 202
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 202

Ser Leu Met Trp Phe Asp Lys
1 5

<210> 203

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 203

Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
1 5 10

<210> 204

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 204

Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser
1 5 10

<210> 205

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 205

Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
1 5 10 15

Gln Ala Leu His
20

<210> 206

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Пептид

<400> 206

His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu Asp Glu Asn
1 5 10 15

Lys Phe Val Ser Arg
20

<210> 207
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептид

<400> 207

Val Glu Cys Glu His Gly Phe Gly Arg
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация, содержащая:

(A) антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, которые конкурируют за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2;

или

антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5;
- ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и
- iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и

b) переменную область легкой цепи, содержащую:

- i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8;
- ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и
- iii) третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций; и

(B) антитело к CD20 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 40;
- ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 41; и
- iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 42; и

b) переменную область легкой цепи, содержащую:

- i) первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 43;
- ii) вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 44; и

iii) третью vICDR, содержащую SEQ ID NO: 45;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций;

где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения, предпочтительно для лечения рака.

2. Фармацевтическая комбинация, содержащая:

(A) антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, которые конкурируют за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2; или

антитело к LY75 или его антигенсвязывающую часть, при этом указанное антитело содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, содержащую:

i) первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5;

ii) вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и

iii) третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и

b) переменную область легкой цепи, содержащую:

i) первую vICDR, содержащую SEQ ID NO: 8;

ii) вторую vICDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и

iii) третью vICDR, содержащую SEQ ID NO: 10;

где необязательно любые одна или более из вышеуказанных SEQ ID NO независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций; и

(B) ибрутиниб или его фармацевтически приемлемую соль,

где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения, предпочтительно для лечения рака.

3. Фармацевтическая комбинация по п. 1 или п. 2, где любые одна или более из SEQ ID NO: 5-10 независимо содержат одну, две, три, четыре или пять консервативных аминокислотных замен.

4. Фармацевтическая комбинация по п. 3, где любые одна или более из SEQ ID NO: 5-10 независимо содержат одну или две консервативные аминокислотные замены.

5. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-4, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть содержат тяжелую цепь, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2.
6. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, где антитело к LY75 представляет собой моноклональное антитело IgG1 человека.
7. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-6, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть дополнительно содержат ковалентно присоединенную функциональную часть.
8. Фармацевтическая комбинация по п. 7, где указанная функциональная часть представляет собой лекарственное средство.
9. Фармацевтическая комбинация по п. 8, где указанное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид или его производное.
10. Фармацевтическая комбинация по п. 9, где указанное лекарственное средство представляет собой DM4 или DM1.
11. Фармацевтическая комбинация по любому из п. 1 или пп. 3-10, где любые одна или более из SEQ ID NO: 40-45 независимо содержат одну, две, три, четыре или пять консервативных аминокислотных замен.
12. Фармацевтическая комбинация по п. 11, где любые одна или более из SEQ ID NO: 40-45 независимо содержат одну или две консервативные аминокислотные замены.
13. Фармацевтическая комбинация по любому из п. 1 или пп. 3-12, где антитело к CD20 представляет собой химерное антитело мыши/человека, гуманизированное антитело или антитело человека.
14. Фармацевтическая комбинация по любому из п. 1 или пп. 3-13, где антитело к CD20 представляет собой ритуксимаб.
15. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-14, где (A) и/или (B) дополнительно содержат один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, вспомогательных веществ или носителей.
16. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-15, где фармацевтическая комбинация находится в форме комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) или неходжкинской лимфомы.

17. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-16, дополнительно содержащая инструкции по лечению рака у пациента, нуждающегося в таком лечении, посредством введения (А) и (В) пациенту.

18. Набор, содержащий:

(i) вектор экспрессии, содержащий ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи антитела к LY75 или его антигенсвязывающей части по п. 1; и

(ii) вектор экспрессии, содержащий ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепи антитела к CD20 или его антигенсвязывающей части по п. 1.

19. Клетка-хозяин, содержащая векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие:

(i) тяжелую цепь антитела к LY75 или его антигенсвязывающей части по п. 1;

(ii) легкую цепь антитела к LY75 или его антигенсвязывающей части по п. 1;

(iii) тяжелую цепь антитела к CD20 или его антигенсвязывающей части по п. 1 и (iv) легкую цепь антитела к CD20 или его антигенсвязывающей части по п. 1.

20. Способ лечения рака у пациента, включающий одновременное, последовательное или раздельное введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных количеств компонентов (А) и (В) фармацевтической комбинации по любому из пп. 1-15.

21. Способ по п. 20, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.

22. Способ по п. 20 или п. 21, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.

23. Способ по п. 22, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, предпочтительно DM4.

24. Способ по любому из пп. 21-23, где рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) или неходжкинскую лимфому.

25. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-15 для применения при лечении рака, где компоненты (А) и (В) вводятся пациенту одновременно, раздельно или последовательно для лечения рака.

26. Фармацевтическая комбинация для применения по п. 25, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.

27. Фармацевтическая комбинация для применения по п. 25 или п. 26, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.
28. Фармацевтическая комбинация для применения по п. 27, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, предпочтительно DM4.
29. Фармацевтическая комбинация для применения по п. 28, где рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) или неходжкинскую лимфому.
30. Применение компонентов (А) и (В) фармацевтической комбинации по любому из пп. 1-15 в изготовлении фармацевтической комбинации для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения рака.
31. Применение по п. 30, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.
32. Применение по п. 30 или п. 31, где антитело к LY75 или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.
33. Применение по п. 33, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, предпочтительно DM4.
34. Применение по п. 33, где рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) или неходжкинскую лимфому.
35. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-16 для применения в терапии или для применения в качестве лекарственного препарата.
- ...

```

SEQ ID No: 11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 1       EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 12      -----
                    *****;*****

```



```

SEQ ID No: 11      DYAAPVKGRETI SRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTITTTVT-----
SEQ ID No: 1       DYAAPVQGRETI SRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTIIFGVVSEDYWGQTLVTVSS
SEQ ID No: 12      -----YFDYWGQTLVTVSS
                    *****;*****

```

ФИГУРА 1

```

SEQ ID No: 2       DVQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSI SDYLSWYQQRP GKAPNLLIYAASNLRKIGVPS
SEQ ID No: 13      DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSI SSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS
SEQ ID No: 14      -----
                    *:***** ** *:*****;***** *: ****

```



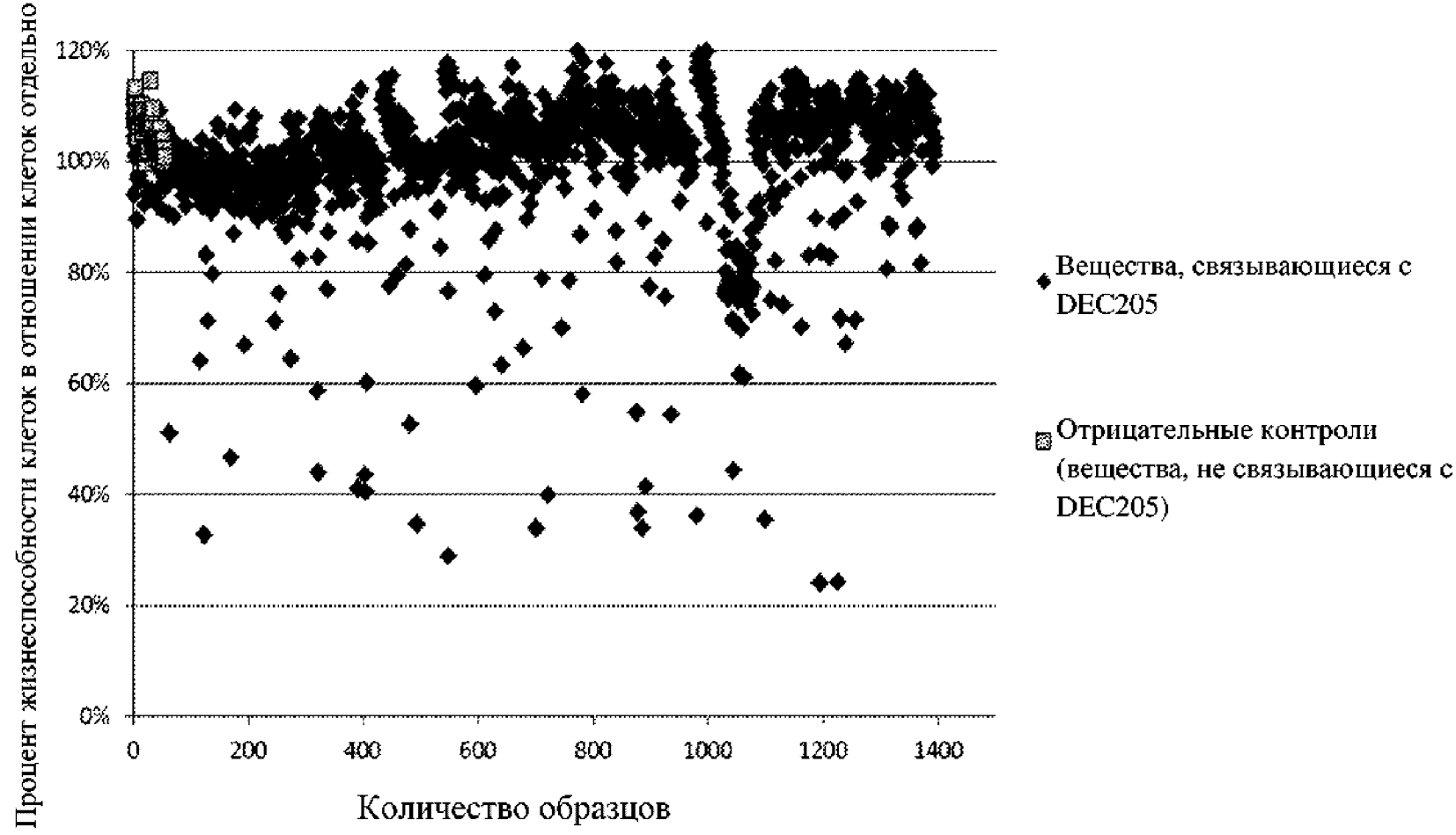
```

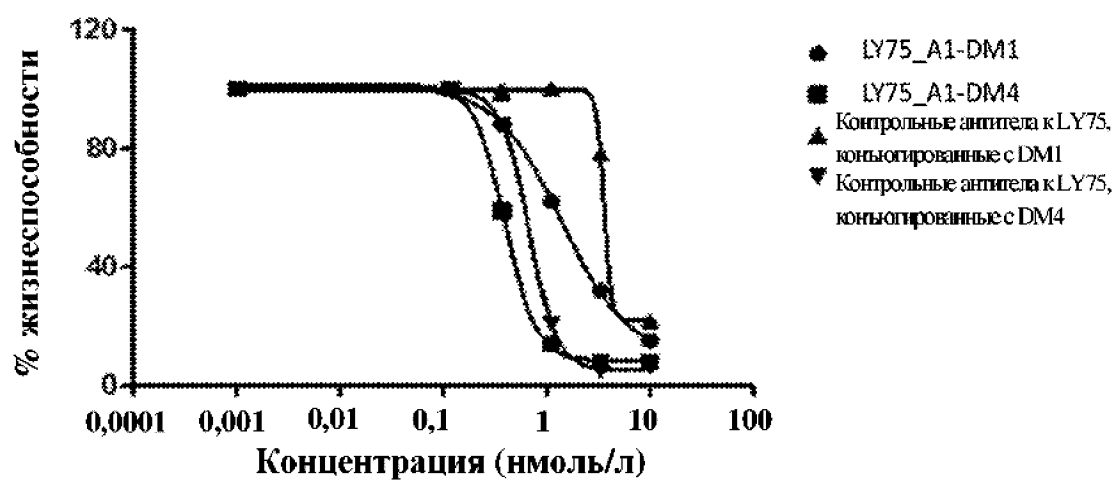
SEQ ID No: 2       RFSGSGSGTDFILTI SLQPEDFATYYCQQS YRSPWTFGQGTKVEIKR
SEQ ID No: 13      RFSGSGSGTDFILTI SSLQPEDFATYYCQQSYS-----
SEQ ID No: 14      -----WTFGQGTKVEIKR
                    *****;*****

```

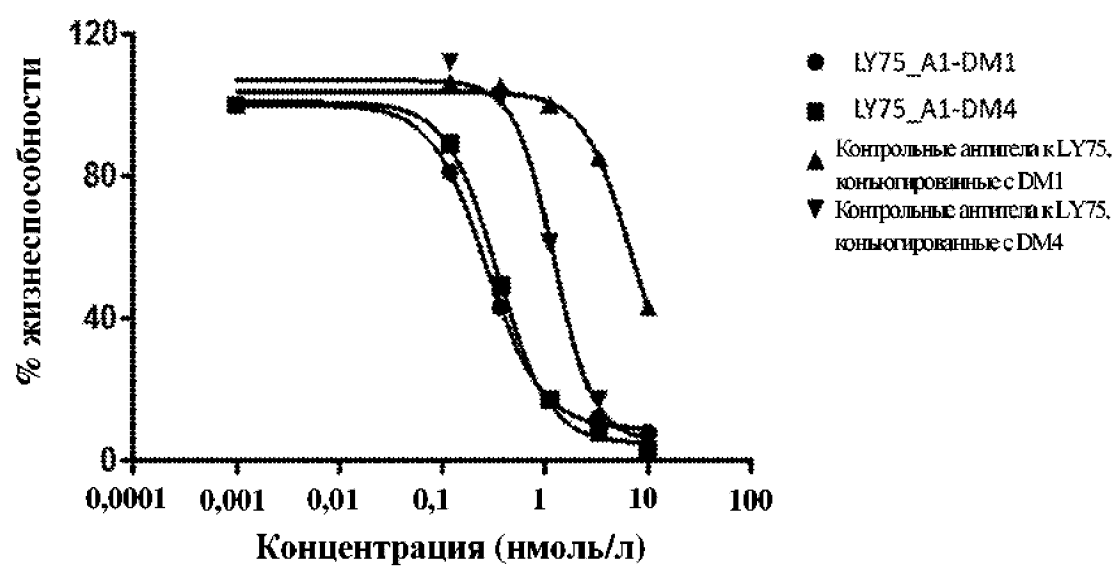
ФИГУРА 2

Фигура 3а

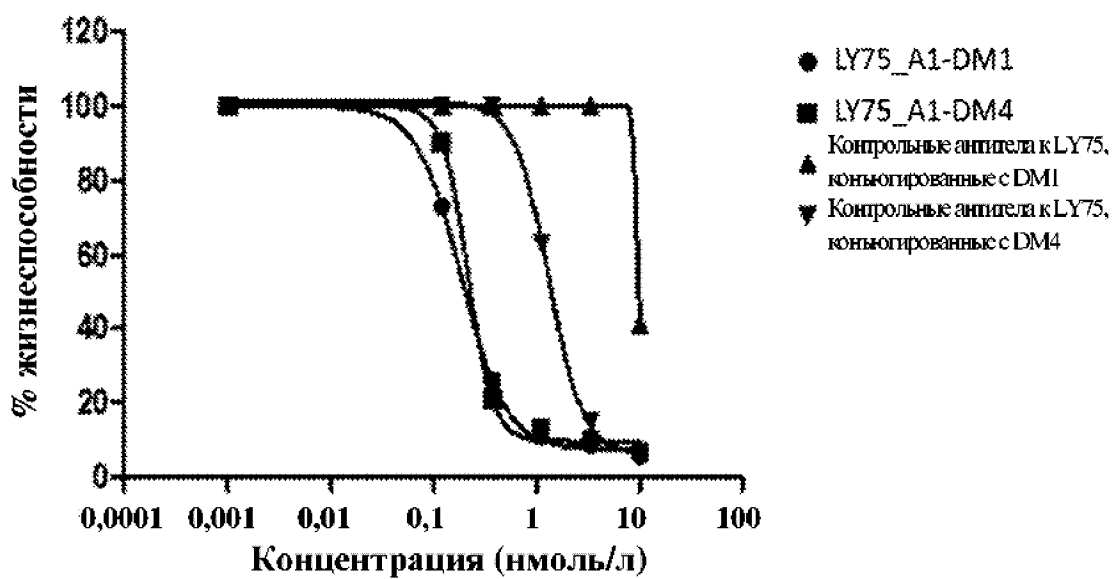




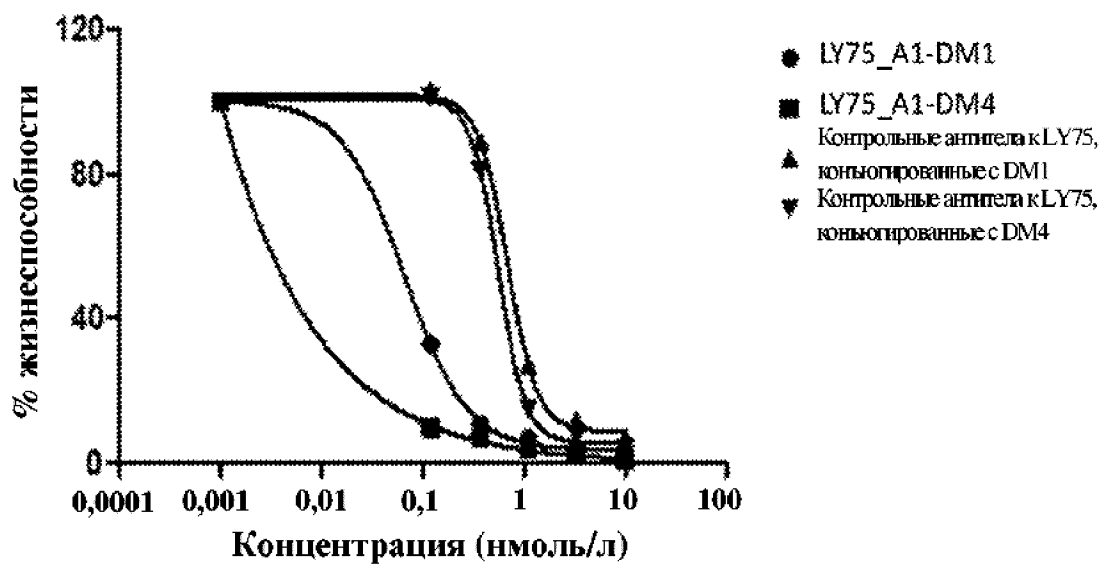
Фигура 3b



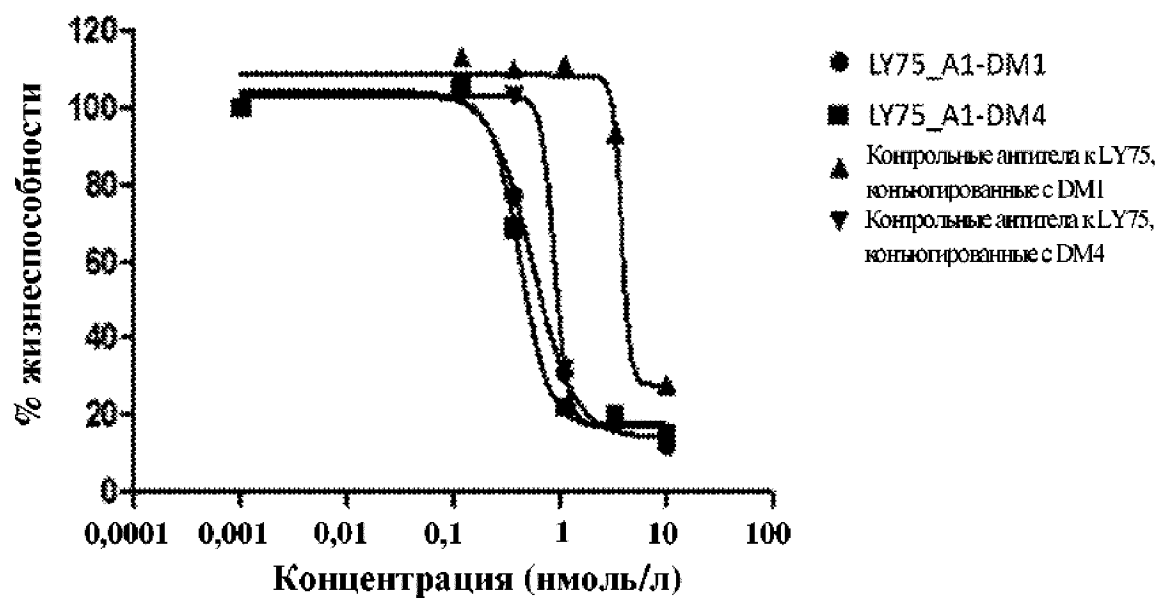
Фигура 3c



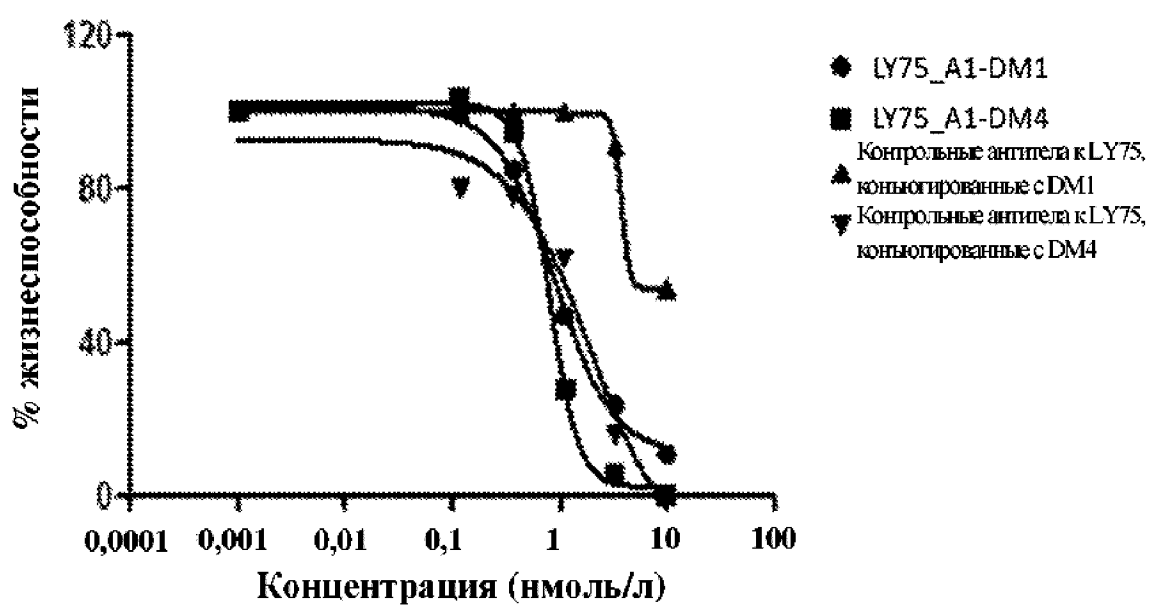
Фигура 3d



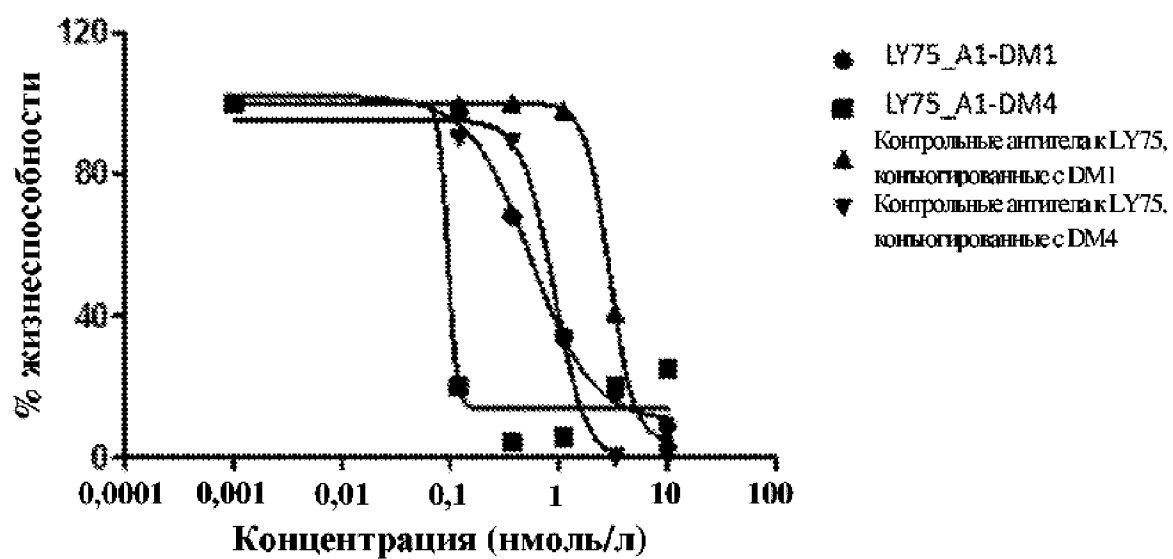
Фигура 3e



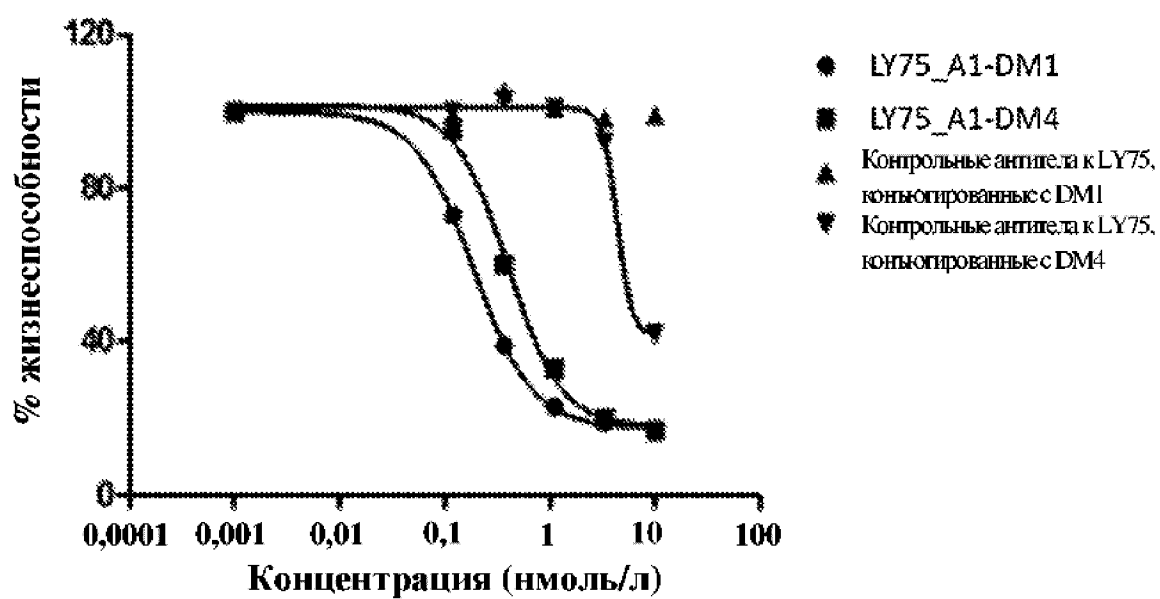
Фигура 3f



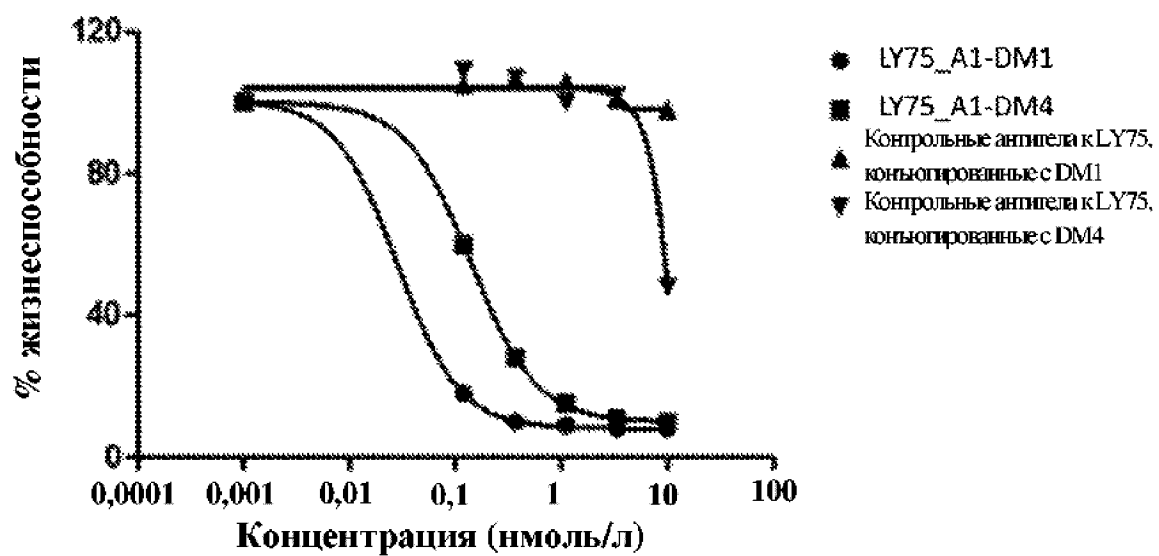
Фигура 3g



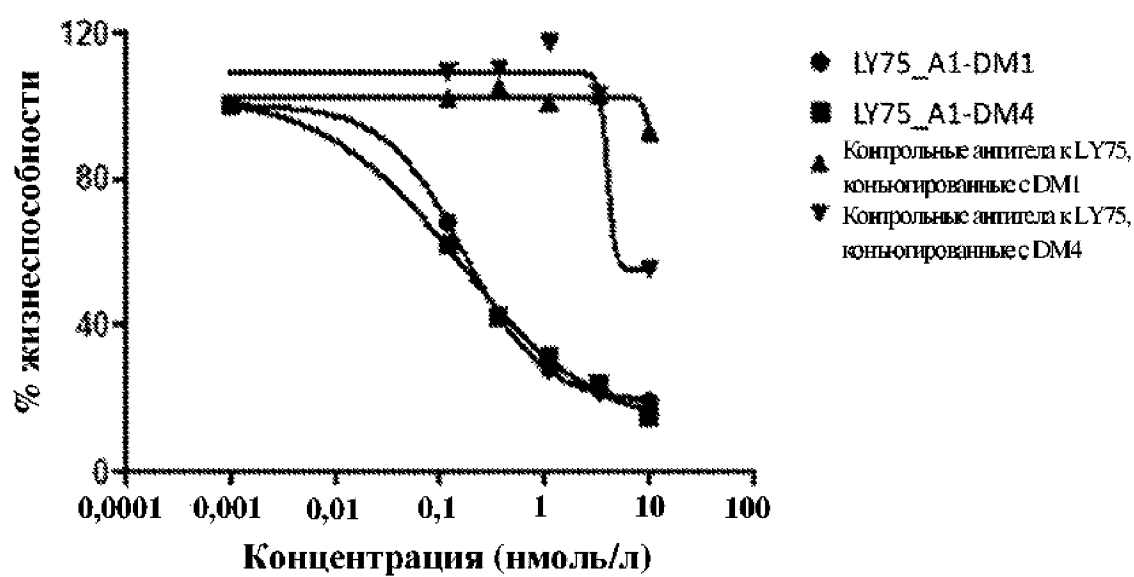
Фигура 3h



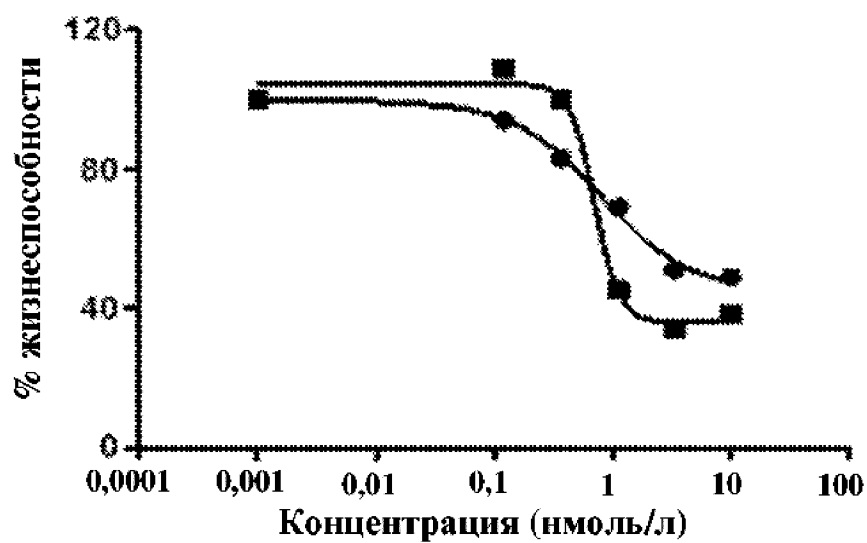
Фигура 3i



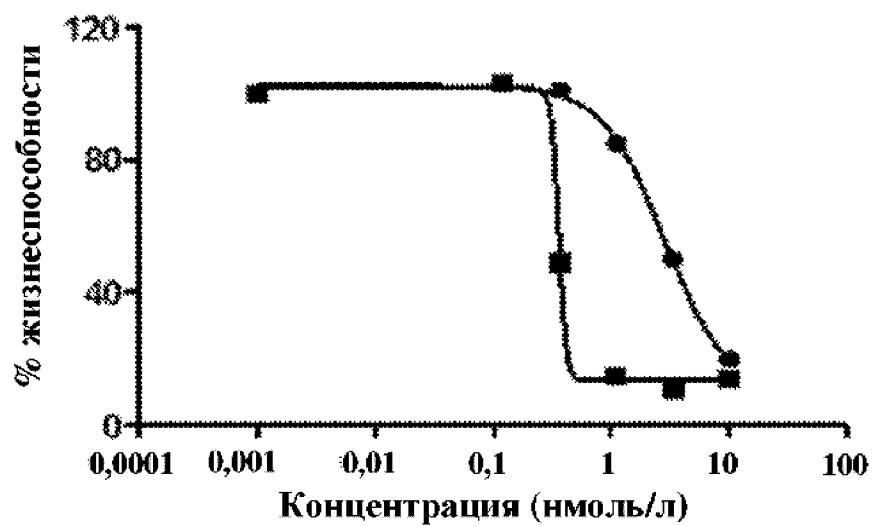
Фигура 3j



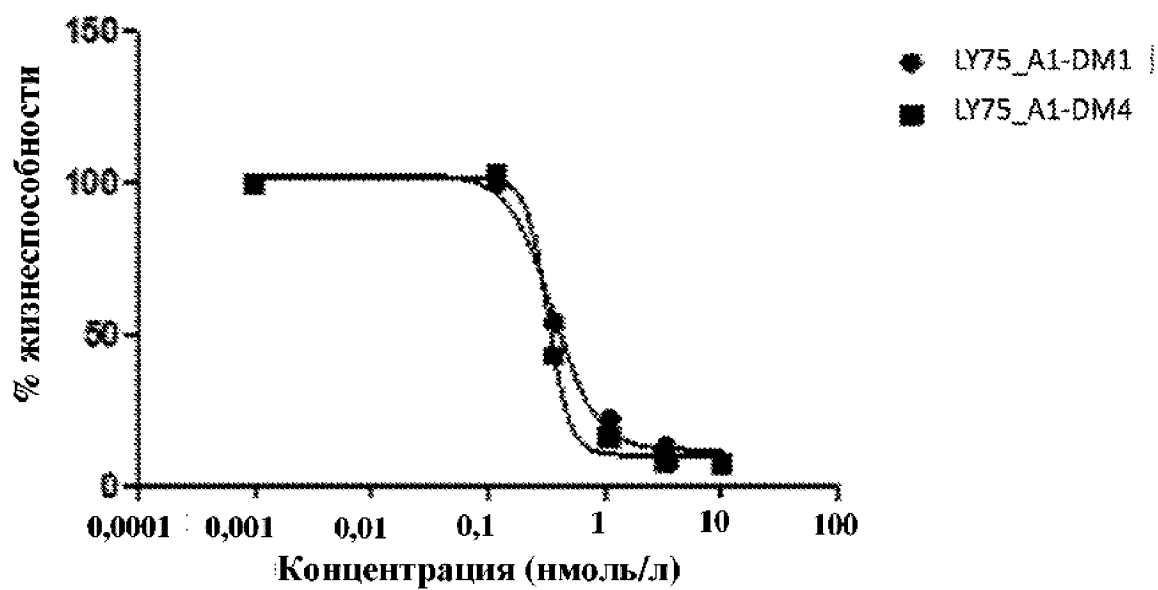
Фигура 3k



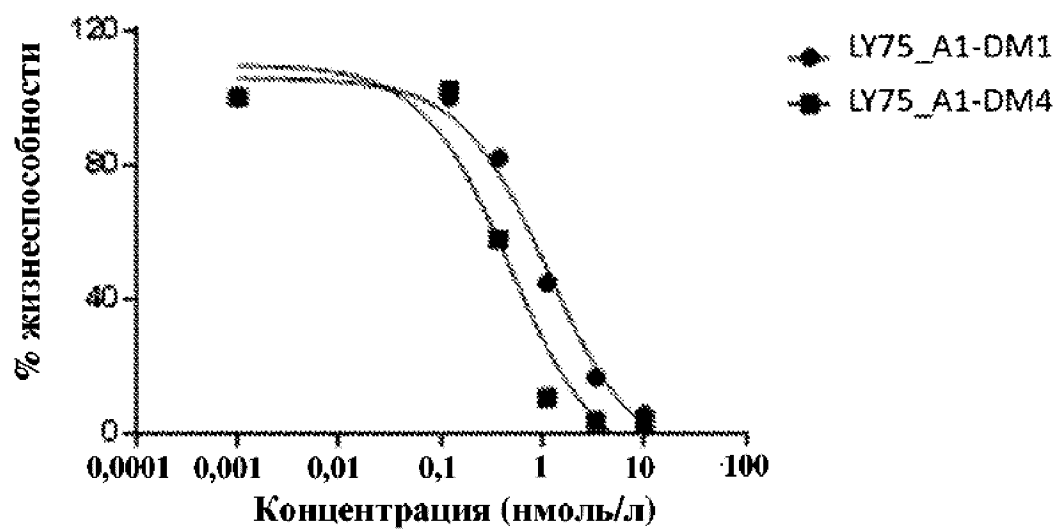
Фигура 3l



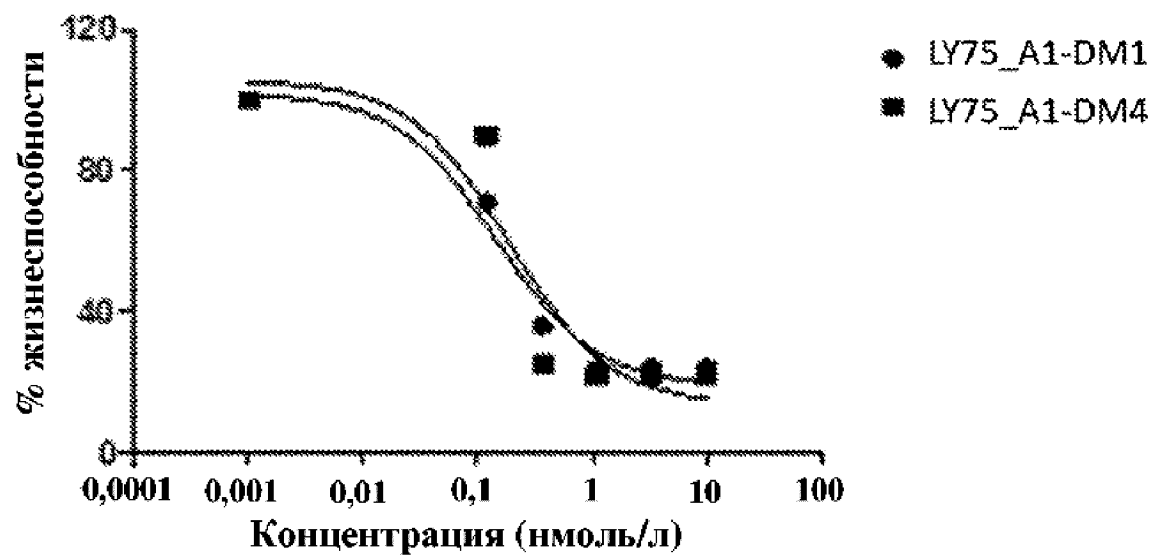
Фигура 3m



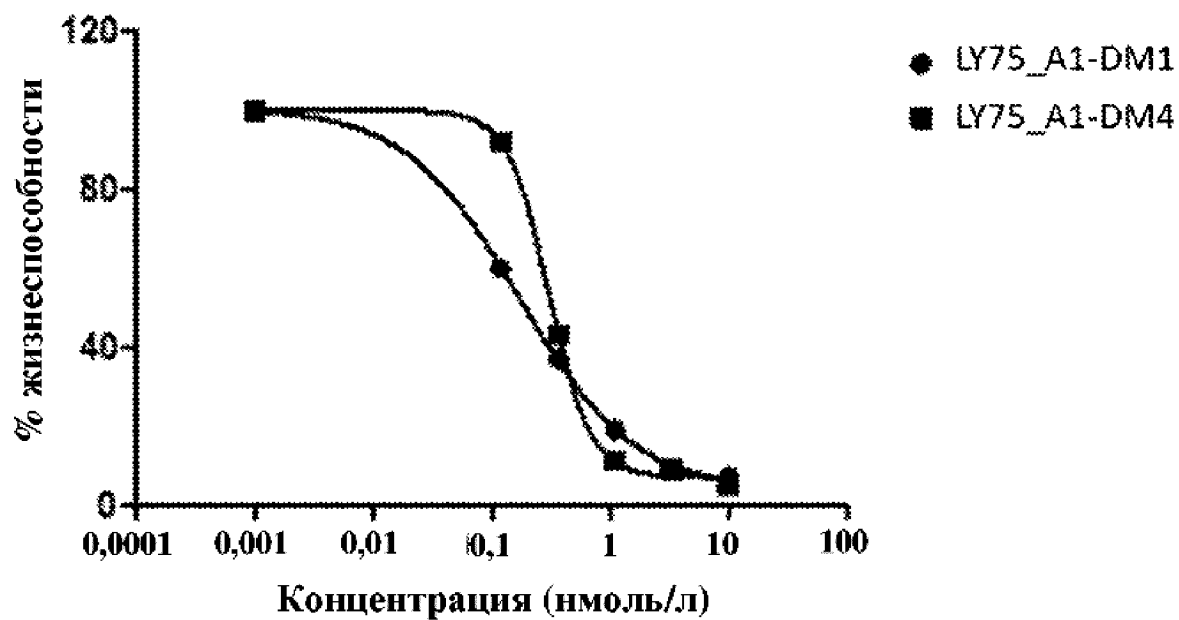
Фигура 3n



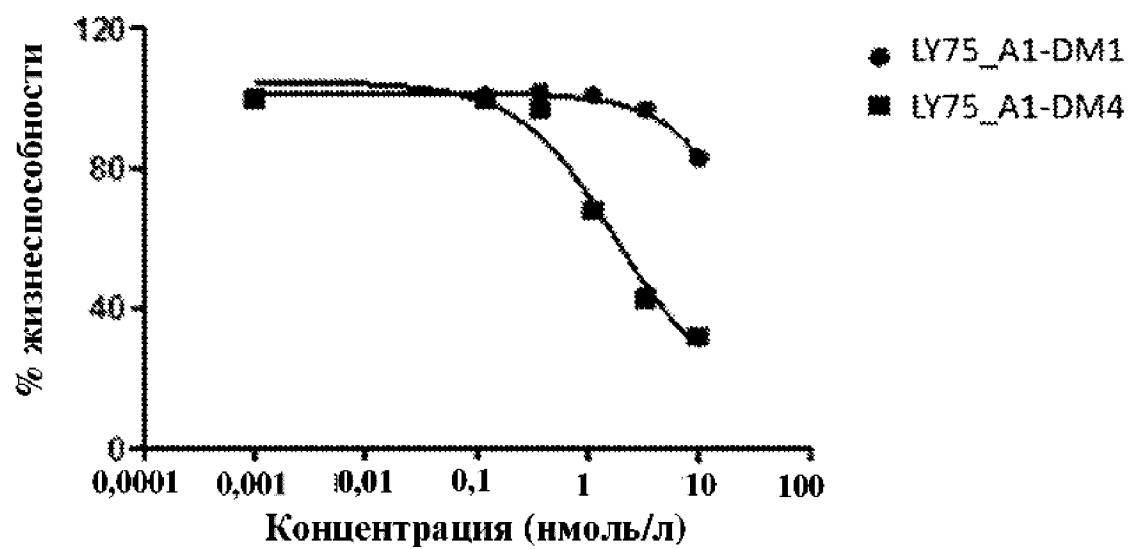
Фигура 3o



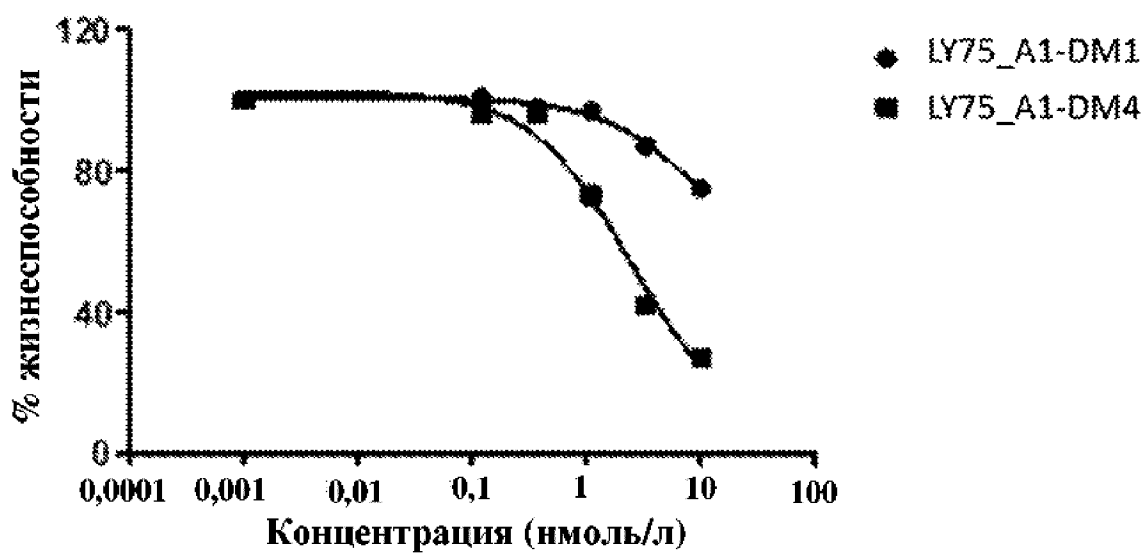
Фигура 3p



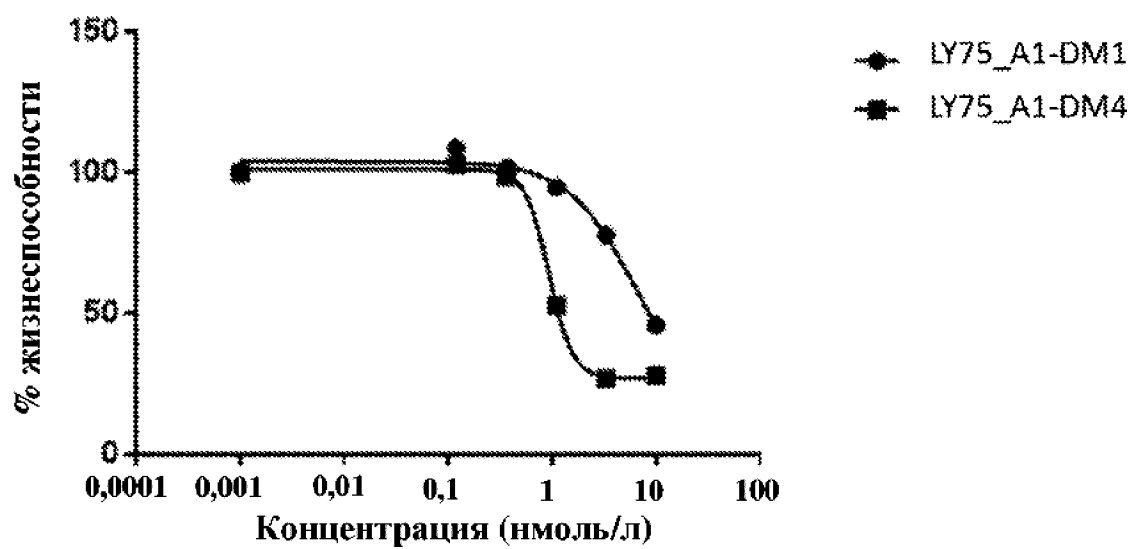
Фигура 3q



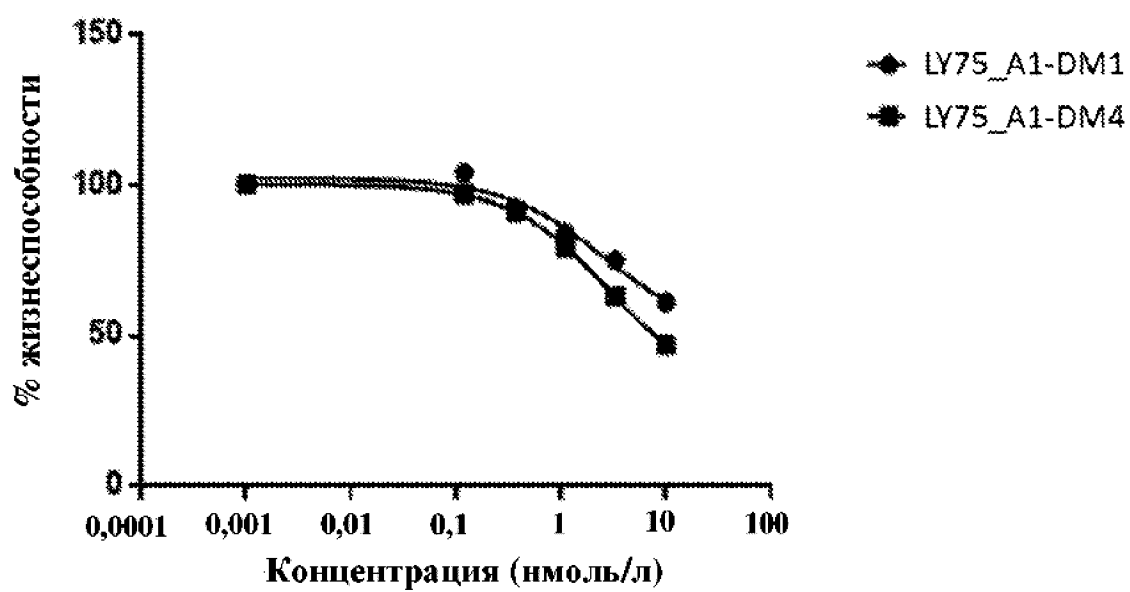
Фигура 3r



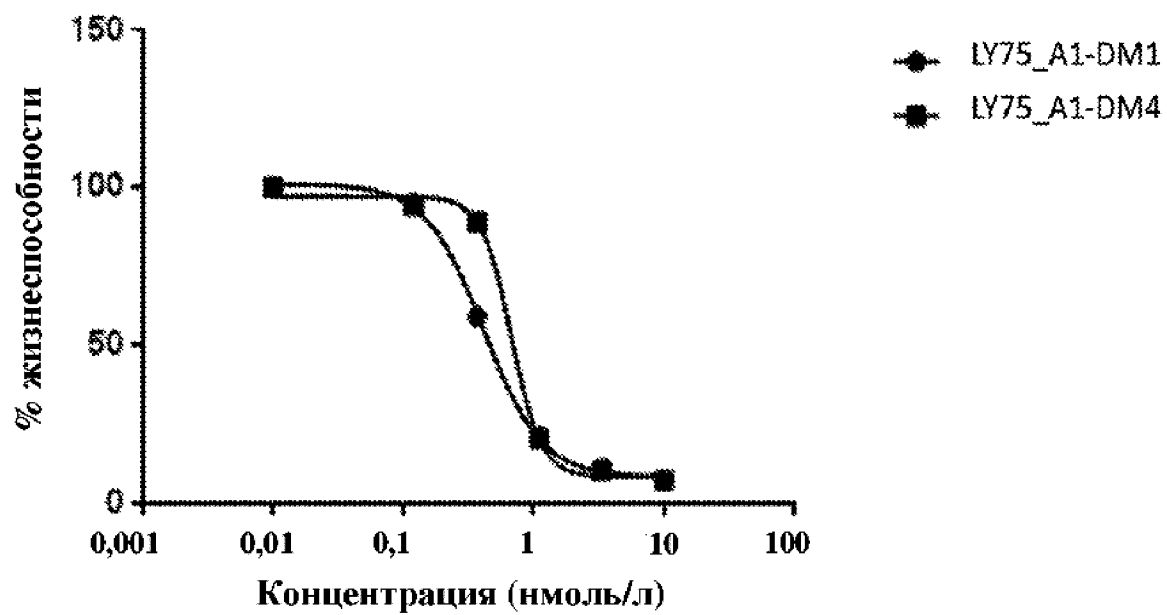
Фигура 3s



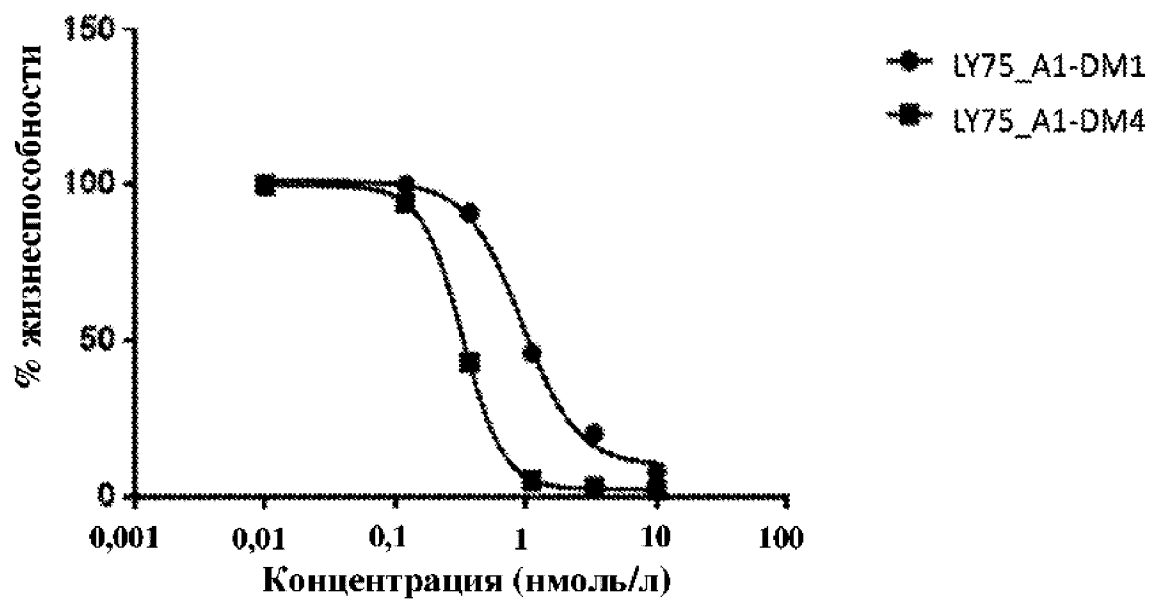
Фигура 3t



Фигура 3u

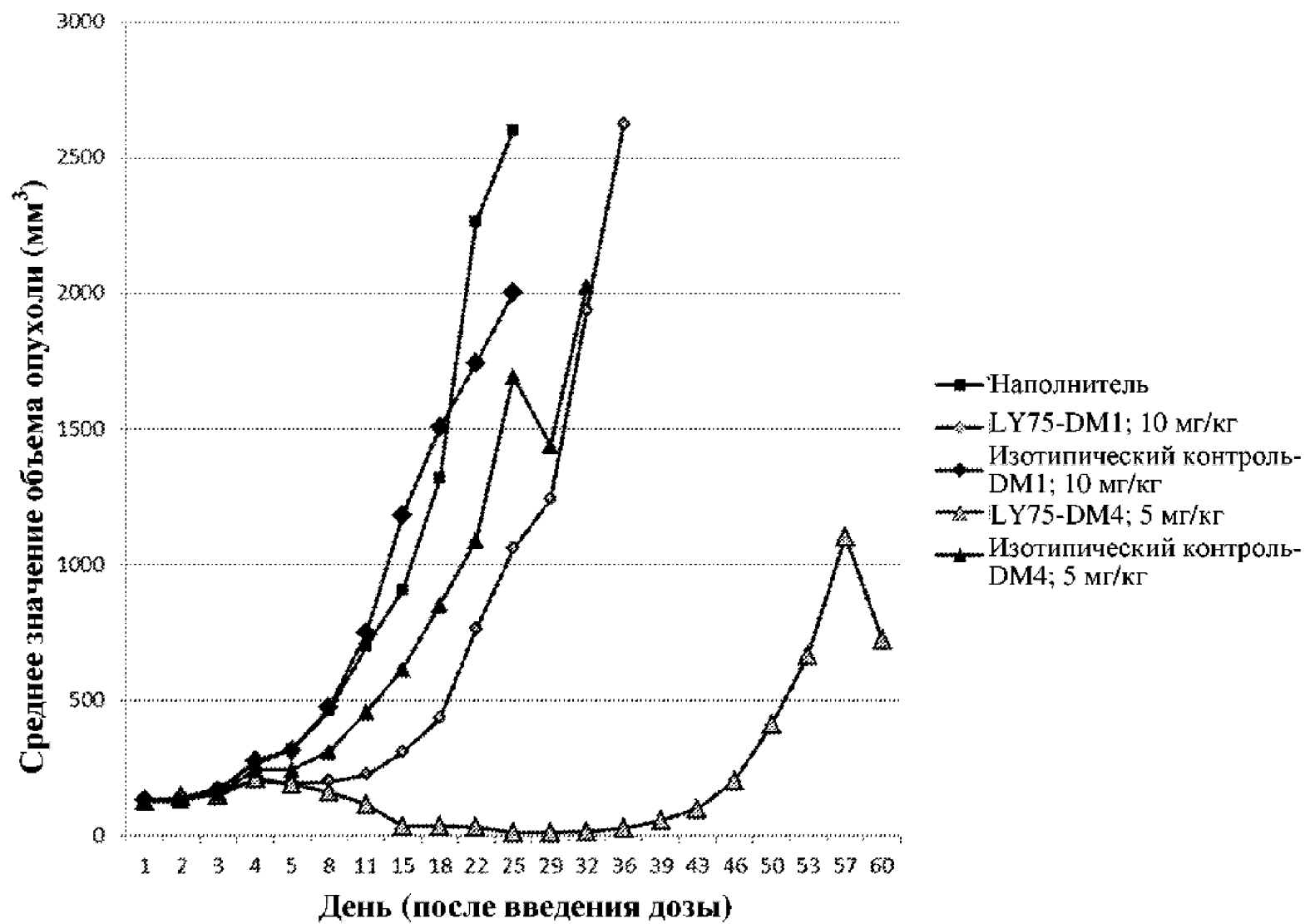


Фигура 3v

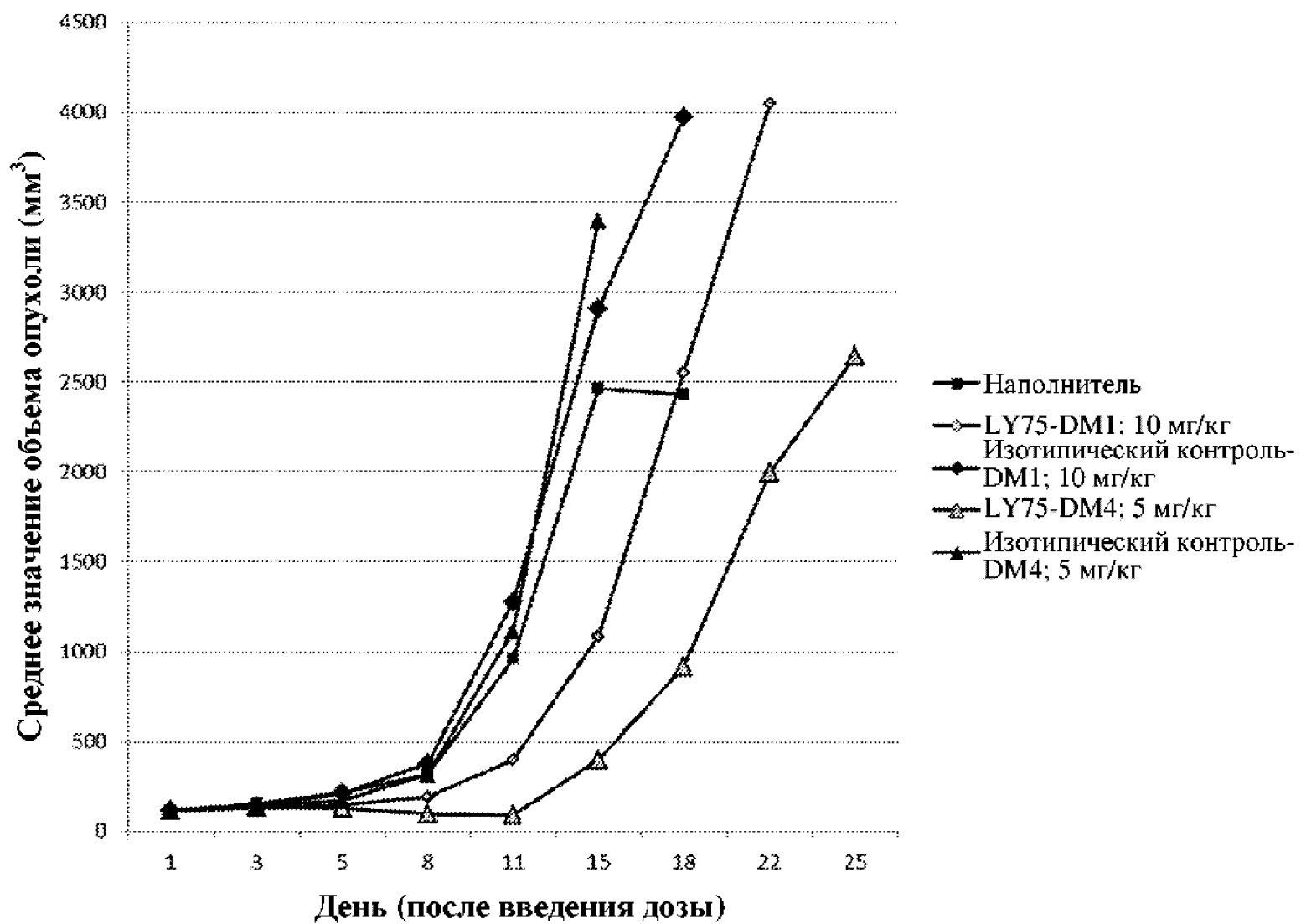


Фигура 3w

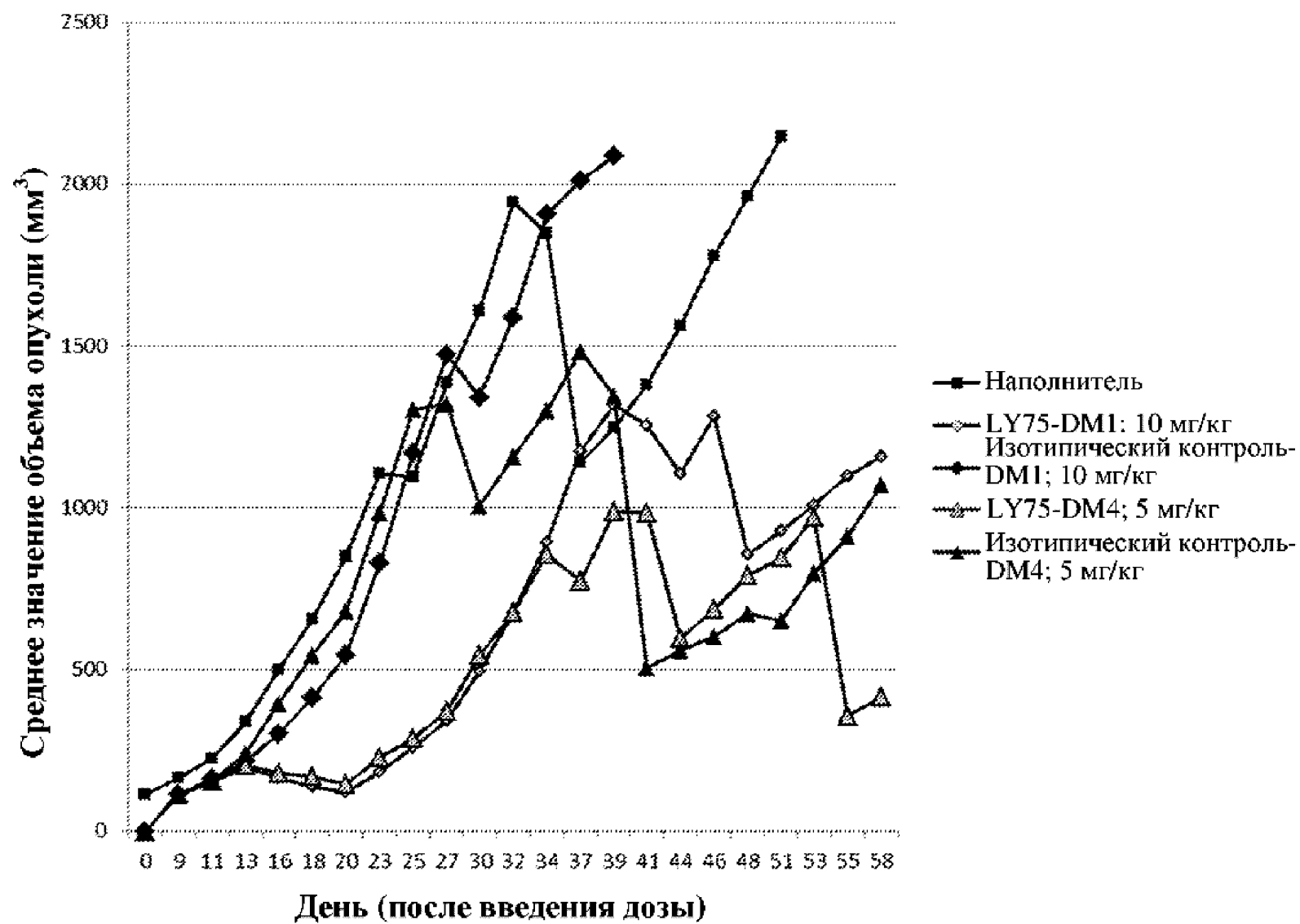
Фигура 4а



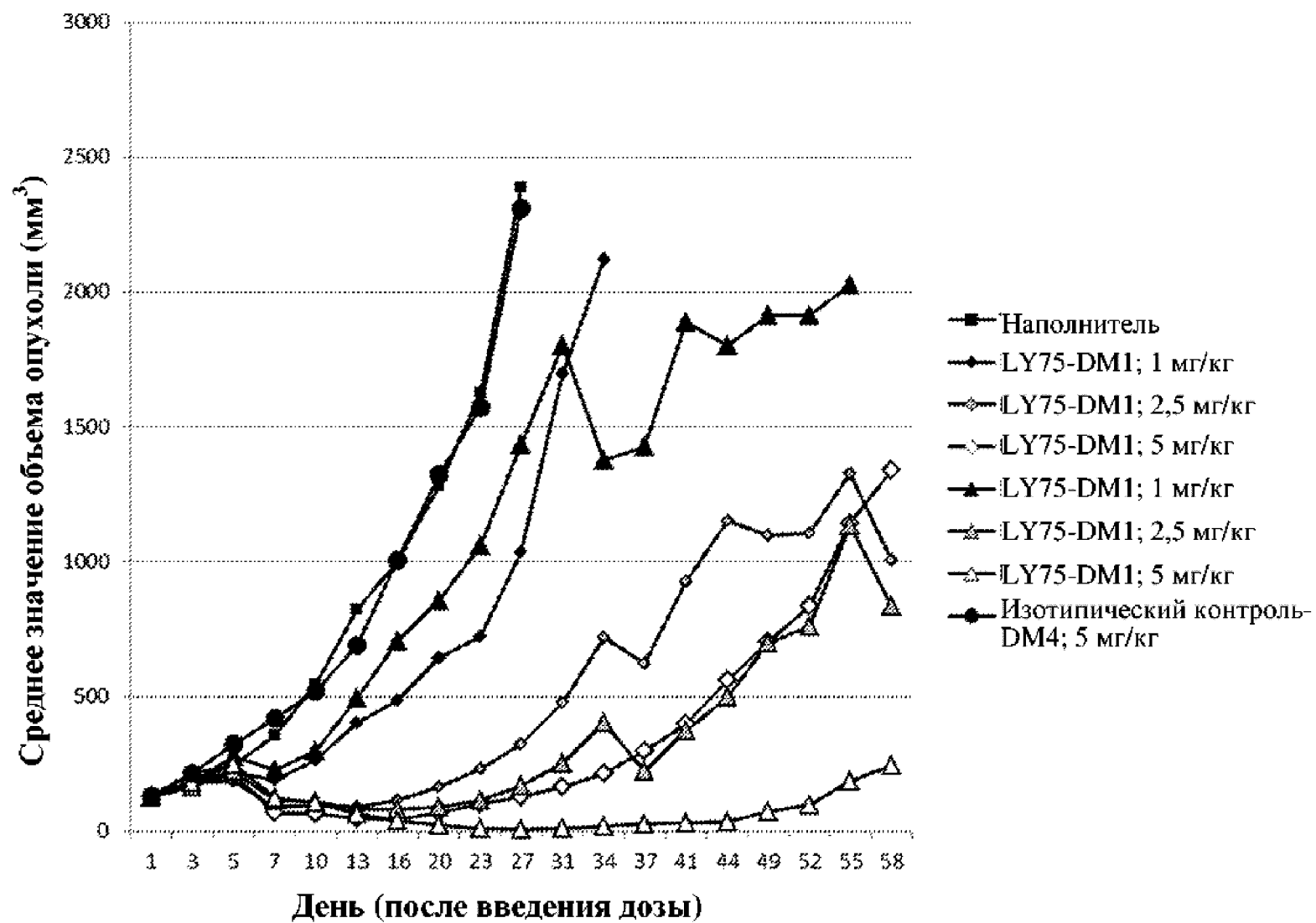
Фигура 4b



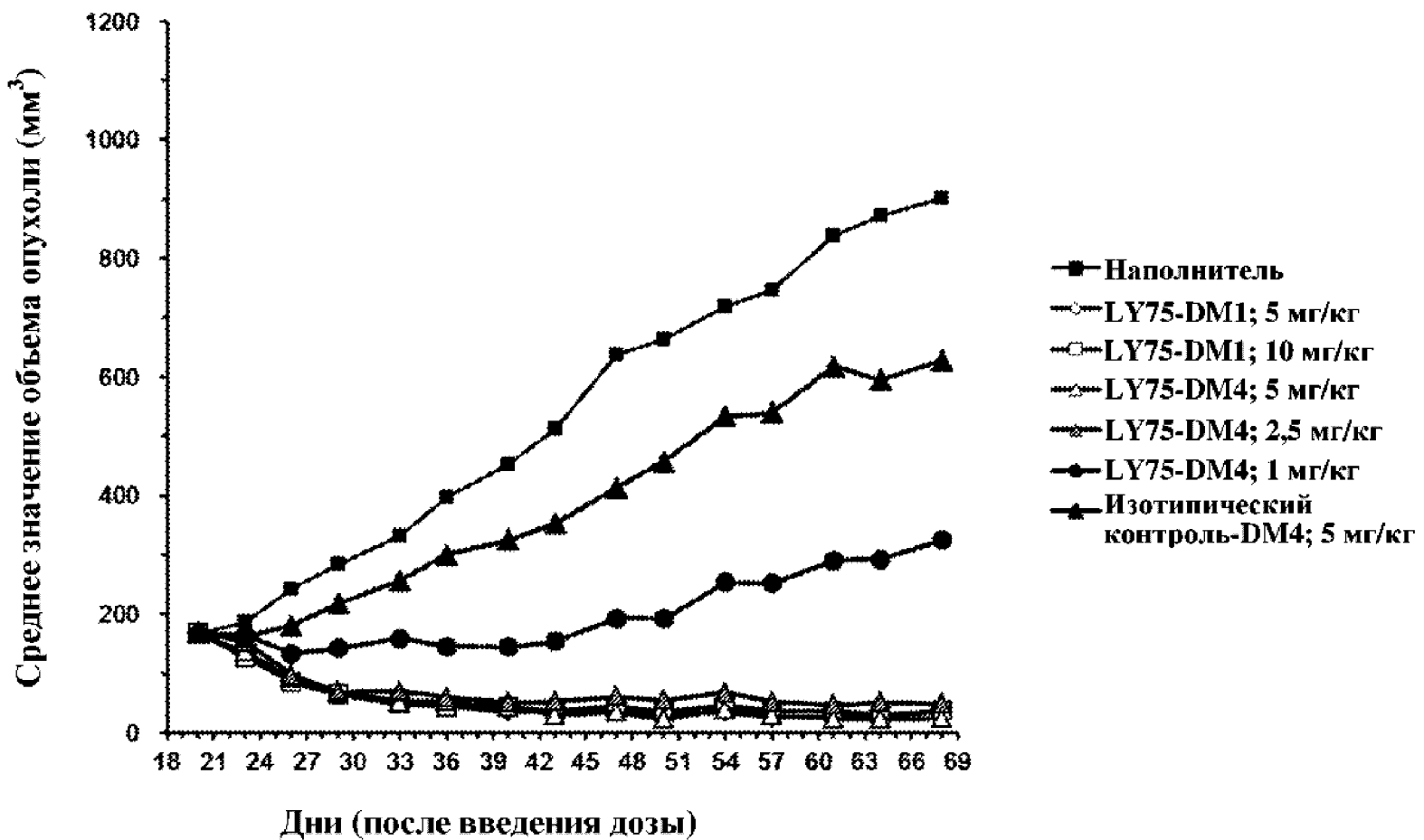
Фигура 4с



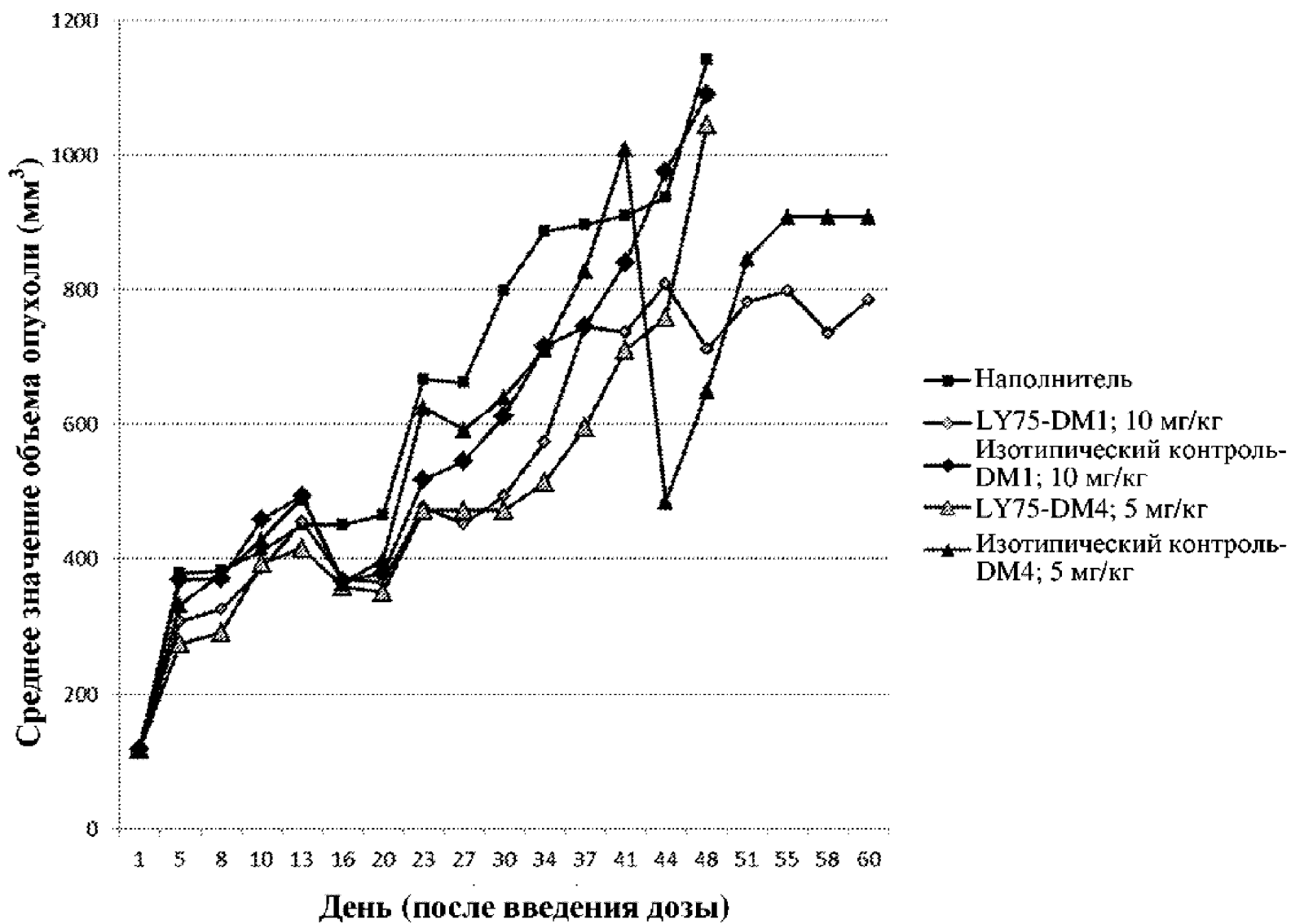
Фигура 4d

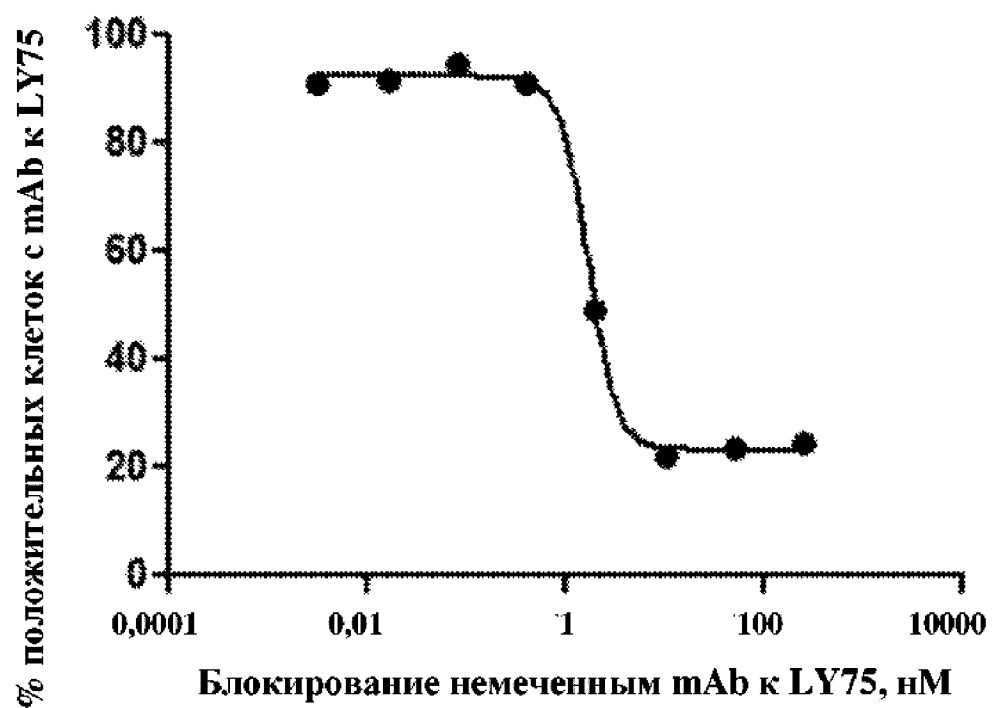


Фигура 4е



Фигура 4г

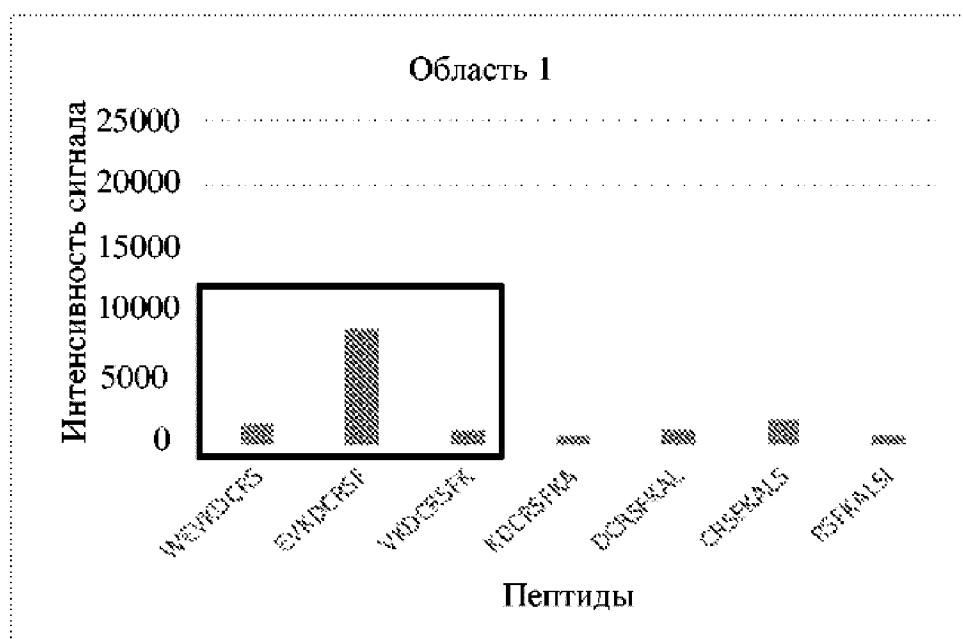




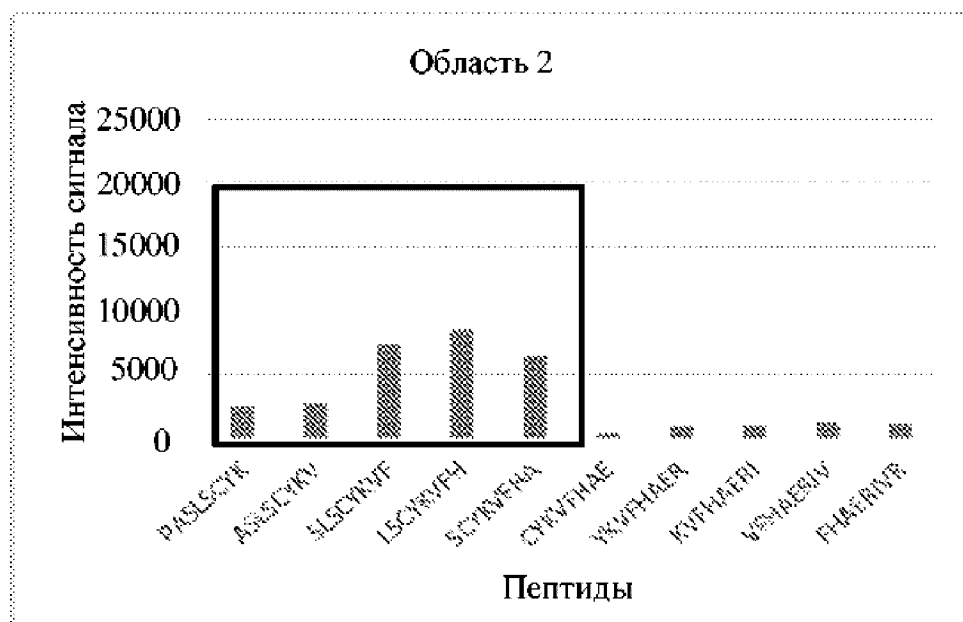
Фигура 5a



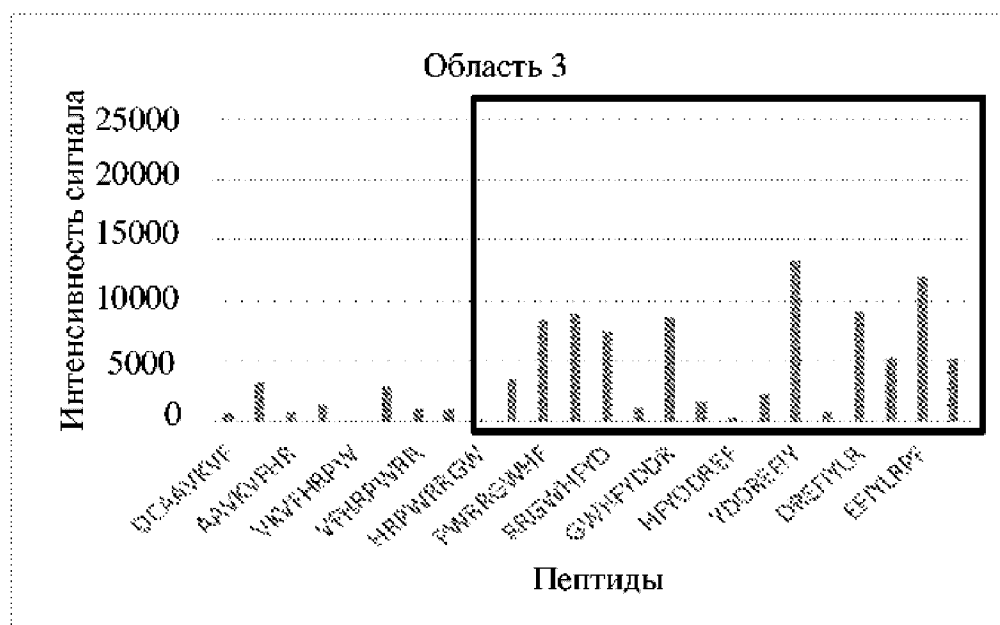
Фигура 5b



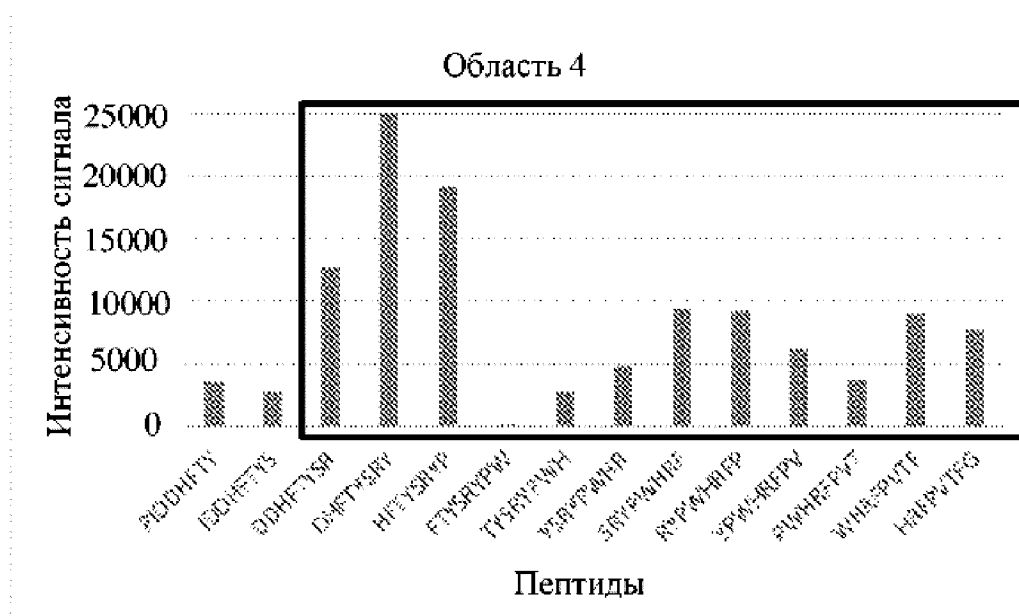
Фигура 6a



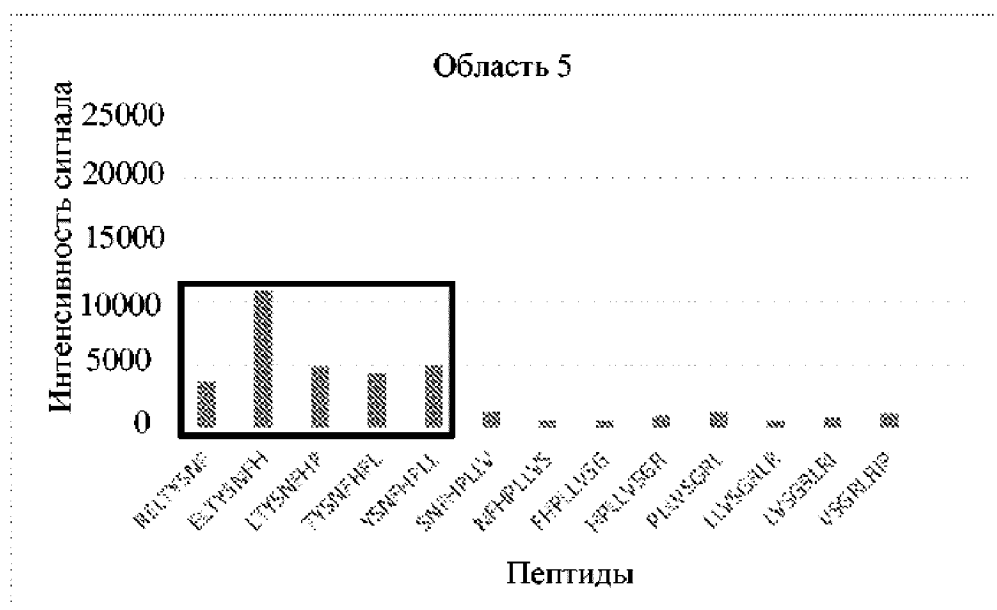
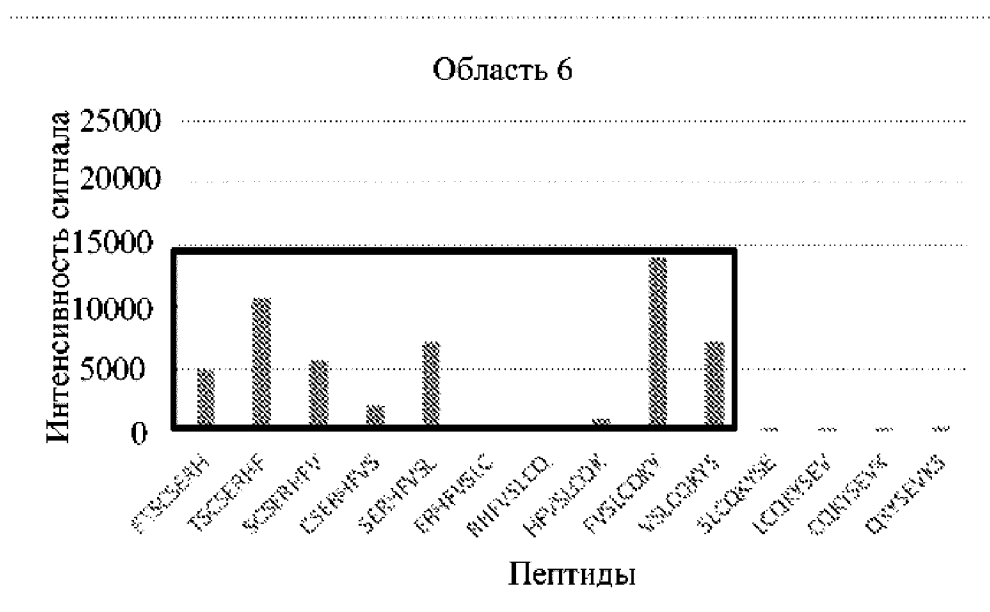
Фигура 6b

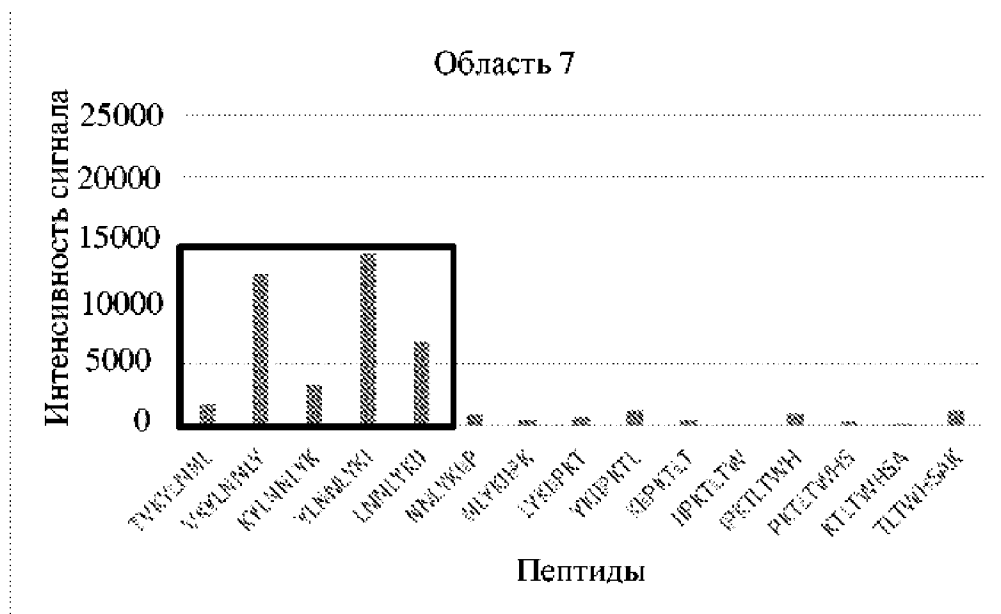
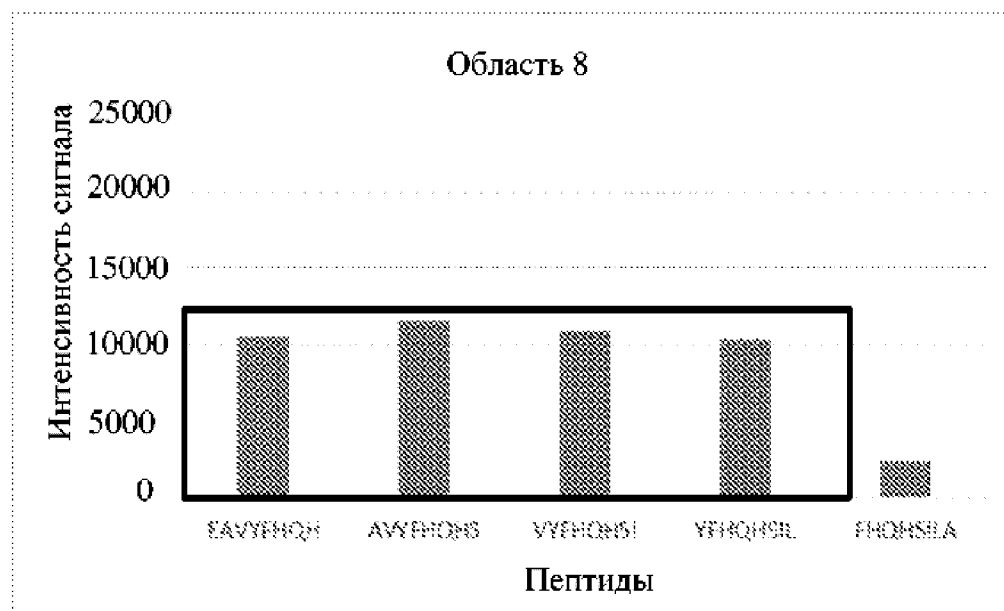


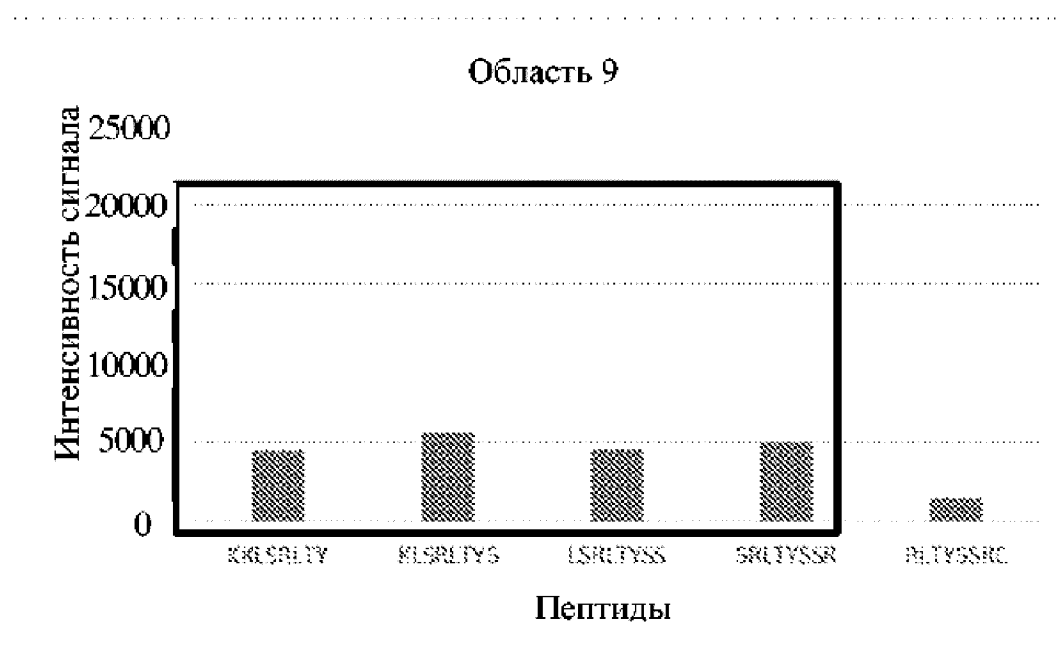
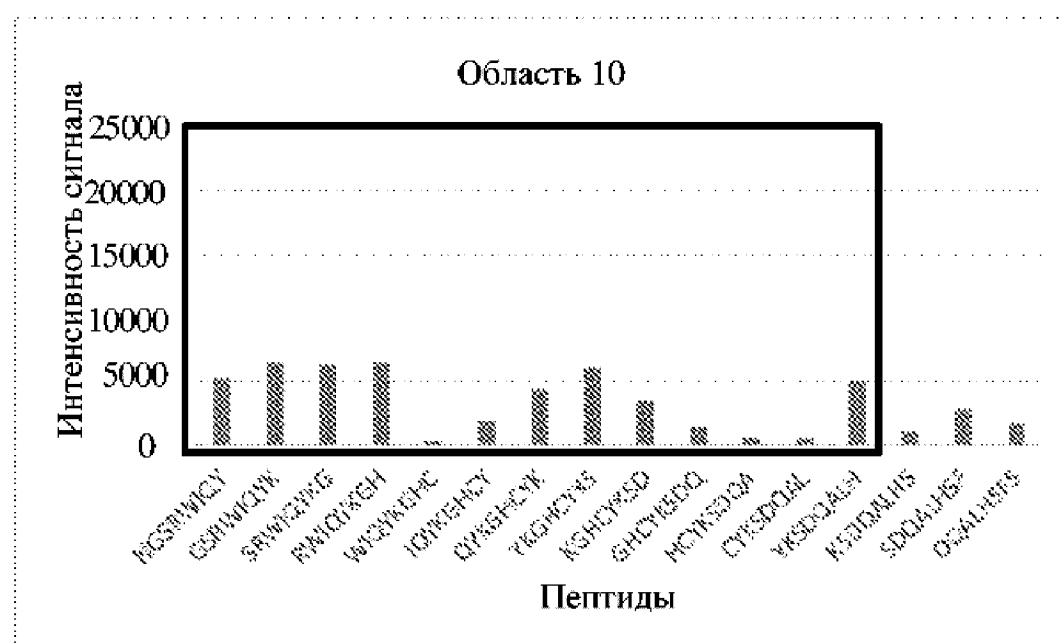
Фигура 6с



Фигура 6d

**Фигура 6e****Фигура 6f**

**Фигура 6g****Фигура 6h**

**Фигура 6i****Фигура 6j**

```

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      MRTGWATPRRPAGLLMLLEWFFDLAEPSSGRAANDPFTIVHGNTGKCIKPVYGWIVADDCD  60
MS-Пептиды_элюат1a          -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Пептиды_элюат1b          -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      ETEDKLWKWVSQHRLEFHLHSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWVKCEHHSLYGAAR 120
MS-Пептиды_элюат1a          ETEDKLWK-----CEHHSLYGAAR
MS-Пептиды_элюат1b          ETEDKLWK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      YRLALKDGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNSYGRPCFPFLIDGTWH 180
MS-Пептиды_элюат1a          -----DGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Пептиды_элюат1b          -----KGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
LC-Пептиды                   -----DGHGTAISNASDVWK-----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      HDCILDEDHSGPWCATTNLNIEYDRKWGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSW 240
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----WGICLKPENGCEDNWEK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KEAYVSCQNQGADLLSINSAAELTYLKEKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWS DHKPLNFL 300
MS-Пептиды_элюат1a          -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      NWDPPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCQAQLPYVCRKPLNNTVELTDVWTYS DTR 360
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      CDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEE 420
MS-Пептиды_элюат1a          -----LHNEDIKEE
MS-Пептиды_элюат1b          -----LHNEDIKEE
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      VWIGLKNINIPTLFQWSDGTEVTLTLYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGELGQWKVQSCEEK 480
MS-Пептиды_элюат1a          VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-Пептиды_элюат1b          VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

```

Фигура 7

```

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      LKYVCKRRKGEKLNDASSDKMCPFDGKWRHGETCYKIYEDEVVFGTNCNLTTISRFEQEY 540
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      LNDLMKKYDKSLRKYFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLEPASPGGCVM 600
MS-Пептиды_элюат1a          -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Пептиды_элюат1b          -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      STGKSVGKWEVKDCRSFKALSLCKRMSSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPSLSCYKVF 660
MS-Пептиды_элюат1a          -----SVGKWEVKDCR---ALSICKK-----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----WEVKDCRSFK-----PASLSCYKVF

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      HAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEFLEFLTDQFSGQHWWIGLNKRSP 720
MS-Пептиды_элюат1a          -----RNWEEAER-----RSP
MS-Пептиды_элюат1b          -----RNWEEAER-----RSP
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   HA-----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPF 780
MS-Пептиды_элюат1a          -----TPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Пептиды_элюат1b          DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----GWHFYDDR-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----PWRRGWHFYDDREFIYLRPF

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      ACDTKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRAIGHGPPLIEGSEYWFVADLHINYEAAVLYC 840
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      ASNESPLATITSFVGLKAIKNKIANISGGGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYFWHRFPVTF 900
MS-Пептиды_элюат1a          -----ISEWPIDDHFTYSR-----FPVTF
MS-Пептиды_элюат1b          -----ISEWPIDDHFTYSR-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----DDHFTYSRYFWHRFPVTF
                                  *****

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      GEECLYMSAKTWLIDLKPTDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYSFSDSAAKVQCSEQWIPFQN 960
MS-Пептиды_элюат1a          GEECLYMSAKTWLIDLKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-Пептиды_элюат1b          -----TWLIDLKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-Пептиды_элюат2a          -----TWLIDLKPTDCSTK-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----TWLIDLKPTDCSTK-----
LC-Пептиды                   G-----

```

Фиг. 7 (продолж.)

```

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KCFLEKIKPVSLTFSQASDTCESYGGTLPVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYE 1020
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGRLRIPENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSC 1080
MS-Пептиды_элюат1a          K-----ELTYSNFHPLLVSGRLRIPENFFEEESRYHCALILNLQK-----
MS-Пептиды_элюат1b          K-----YHCALILNLQK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----RELTYSNFHPLL-----FTSC-----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      SERHFSVSLCQKYSEVKSQTLQNASETVKYLNLYKIIIPKTLTWHSAKRECLKSNMQLVS
1140
MS-Пептиды_элюат1a          --HFVSLCQK-----QTLQNASETVK-----TLTWESAK-----
MS-Пептиды_элюат1b          --HFVSLCQK-----QTLQNASETVK-----TLTWESAK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   SERHFSVSLCQKYS-----TVKYLNLYKII-----
*****                               ***

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      ITDPYQQAFLSVQALLHNSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWAETNGQLEDCVVL 1200
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      DTDGFWKTVDCNDNQPGAICYSGNETEKEVKPVDVSVKCPSPVLNTPWIPFQNCYNFII 1260
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      TKNRHMATTQDEVHTKCKQLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFNMASWVMLGITYRN 1320
MS-Пептиды_элюат1a          -----SHILSIR-----
MS-Пептиды_элюат1b          --NRHMATTQDEVHTK-----SHILSIR-----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFRKVIIEAVYFQHSHILAC 1380
MS-Пептиды_элюат1a          -SLMWFDKTPLSYTHWR-----
MS-Пептиды_элюат1b          -SLMWFDK-----
MS-Пептиды_элюат2a          -SLMWFDK-----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----EAVYFQHSHIL-----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIOKKVTWYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLF 1440
MS-Пептиды_элюат1a          -----
MS-Пептиды_элюат1b          -----
MS-Пептиды_элюат2a          -----
MS-Пептиды_элюат2b          -----
LC-Пептиды                   -----

```

Фиг. 7 (продолж.)

```

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      LEDIVKRDGFPLWVGLSSHDSSESSFEWSDGSTFDYIPWKGQTSFGNCVLLDPKGTWKHE 1500
MS-Пептиды_элюат1a      -----
MS-Пептиды_элюат1b      -----
MS-Пептиды_элюат2a      -----
MS-Пептиды_элюат2b      -----
LC-Пептиды      -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPPAAKENGSRWIKYKGHCYKSDQALHSFSEAK 1560
MS-Пептиды_элюат1a      -----
MS-Пептиды_элюат1b      -----
MS-Пептиды_элюат2a      -----
MS-Пептиды_элюат2b      -----
LC-Пептиды      -----KKLSRLTYSS-C-----NGSRWIKYKGHCYKSDQALH-----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      KLCSEKDHDSATIVSIKDEDEENKFVSRMLRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVT 1620
MS-Пептиды_элюат1a      -----HDSATIVSIKDEDEENKFVSR-----
MS-Пептиды_элюат1b      -----HDSATIVSIKDEDEENKFVSR-----
MS-Пептиды_элюат2a      -----HDSATIVSIKDEDEENKFVSR-----
MS-Пептиды_элюат2b      -----
LC-Пептиды      -----

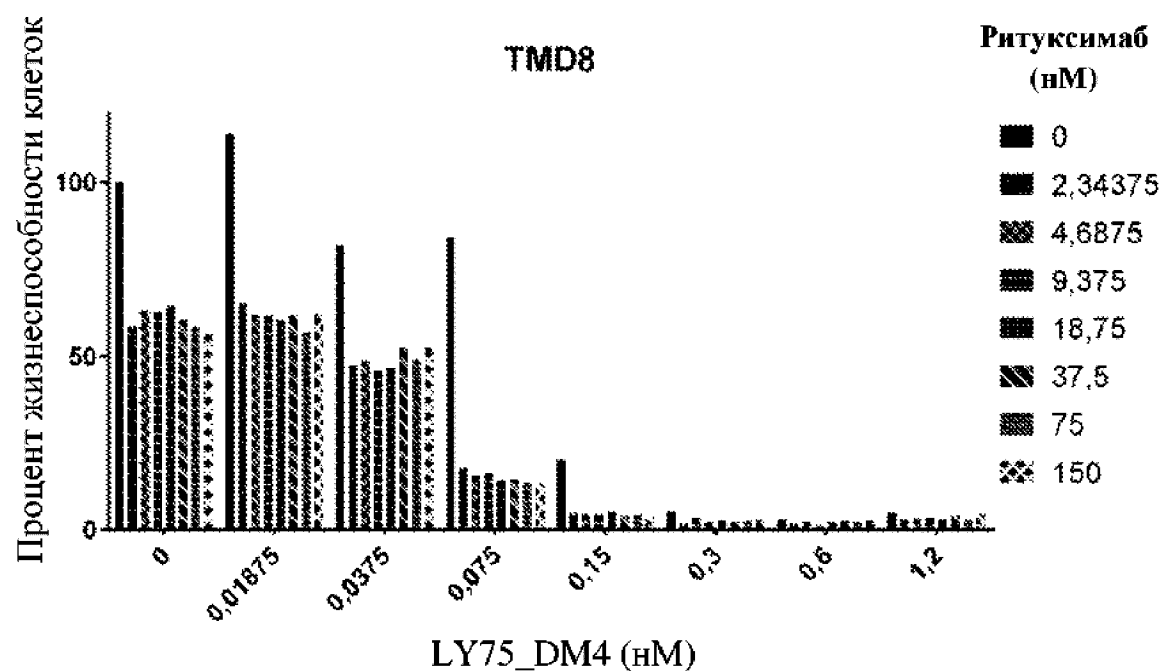
sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      FVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVCEHGFGRVVKVPLGPDYTAIAIIVATLSIL 1680
MS-Пептиды_элюат1a      -----VECEHGFGR-----
MS-Пептиды_элюат1b      -----VECEHGFGR-----
MS-Пептиды_элюат2a      -----
MS-Пептиды_элюат2b      -----
LC-Пептиды      -----

sp|060449|LY75_ЧЕЛОВЕКА      VLMGGLIWFLPQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPSPHD 1722
MS-Пептиды_элюат1a      -----
MS-Пептиды_элюат1b      -----
MS-Пептиды_элюат2a      -----
MS-Пептиды_элюат2b      -----
LC-Пептиды      -----

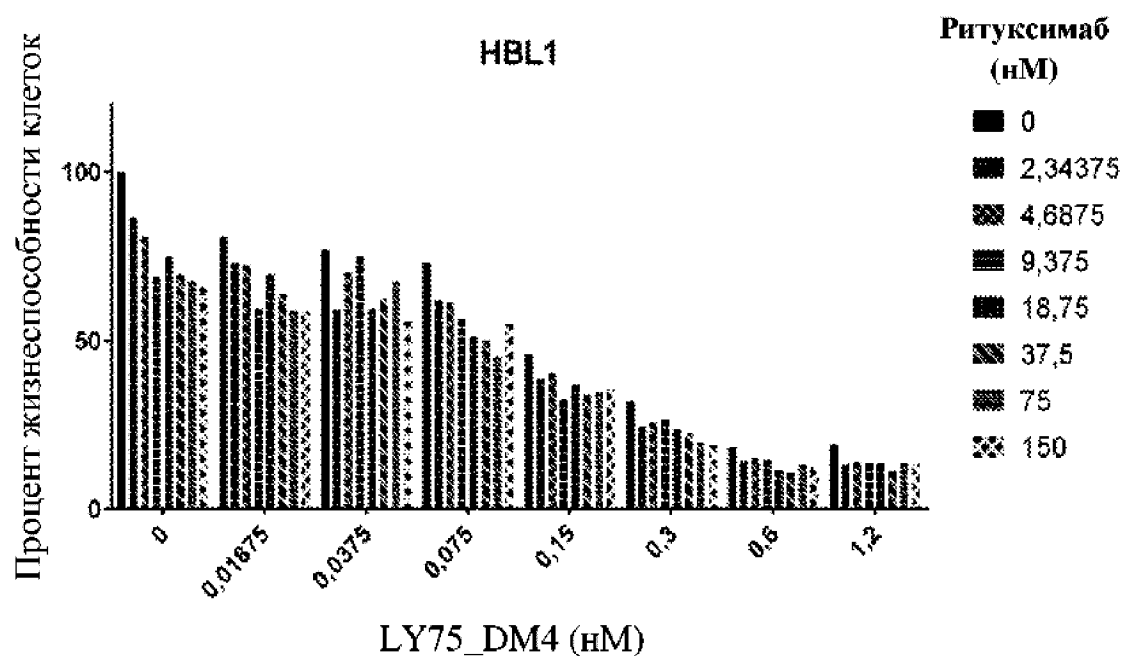
```

Фиг. 7 (продолж.)

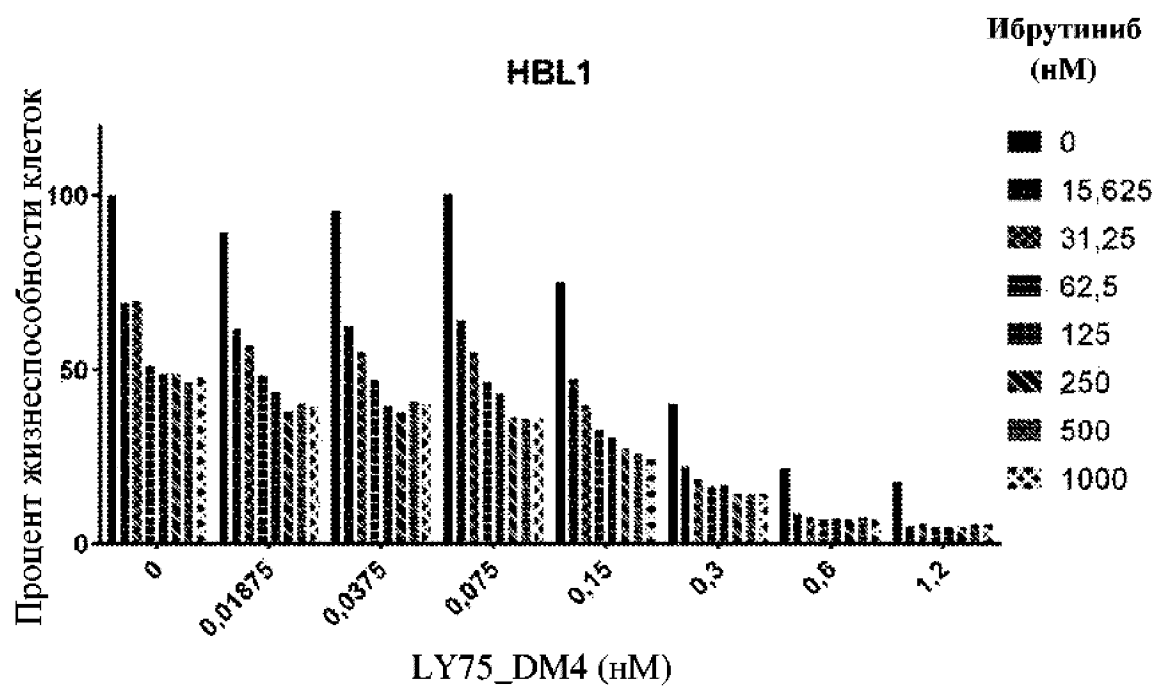
Фигура 8А



Фигура 8А



Фигура 8В



Фигура 9