

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034675**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.03.05**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/36** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201300016**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.06.15**

---

**(54) КОНЪЮГАТ ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ, ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА И ПРОЛИФЕРАЦИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТКАНЕВОЙ ФАКТОР, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 61/354,970; PA 2010 00529; 61/434,776;  
PA 2011 00039

**(56)** WO-A2-2005025623  
WO-A2-2004094475  
WO-A1-2008137382

**(32)** 2010.06.15; 2010.06.15; 2011.01.20;  
2011.01.20

BAIYANG WANG ET AL.: "Radiotherapy of Human Xenograft NSCLC Tumors in Nude Mice with a 90 Y-Labeled Anti-Tissue Factor Antibody", CANCER BIOTHERAPY & RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 20, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 300-309, XP55007882, ISSN: 1084-9785, DOI: 10.1089/cbr.2005.20.300 page 307, right-hand column, paragraph 2; figures 1-4; tables 1,2

**(33)** US; DK; US; DK

**(43)** 2013.06.28

**(86)** PCT/EP2011/059917

**(87)** WO 2011/157741 2011.12.22

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ГЕНМАБ А/С (DK)

JACKSON DOWDY ET AL.: "A Human Antibody-Drug Conjugate Targeting EphA2 Inhibits Tumor Growth In vivo", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 22, 15 November 2008 (2008-11-15), pages 9367-9374, XP002563032, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1933 figures 1-4

**(72)** Изобретатель:  
Сатейн Давид, Верплуген Сандра,  
Блекер Вим (NL), Лисбю Стен (DK),  
Винкел Ян ван де, Беркел Патрик ван,  
Паррен Пауль (NL)

**(74)** Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

WO-A2-2010066803

---

**(57)** Изобретение направлено на конъюгат для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, включающий антитело, связывающееся с тканевым фактором, и ауристин, конъюгированный с антителом через линкер, и применение предложенного конъюгата для лечения рака.

---

**B1**

**034675**

**034675 B1**

Изобретение касается конъюгатов антитело-препарат (ADCs), причем антитела связываются с эпитопом на тканевом факторе. Такие ADCs, в частности, применимы при лечении раковых, воспалительных и сосудистых заболеваний.

#### Уровень техники

Тканевой фактор (TF), также называемый тромбопластином, фактором III или CD142, представляет собой белок, который присутствует в субэндотелиальной ткани, тромбоцитах и лейкоцитах и необходим для запуска образования тромбина из зимогена -протромбина. Образование тромбина в конечном счете приводит к свертыванию крови. Тканевой фактор способствует клеткам в запуске каскада свертывания крови, при этом он действует как рецептор с высоким сродством для фактора свертывания крови VII (FVII), сериновой протеазы. Образующийся комплекс обеспечивает каталитическое событие, которое отвечает за запуск протеазного каскада свертывания крови посредством специфического ограниченного протеолиза. В отличие от других кофакторов этого протеазного каскада, которые циркулируют в виде нефункциональных предшественников, этот фактор является сильным инициатором, который полностью функционален при экспрессировании на поверхности клеток.

Тканевой фактор является рецептором на поверхности клеток для сериновой протеазы - фактора VIIa (FVIIa). Связывание FVIIa с тканевым фактором запускает сигнальные процессы внутри клетки, причем такая сигнальная функция играет роль в ангиогенезе. В то время как ангиогенез является нормальным процессом при росте и развитии, а также при заживлении ран, он также является важным шагом при переходе опухолей из состояния покоя в злокачественное состояние: когда раковые клетки обретают способность вырабатывать белки, участвующие в ангиогенезе, так называемые ангиогенные факторы роста, эти белки выделяются из опухоли в окружающие ткани и стимулируют разрастание новых кровеносных сосудов из существующих здоровых кровеносных сосудов по направлению и внутри опухоли. Как только новые кровеносные сосуды проникают в опухоль, она может быстро увеличиться в размере и вторгаться в местные ткани и органы. Через новые кровеносные сосуды раковые клетки также могут проникать в кровоток и обосновываться в других органах, образуя новые опухоли (метастазы).

Кроме того, TF играет роль в воспалении. Предполагается, что роль TF опосредуется свертыванием крови (A.J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" in Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440, No. 2, pp. 123-132). Соответственно, ингибирование TF, например, моноклональным антителом против TF, имеет значение в прерывании цикла свертывание крови-воспаление и способствует не только противовоспалительному действию, но и при сосудистых заболеваниях.

Экспрессия TF наблюдается при многих типах рака и связана с более агрессивным течением заболевания. Кроме того, TF человека также существует в виде растворимой альтернативной сплайс-формы - asHTF. Недавно было обнаружено, что asHTF способствует росту опухолей (Hobbs et al, 2007 Thrombosis Res. 120(2) S13-S21).

Несмотря на то, что достигнут значительный прогресс, остается потребность в улучшенных способах лечения серьезных заболеваний, например, в улучшенном лечении рака, воспалительных и сосудистых заболеваний на основе терапевтических антител.

Соответственно, целью настоящего изобретения является получение высокоспецифичных и эффективных конъюгатов антител против TF с препаратами, в частности, для применения при лечении рака.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение касается новых конъюгатов антител против TF с лекарственными препаратами, которые применимы для лечения рака, воспалительных и сосудистых заболеваний. Конъюгаты препарат-антитело против TF настоящего изобретения очень эффективно уничтожают клетки, экспрессирующие тканевой фактор (TF). Кроме того, конъюгаты препарат-антитело против TF обладают тем преимуществом, что они почти или совсем не ингибируют свертывание крови.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Совмещение последовательностей антител настоящего изобретения. SEQ ID NOs приведены в скобках справа от последовательности. Участки CDR1, CDR2 и CDR3 согласно Kabat обозначены следующим образом: последовательности, выделенные жирным курсивом, представляют участки CDR1; подчеркнутые последовательности представляют участки CDR2; последовательности, выделенные жирным шрифтом, представляют участки CDR3.

Фиг. 2. Последовательности IgG4 (SEQ ID NO: 81-82). SEQ ID NO: 81: аминокислотная последовательность области C<sub>H</sub> дикого типа IgG4 человека. Последовательности, выделенные курсивом, представляют участки C<sub>H1</sub>, подсвеченные последовательности представляют шарнирные участки, обычные последовательности представляют участки C<sub>H2</sub> и подчеркнутые последовательности представляют участки C<sub>H3</sub>. SEQ ID NO: 82: аминокислотная последовательность безшарнирной области C<sub>H</sub> IgG4 человека

Фиг. 3. Связывание NuMabs против TF с внеклеточным доменом TF. Связывание определяли методом ELISA. Значения EC<sub>50</sub> представляют средние из 3 экспериментов.

Фиг. 4. Связывание NuMabs против TF с мембраносвязанным TF на клетках MDA-MD-231. Связывание определяли методом FACS и антитела разделяли на три группы, представленные в а), б) и в), см. также WO 10/066803, где антитела разделяли на перекрестные группы.

Фиг. 5. Ингибирование связывания FVIIa антителами NuMabs против TF измеряли методом FACS.

Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания FVIIa в присутствии возрастающих концентраций HuMabs против TF. MFI для 100 нМ FVIIa в отсутствие HuMabs против TF составила 149,942. Представлен один репрезентативный эксперимент.

Фиг. 6. Дозозависимая индукция гибели клеток конъюгированными с анти-каппа-ЕТА' антителами HuMabs против TF.

Фиг. 7. Связывание HuMabs против TF и ADCs с рекомбинантным белком внеклеточного домена TF при определении методом ELISA. Представлен один репрезентативный эксперимент.

Фиг. 8. Дозозависимая индукция гибели клеток *in vitro* конъюгатами ADCs против TF. Представлен один репрезентативный эксперимент для каждой линии клеток: A431 (a), HPAF-II (b) и NCI-H441 (c). Данные представлены в виде процента выживания  $\pm$  S.E.M. из двойных лунок с клетками, обработанными ADCs против TF.

Фиг. 9. Эффективность ADCs против TF *in vitro* при терапевтическом лечении ксенотрансплантатов A431 и HPAF-II у мышей SCID. Мышей с привитыми опухолями A431 (A) или HPAF-II (B) обрабатывали ADCs против TF. Данные представлены в виде среднего объема опухолей  $\pm$  S.E.M. на группу (n = 7 мышей в группе).

Фиг. 10. Анализ ADCs и неконъюгированных IgG1 методом SDS-PAGE при тестировании на стабильность. Образцы анализировали методом SDS-PAGE в начале исследования (t=0) (a-d) или после хранения при 5°C и < -65°C в течение трех месяцев (e-h). (a, c) Дорожки 1, 9: маркеры молекулярного веса (MW), дорожка 2: внутренний контроль на IgG1, дорожка 3: HuMab-TF-098, дорожка 4: HuMab-TF-098-vcMMAE, дорожка 5: HuMab-TF-098-mcMMAF, дорожка 6: HuMab-TF-011, дорожка 7: HuMab-TF-011-vcMMAE, дорожка 8: HuMab-TF-mcMMAF. (b, d) Дорожки 1, 9, 10: маркеры MW, дорожка 2: внутренний контроль на IgG1, дорожка 3: HuMab-TF-111, дорожка 4: HuMab-TF-111-vcMMAE, дорожка 5: HuMab-TF-111-mcMMAF, дорожка 6: IgG1-b12, дорожка 7: IgG1-b12-vcMMAE, дорожка 8: IgG1-b12-mcMMAF. (e, g) Дорожки 1, 11: маркеры MW, дорожка 2: внутренний контроль на IgG1, дорожка 3: HuMab-TF-098-vcMMAE через 3 месяца при < -65°C, дорожка 4: HuMab-TF-098-vcMMAE через 3 месяца при 5°C, дорожка 5: HuMab-TF-098-mcMMAF через 3 месяца при < -65°C, дорожка 6: HuMab-TF-098-mcMMAF через 3 месяца при 5°C, дорожка 7: HuMab-TF-011-vcMMAE через 3 месяца при < -65°C, дорожка 8: HuMab-TF-011-vcMMAE через 3 месяца при 5°C, дорожка 9: HuMab-TF-011-mcMMAF через 3 месяца при < -65°C, дорожка 10: HuMab-TF-011-mcMMAF через 3 месяца при 5°C. (f, h) Дорожки 1, 11, 12: маркеры MW, дорожка 2: внутренний контроль на IgG1, дорожка 3: HuMab-TF-111-vcMMAE через 3 месяца при < -65°C, дорожка 4: HuMab-TF-111-vcMMAE через 3 месяца при 5°C, дорожка 5: HuMab-TF-111-mcMMAF через 3 месяца при < -65°C, дорожка 6: HuMab-TF-111-mcMMAF через 3 месяца при 5°C, дорожка 7: IgG1-b12-vcMMAE через 3 месяца при < -65°C, дорожка 8: IgG1-b12-vcMMAE через 3 месяца при 5°C, дорожка 9: IgG1-b12-mcMMAF через 3 месяца при < -65°C, дорожка 10: IgG1-b12-mcMMAF через 3 месяца при 5°C. Для невозможных условий указаны размеры различных комбинаций тяжелой цепи (H) - легкой цепи (L): 148 кД (HNLL), 125 кД (HNL), 99 кД (HN), 67 кД (HL), 51 кД (H) и 25 кД (L).

Фиг. 11. Высокоэффективная эксклюзионная хроматография (HP-SEC): профили HuMab-TF-098-vcMMAE (a), HuMab-TF-098-mcMMAF (b), HuMab-TF-011-vcMMAE (c), HuMab-TF-011-mcMMAF (d), HuMab-TF-111-vcMMAE (e), HuMab-TF-111-mcMMAF (f), IgG1-b12-vcMMAE (g) и IgG1-b12-mcMMAF (h) в начале исследования и после хранения при < -65°C или 5°C в течение трех месяцев.

Фиг. 12. Анализ связывания ADCs и неконъюгированного IgG1 с TF-ECDFHis для теста на стабильность. Образцы подвергали анализу на связывание в начале исследования (t=0) и после хранения при = 5°C и < -65°C в течение трех месяцев.

Фиг. 13. Зависимость доза-эффект ADCs против TF *in vivo* при терапевтической обработке ксенотрансплантатов HPAF-II у мышей SCID. Мышей с привитыми опухолями HPAF-II обрабатывали ADCs против TF с vcMMAE. Данные представлены в виде среднего объема опухолей  $\pm$  S.E.M. на группу (n = 8 мышей в группе).

### Раскрытие сущности изобретения

#### Определения

Термины "тканевой фактор", "TF", "CD142", "антиген тканевого фактора", "антиген TF" и "антиген CD142" используются здесь взаимозаменяемо и, если не указано иначе, охватывают любые варианты, изоформы и видовые гомологи тканевого фактора человека, которые в природе экспрессируются клетками или экспрессированы на клетках, трансфицированных геном тканевого фактора. Тканевой фактор может представлять собой последовательность с номером доступа NP 001984 в Genbank, которая использовалась в примере 1.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеидов, состоящих из двух пар полипептидных цепей - одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре цепи связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. Например, см. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из варибельной области тяже-

лой цепи (сокращенно  $V_H$ ) и константной области тяжелой цепи ( $C_H$ ). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь обычно состоит из вариательной области легкой цепи (сокращенно  $V_L$ ) и константной области легкой цепи ( $C_L$ ). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  дополнительно подразделяются на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образовывать петли определенной структуры), которые также именуется определяющими комплементарность участками (CDRs), вперемежку с более консервативными участками, которые именуется каркасными участками (FRs). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  обычно состоит из трех CDRs и четырех FRs, расположенных в следующем порядке от N-конца к C-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Обычно нумерация аминокислотных остатков в этих участках осуществляется согласно методу, описанному в Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (такие выражения, как нумерация остатков вариательного домена по Кабату или согласно Кабату относятся к этой системе нумерации для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи). По этой системе нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньше или больше аминокислот в соответствии с укорочением или вставками в участки FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остатка 52a по Кабату) после остатка 52 в CDR2  $V_H$  и вставку нескольких остатков (например, остатков 82a, 82b, 82c и т.д. согласно Кабату) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кабату для данного антитела можно определить путем совмещения гомологичных участков последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Кабату.

Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному того или другого, которые обладают способностью к специфическому связыванию с антигеном при обычных физиологических условиях с весьма значительным временем полужизни, как-то по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 45 мин, по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, примерно 24 ч или больше, 48 ч или больше, 3, 4, 5, 6, 7 или больше дней и т.д., или любым другим соответствующим функционально-определенным временем (как-то временем, достаточным для индукции, запуска, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или временем, достаточным для запуска антителом эффекторной активности). Вариабельные участки тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (как-то эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента типа C1q - первого компонента классического пути активации комплемента. Как указано выше, термин антитело, если не указано иначе или прямо не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, сохраняющие способность к специфическому связыванию с антигеном. Было показано, что функция связывания с антигеном у антител может выполняться фрагментами, включают (i) фрагменты Fab' или Fab -моновалентные фрагменты, состоящие из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ , или моновалентные антитела, описанные в WO2007059782 (Genmab A/S); (ii) фрагменты  $F(ab')_2$  - бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) фрагменты Fd, состоящие в основном из доменов  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; (iv) фрагменты Fv, состоящие в основном из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al, *Nature* 341, 544-546 (1989)), которые состоят в основном из домена  $V_H$  и также именуется доменными антителами (Holt et al., *Trends Biotechnol.* 2003, 21(11):484-90); (vi) камелиды или нанотела (Revetts et al., *Expert Opin Biol Ther.* 2005, 5(1): 111-24) и (vii) выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, при помощи рекомбинантных методов они могут быть соединены синтетическим линкером, что позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой участки  $V_L$  и  $V_H$  сливаются, образуя моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), например, см. Bird et al, *Science* 242, 423-26 (1988) и Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело, если не указано иначе или из контекста не следует иное. Хотя такие фрагменты, как правило, входят в значение антитела, они все вместе и каждый по отдельности составляют уникальные особенности настоящего изобретения, проявляя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения обсуждаются здесь в дальнейшем. Также следует иметь в виду, что термин антитело, если не указано иначе, также включает и поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAbs), антителоподобные полипептиды, как-то химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность к специфическому связыванию с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученными любыми известными методами, такими как энзиматическое расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные методы. Полученные антитела могут относиться к любому изотипу.

В контексте настоящего изобретения термин "ADC" относится к конъюгатам антитело-препарат,

которые в настоящем изобретении представляют собой антитела против TF, соединенные с другой молекулой, как описано в настоящей заявке.

"Антитело против TF" означает антитело, как описано выше, которое связывается специфически с антигеном - тканевым фактором или антигеном тканевого фактора.

Термин "человеческое антитело" в настоящем изобретении охватывает антитела с переменными и константными областями, происходящими из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не представленные в гаметных последовательностях иммуноглобулина человека (например, мутации, введенные методом случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или при соматических мутациях *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" в настоящем изобретении не должен включать антитела, у которых в каркасные последовательности человека были вставлены гаметные последовательности CDR, полученные из других видов млекопитающих, как-то мыши.

В предпочтительном воплощении антитела из конъюгата антитело-препарат или конъюгаты антитело-препарат по изобретению являются выделенными. "Выделенное антитело" или "выделенный конъюгат антитело-препарат" в настоящем изобретении означает такие антитела или конъюгаты антитело-препарат, которые практически свободны от других антител с другой антигенной специфичностью (например, выделенные антитела, которые специфически связываются с тканевым фактором, практически свободны от других антител, специфически связывающихся с другими антигенами, чем тканевый фактор). Выделенный конъюгат антитело-препарат в настоящем изобретении означает такой конъюгат антитело-препарат, который практически лишен "свободного токсина", при этом "свободный токсин" означает такой токсин, который не конъюгирован с антителом. Термин "практически свободен от" в применении к токсину, в частности, может означать, что присутствует менее 5%, например, менее 4% или менее 3% или менее 2% или менее 1,5% или менее 1% или менее 0,5% не конъюгированного препарата при определении его так, как описано в примере 16. Выделенное антитело или выделенный конъюгат антитело-препарат, который специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом тканевого фактора человека, тем не менее может обладать перекрестной реактивностью с другими родственными ему антигенами, например, из других видов (как-то с видовыми гомологами тканевого фактора). Кроме того, выделенное антитело или выделенный конъюгат антитело-препарат могут быть практически свободными от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном воплощении настоящего изобретения в четко определенной композиции комбинируются два или несколько "выделенных" моноклональных антител или конъюгатов антитело-препарат с различной антиген-связывающей специфичностью.

В настоящем изобретении термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" в отношении двух или нескольких антител означает, что два или несколько антител конкурируют за связывание с TF, например, конкурируют за связывание с TF при измерении, как описано в Примере 12 WO 10/066803. Для некоторых пар антител конкуренция при измерении как в Примере 12 WO 10/066803 наблюдается только тогда, когда антитело фиксировано на чашке, а другое используется для конкуренции, но не наоборот. Термин "конкурирует с" в настоящем изобретении охватывает и такие комбинации антител.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в настоящем изобретении относятся к препаратам молекул антител, состоящих из одинаковых молекул. Моноклональное антитело или его композиция может представлять собой конъюгированные с лекарством антитела по настоящему изобретению. Композиция моноклонального антитела проявляет только одну специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, проявляющим только одну специфичность связывания, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Моноклональные антитела человека могут вырабатываться гибридомой, которая содержит В-клетки, полученные из трансгенного или трансхромосомного животного (кроме человека), как-то из трансгенной мыши, у которых геном содержит тяжелую трансгенную цепь человека и легкую трансгенную цепь, слитые в иммортализованных клетках.

В настоящем изобретении термины "связывание" или "специфически связывается" в контексте связывания антител с заданным антигеном обычно означают связывание со сродством, соответствующим значению  $K_D$  в  $10^{-7}$  М или меньше, как-то  $10^{-8}$  М или меньше, как-то  $10^{-9}$  М или меньше, примерно  $10^{-10}$  М или меньше или около  $10^{-11}$  М или даже меньше, при определении, к примеру, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве анализируемого вещества, которое связывается с данным антигеном со сродством, соответствующим значению  $K_D$ , которое по меньшей мере в десять раз меньше, как-то по меньшей мере в 100 раз меньше, к примеру, по меньшей мере в 1000 раз меньше, как-то по меньшей мере в 10 000 раз меньше, к примеру, по меньшей мере в 100 000 раз меньше, чем его сродство при связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), а не заданным антигеном или близкородственным антигеном. То, насколько это сродство меньше, зависит от  $K_D$  антитела таким образом, что если  $K_D$  антитела очень низкое (то есть антитело обладает высокой специфичностью), то степень уменьшения сродства к антигену может быть меньше, чем сродство к неспецифическому антигену, по меньшей мере в 10 000 раз.

Термин " $k_d$ " ( $\text{sec}^{-1}$ ) в настоящем изобретении относится к константе скорости диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген. Данная величина также обозначается как значение  $k_{\text{off}}$ .

Термин " $k_a$ " ( $M^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ ) в настоящем изобретении относится к константе скорости ассоциации определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " $K_D$ " (M) в настоящем изобретении относится к равновесной константе диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " $K_A$ " ( $M^{-1}$ ) в настоящем изобретении относится к равновесной константе ассоциации определенного взаимодействия антитело-антиген и получается путем деления  $k_a$  на  $k_d$ .

В настоящем изобретении термин "интернализация" в применении к антителам против ТФ включает любые механизмы, посредством которых антитела интернализируются с клеточной поверхности в ТФ-экспрессирующие клетки. Интернализацию антител можно оценить косвенным или прямым методом, когда измеряется эффект интернализованного конъюгата или комплекса антитело-токсин (таким, например, как метод анти-каппа-ЕТА' из примера 15 или метод интернализации и гибели клеток из примера 18). В общем, прямой метод применяется для измерения интернализации конъюгатов антитело-препарат типа метода, описанного здесь в примере 18, тогда как косвенные методы могут применяться для измерения интернализации антител, которые затем преинкубируют с вторичным конъюгированным антителом, типа метода, описанного здесь в примере 15.

Настоящим изобретением также предусмотрены, в одном воплощении, антитела, содержащие функциональные варианты области  $V_L$ , области  $V_H$  либо одного или нескольких участков CDR антител из примеров. Функциональный вариант  $V_L$ ,  $V_H$  или CDR, используемый в контексте антител против ТФ, все еще позволяет антителам сохранять по крайней мере значительную часть (по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95% или больше) сродства/авидности и/или специфичности/избирательности исходного антитела, а в некоторых случаях такие антитела против ТФ могут иметь большее сродство, избирательность и/или специфичность, чем исходное антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительное сходство с исходным антителом по последовательности. Степень идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений между двумя последовательностями (т.е. % гомологии = # идентичных позиций/общее # позиций  $\times 100$ ), с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые нужно ввести для оптимального совмещения двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение степени идентичности между двумя последовательностями может осуществляться с помощью математического алгоритма, как описано ниже в неограничивающих примерах.

Степень идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить при помощи программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на <http://www.gcg.com>), используя матрицу NWSgapdna.CMP и веса пробелов 40, 50, 60, 70 или 80 и веса длины пробелов 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Степень идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определить с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов остатков RAM120, пеню за расширение пробела 12 и пеню за пробел 4. Кроме того, степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)), который встроен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на <http://www.gcg.com>), используя матрицу Blossum 62 или матрицу RAM250 веса пробелов в 40, 50, 60, 70 или 80 и веса длины пробелов в 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательности CDR исходного антитела главным образом консервативными заменами; например, по меньшей мере 35%, около 50% или больше, 60% или больше, 70% или больше, 75% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше (например, 65-99%, как-то 96%, 97% или 98%) замен у варианта представлены консервативными заменами аминокислотных остатков.

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательности CDR исходного антитела главным образом консервативными заменами; например, по меньшей мере 10, например, по меньшей мере 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена у варианта представлены консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться заменами внутри классов аминокислот, представленных в одной или нескольких из следующих трех таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

## Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

## Альтернативная физическая и функциональная классификация аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенильные остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании сгибов	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Более консервативная группировка замен включает: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

Могут быть составлены и другие группы аминокислот по принципам, описанным, например, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2nd ed., 1993), W.H. Freeman and Company.

В одном воплощении настоящего изобретения у варианта CDR может также существенно сохраняться консервативность в смысле гидропатических /гидрофильных свойств и веса/размера частиц по сравнению с CDR антител из примеров (например, весовой класс, гидропатический показатель или то и другое в последовательностях сохраняются по меньшей мере на 50, на 60, на 70, на 75, на 80, на 85, на 90, на 95% или больше (например, на 65-99%). Например, консервативные замены остатков могут также или альтернативно основываться на замене сильно или слабо консервативных по весу групп остатков, известных в данной области.

Сохранность подобных остатков можно также или альтернативно измерить по показателю сходства, который определяется при помощи программы BLAST (например, BLAST 2.2.8, доступной через NCBI, используя стандартные настройки BLOSUM62, Open Gap=11 и Extended Gap=1). Подходящие варианты обычно проявляют сходство с исходным пептидом по меньшей мере на 45%, как-то по меньшей мере на 55, на 65, на 75, на 85, на 90, на 95% или больше (например, на 70-99%).

В настоящем изобретении "изотип" означает класс иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитопы могут содержать аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание (также называемые иммунодоминантной компонентой эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые прямо не участвуют в связывании, как-то аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим связывающим антиген пептидом (другими словами, эти аминокислотные остатки находятся внутри футпринта специфического антигенсвязывающего пептида).

В настоящем изобретении человеческие антитела "происходят из" определенной гаметной последовательности, если антитела получены из системы с помощью последовательностей иммуноглобулина человека, к примеру, при иммунизации трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, или при скрининге библиотеки генов иммуноглобулинов человека, причем выбранное антитело человека по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, на 96, на 97, на 98 или на 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой гаметным геном иммуноглобулина. Как правило, за пределами CDR3 тяжелой цепи человеческие антитела, происходящие из определенной гаметной последовательности человека, должны проявлять не более 20 аминокислотных отличий, например, не более 10 аминокислотных отличий, например, не более 9, 8, 7, 6 или 5, к примеру, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой гаметным геном иммуноглобулина.

В настоящем изобретении термин "подавляет рост" (например, в отношении клеток, как-то раковых клеток) означает любое измеримое уменьшение роста клеток при контакте с конъюгатом препарат-антитело против TF по сравнению с ростом тех же клеток без контакта с конъюгатом, например, ингиби-

рование роста культуры клеток по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Такое уменьшение роста клеток может происходить по различным механизмам со стороны антитела против ТГ и лекарственного препарата, либо по отдельности, либо в комбинации, например, зависимо от антител опосредованного клетками фагоцитоза (ADCP), зависимой от антител опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC), обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC) и/или апоптоза либо остановки клеточного цикла на стадии G2/M и апоптоза, как это происходит при взаимодействии ауристати-на с тубулином.

Термин "стабилизированное антитело IgG4" относится к таким антителам IgG4, которые подвергались модификации для уменьшения полуобмена молекул (см. WO 2008/145142 (Genmab A/S) или van der Neut Kolfshoten M. et al. (2007) Science 14; 317(5844) и приведенные в них ссылки).

В настоящем изобретении термин "эффекторные клетки" относится к иммунным клеткам, участвующим в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от когнитивной и активационной фазы иммунного ответа. Типичными иммунными клетками являются клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (как-то В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, нормальные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфно-ядерные клетки, как-то нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют Fc-рецепторы (FcRs) и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых воплощениях эффекторные клетки способны индуцировать ADCC, как-то нормальные клетки-киллеры, способные индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, которые экспрессируют FcRs, участвуют в специфическом уничтожении клеток мишени и презентуют антигены другим компонентам иммунной системы или связываются с клетками, презентующими антигены. В некоторых воплощениях эффекторные клетки могут подвергаться фагоцитозу антигены мишени или клетки мишени. Экспрессия определенных FcR на эффекторных клетках может регулироваться такими гуморальными факторами, как цитокины. Например, экспрессия FcγRI, как оказалось, подвергается повышающей регуляции интерфероном-γ (IFN-γ) и/или колониестимулирующим фактором гранулоцитов (G-CSF). Такое повышение экспрессии усиливает цитотоксическую активность несущих FcγRI клеток против клеток мишени. Эффекторные клетки могут подвергаться фагоцитозу или лизису антигены мишени или клетки мишени.

Термин "вектор" в настоящем изобретении обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была соединена. Одним из типов вектора является "плазмида", которая означает кольцевую двунитчатую петлю ДНК, с которой можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем в вирусный геном можно вставить дополнительные сегменты ДНК. Определенные вектора способны к автономной репликации в клетках хозяина, в которые они введены (например, бактериальные вектора, содержащие бактериальное начало репликации, и эписомные вектора млекопитающих). Другие вектора (как-то не-эписомные вектора млекопитающих) могут встраиваться в геном клеток хозяина при введении в них и будут реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые вектора способны управлять экспрессией генов, с которыми они операбельно связаны. Такие вектора именуется здесь "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто "экспрессионными векторами"). В общем, экспрессирующие вектора, используемые в методах рекомбинантной ДНК, часто применяются в виде плазмид. В настоящей заявке термины "плазмида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, так как плазмида является наиболее распространенной формой вектора. Однако настоящее изобретение охватывает и другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные вектора (как-то дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

В настоящем изобретении термин "рекомбинантные клетки хозяина" (или просто "клетки хозяина") обозначает клетки, в которые был введен экспрессирующий вектор. Следует иметь в виду, что такие термины обозначают не только конкретные рассматриваемые клетки, но также и потомство таких клеток. Поскольку в последующих поколениях могут произойти определенные модификации вследствие мутаций или влияния окружающей среды, такое потомство может на деле и не быть идентичным родительским клеткам, но все-таки включается в рамки термина "клетки хозяина" в настоящем изобретении. Рекомбинантными клетками хозяина являются, к примеру, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки NS/0 и лимфоцитические клетки.

Термин "трансфектома" в настоящем изобретении охватывает рекомбинантные эукариотические клетки хозяина, экспрессирующие антитела, как-то клетки CHO, клетки NS/0, клетки HEK293, клетки растений или грибов, включая клетки дрожжей.

Термин "трансгенное животное (кроме человека)" относится к животным, у которых геном содержит один или несколько трансгенов или трансхромосом тяжелых и/или легких цепей человека (встроенных или не встроенных в природную геномную ДНК животного) и которые способны экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может содержать трансген легкой цепи человека и либо трансген тяжелой цепи человека, либо трансхромосому тяжелой цепи человека, так что



такая мышь вырабатывает человеческие антитела против TF при иммунизации антигеном TF и/или клетками, экспрессирующими TF. Трансген тяжелой цепи человека может быть встроен в хромосомную ДНК мыши, как в случае с трансгенными мышами, к примеру, мышами HuMAb, как-то мышами HCo17, HCo17, HCo120 или HCo12, или же трансген тяжелой цепи человека может существовать вне хромосом, как в случае трансхромосомных мышей KM, описанных в WO02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (собираательно именуемые здесь "трансгенными мышами") способны вырабатывать множественные изотипы моноклональных антител человека к данному антигену (как-то IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), подвергаясь рекомбинации V-D-J и переключению изотипа. Трансгенные животные также могут применяться для получения антител против определенного антигена путем введения генов, кодирующих такие специфичные антитела, к примеру, путем операбельного соединения генов с геном, который экспрессируется в молоке животного.

"Обработка" означает введение эффективного количества терапевтически активного соединения настоящего изобретения с целью ослабления, облегчения, задержки или устранения (излечения) симптомов или заболеваний.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает такое количество, которое в необходимых дозах и в течение нужного времени эффективно для получения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество конъюгата препарат-антитело против TF может варьировать в зависимости от таких факторов, как заболевание, возраст, пол и вес индивида, и способности конъюгата вызывать требуемый ответ у индивида. Терапевтически эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

"Антиидиотипическое" (Id) антитело есть такое антитело, которое распознает уникальные детерминанты, обычно связанные с антиген-связывающим сайтом антитела.

#### **Другие аспекты и воплощения настоящего изобретения**

Изобретением предусмотрены конъюгаты антител против TF с лекарственными препаратами (конъюгаты препарат-антитело против TF).

В одном аспекте изобретения предусмотрены конъюгаты препарат-антитело против TF, содержащие антитело, которое связывается с тканевым фактором и включает:

(i) область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 8, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 46, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 47, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 48; или

(ii) область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 34, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 35, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 36, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 74, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 75, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 76; или

(iii) область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 38, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 39, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 40, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 78, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 79, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 80; или

(iv) область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 42, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 43, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 44; или

(v) вариант любого из данных антител, причем данный вариант предпочтительно содержит не более 1, 2 или 3 модификаций аминокислот, более предпочтительно замен аминокислот, как-то консервативных замен аминокислот в данных последовательностях;

при этом антитело конъюгировано с ауристатином или его функциональным пептидным аналогом или производным через линкер.

В одном воплощении антитело включает:

(i) область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; или

(ii) область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; или

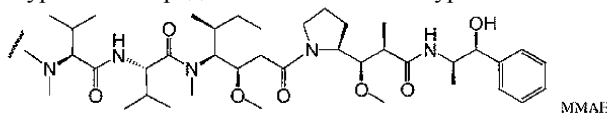
(iii) область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; или

(iv) область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В одном воплощении антитело является полноразмерным антителом.

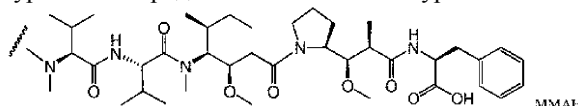
В одном воплощении антитело является полностью человеческим моноклональным антителом типа IgG1, как-то IgG1,к. В другом воплощении антитело является полностью человеческим моноклональным стабилизированным антителом типа IgG4.

В одном воплощении ауристин представлен монометилауристином E (MMAE):



где волнистой линией обозначен сайт прикрепления для линкера.

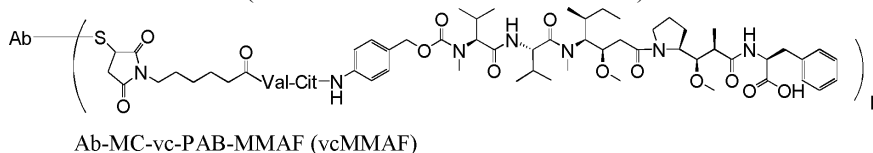
В одном воплощении ауристин представлен монометилауристином F (MMAF):



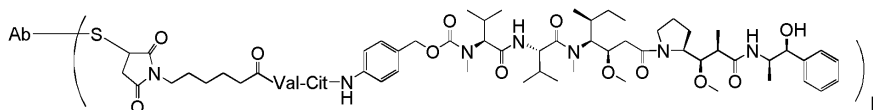
где волнистой линией обозначен сайт прикрепления для линкера.

В одном воплощении линкер прикрепляется к сульфгидрильным остаткам антитела против TF, полученным при (частичном) восстановлении антитела против TF.

В одном воплощении линкер-ауристин представлен MC-vc-PAB-MMAF (также обозначается как vcMMAF) или MC-vc-PAB-MMAE (также обозначается как vcMMAE):



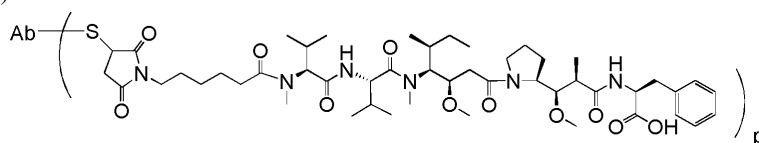
Ab-MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF)



Ab-MC-vc-PAB-MMAE (vcMMAE)

где  $p$  означает число от 1 до 8, например,  $p$  может быть 3-5, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF. В одном воплощении линкер-ауристин представлен vcMMAE.

В одном воплощении линкер-конъюгат представлен mcMMAF (где сокращение mc/MC означает малеимидакапроил):



Ab-MC-MMAF (mcMMAF)

где  $p$  означает число от 1 до 8, например,  $p$  может быть 3-5, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF.

В одном воплощении антитело блокирует связывание FVIIa с тканевым фактором при определении, например, как описано в примере 14.

В одном воплощении антитело ингибирует связывание FVIIa с тканевым фактором, предпочтительно с максимальным значением  $IC_{50}$  между 0,01-3,0 мкг/мл либо 0,1-2,0 мкг/мл либо 0,2-1,2 мкг/мл при определении так, как описано в примере 14.

В одном воплощении антитело конкурирует за связывание с тканевым фактором:

с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 33, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 73; или

с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 1, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 41; или

с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 5, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 45; или

с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 9, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 49; или

с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 13, и область

$V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 53; или  
с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 17, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 57; или  
с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 21, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 61; или  
с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 25, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 65; или  
с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 29, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 69; или  
с антителом, содержащим область  $V_H$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 37, и область  $V_L$ , включающую последовательность SEQ ID NO: 77.

В одном воплощении антитело включает:

a) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 34, 35 и 36, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 74, 75 и 76; или  
b) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 2, 3 и 4, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 42, 43 и 44; или  
c) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 46, 47 и 48; или  
d) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 50, 51 и 52; или  
e) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 14, 15 и 16, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 54, 55 и 56; или  
f) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 18, 19 и 20, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 58, 59 и 60; или  
g) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 22, 23 и 24, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 62, 63 и 64; или  
h) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 66, 67 и 68; или  
i) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 30, 31 и 32, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 70, 71 и 72; или  
j) область  $V_H$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 38, 39 и 40, и область  $V_L$ , содержащую последовательности CDR1, 2 и 3 по SEQ ID NO: 78, 79 и 80; или  
k) вариант любого из данных антител, причем этот вариант предпочтительно содержит не более 1, 2 или 3 модификаций аминокислот, более предпочтительно замен аминокислот, как-то консервативных замен аминокислот в данных последовательностях.

В одном воплощении антитело включает область  $V_H$ , которая:

a) по меньшей мере на 80%, как-то по меньшей мере на 90, на 95 или на 98, или 100% идентична последовательности области  $V_H$ , выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 и 29; или  
b) содержит не более 20, как-то 15 или 10 или 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, более предпочтительно замен аминокислот, как-то консервативных замен аминокислот по сравнению с последовательностью области  $V_H$ , выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 и 29.

В одном воплощении антитело включает область  $V_L$ , которая:

a) по меньшей мере на 80%, как-то по меньшей мере на 90, на 95 или на 98, или 100% идентична последовательности области  $V_L$ , выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 77 и 69; или  
b) содержит не более 20, как-то 15 или 10 или 5, 4, 3, 2 или 1 модификаций аминокислот, более предпочтительно замен аминокислот, как-то консервативных замен аминокислот по сравнению с последовательностью области  $V_L$ , выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 77 и 69.

В одном воплощении антитело включает:

a) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 73; или  
b) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 1, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 41; или  
c) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 45; или  
d) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 49; или  
e) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 13, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 53; или

f) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 17, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 57; или

g) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 21, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 61; или

h) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 25, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 65; или

i) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 69; или

j) область  $V_H$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 37, и область  $V_L$ , содержащую последовательность SEQ ID NO: 77.

В одном воплощении антитело связывается со внеклеточным доменом тканевого фактора с кажущимся сродством ( $EC_{50}$ ) в 3,0 нМ или меньше, как-то 0,50 нМ или меньше, например, 0,35 нМ или меньше, как-то 0,20 нМ или меньше, например, 0,1 нМ или меньше при определении так, как описано в методе из Примера 12.

В одном воплощении антитело связывается с клетками млекопитающих, экспрессирующими тканевой фактор, как-то клетками A431, трансфицированными конструкцией, кодирующей тканевой фактор, предпочтительно с кажущимся сродством ( $EC_{50}$ ) в 10 нМ или меньше, например, 8 нМ или меньше, как-то 5 нМ или меньше, например, 2 нМ или меньше, как-то 1 нМ или меньше, например, 0,5 нМ или меньше, как-то 0,3 нМ или меньше при определении так, как описано в методе из Примера 13.

В другом или альтернативном аспекте антитело конъюгировано с терапевтической молекулой, выбранной из группы, состоящей из таксола; цитохалазина В; грамицидина D; бромида этидия; эметина; митомицина; эпопозида; тенопозида; винкристина; винбластина; колхицина; доксорубицина; даунорубицина; дигидроксиантрациндина; ингибиторов тубулина типа майтансина или их аналогов или производных; митоксантрона; митрамицина; актиномицина D; 1-дегидротестостерона; глюкокортикоидов; прокаина; тетракаина; лидокаина; пропранолола; пуромиина; калихеамицина или его аналогов или производных; антиметаболитов типа метотрексата, 6-меркаптопурина, 6-тиогуанина, цитарабина, флударабина, 5-фторурацила, декарбазина, гидроксимочевины, аспарагиназы, гемцитабина или кладрибина; алкилирующих реагентов типа мехлоретаммина, тиоэпа, хлорамбуцила, мелфалана, кармустина (BSNU), ломустина (CCNU), циклофосамида, бусульфана, дибромманнитола, стрептозотоцина, дакарбазина (DTIC), прокарбазина, митомицина С, цисплатина, карбоплатина, дуокармицина А, дуокармицина SA, рахелмицина (CC-1065) либо их аналогов или производных; пирроло[2,1-с][1,4]-бензодиазепинов (PDBs) или их аналогов; таких антибиотиков, как дактиномицин, блеомицин, даунорубин, доксорубин, идарубин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC)); дифтерийного токсина и родственных ему молекул типа цепи А дифтерийного токсина и её активных фрагментов и гибридных молекул, токсинов рицина типа рицина А или дегликозилированной цепи А рицина, холерного токсина, Shiga-подобных токсинов типа токсина SLT I, SLT II, SLT IV, LT, токсина С3, токсина Shiga, коклюшного токсина, столбнячного токсина, ингибитора протеаз из сои Bowman-Birk, эндотоксина *Pseudomonas*, алорина, сапорина, модекцина, геланина, цепи А абрина, цепи А модекцина, альфа-сарцина, белков *Aleurites fordii*, белков диантина, таких белков *Phytolacca americana*, как PAPI, PAPII и PAP S, ингибитора из *Momordica charantia*, курцина, кротина, ингибитора из *Saponaia officinalis*, токсинов гелонина, митогеллина, рестриктоцина, феномицина и еномицина; рибонуклеазы (РНКазы); ДНКазы I; стафилококкового энтеротоксина А; противовирусного белка фитолакки; дифтерийного токсина; и эндотоксина *Pseudomonas*. В другом альтернативном воплощении антитело конъюгировано с цитотоксической молекулой, выбранной из группы, состоящей из доластатина, майтансина, калихеамицина, дуокармицина, рахелмицина (CC-1065) или их аналогов, производных или пролекарственных форм.

В другом альтернативном воплощении антитело конъюгировано с цитокином, выбранным из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, CD40L, лигандов Flt3, фактора стволовых клеток, анцестима и TNF $\alpha$ .

В другом альтернативном воплощении антитело конъюгировано с радиоизотопом.

В одном воплощении антитело способно индуцировать цитотоксичность при интернализации антител, конъюгированных с токсином, на клетках A431, BxPC3 или MDA-MB-23, как описано в примере 15.

В одном воплощении антитело индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в примере 15, со значением  $EC_{50}$  между  $9 \times 10^{-5}$  и  $4 \times 10^{-4}$  мкг/мл на клетках A431.

В одном воплощении препарат конъюгата антитело-препарат дает менее 2%, как-то менее 1,5% или менее 1% или менее 0,5% неконъюгированного лекарственного препарата при определении так, как описано в примере 16.

В одном воплощении препарат конъюгата антитело-препарат дает менее 10%, как-то менее 8% или менее 7% или менее 7% или менее 5,5% агрегатов при определении так, как описано в примере 16.

В одном воплощении препарат конъюгата антитело-препарат дает менее 1%, как-то менее 0,5% или менее 0,25% или менее 0,2% эндотоксинов при определении так, как описано в примере 16.

В одном воплощении препарат конъюгата антитело-препарат дает концентрацию конъюгата в пределах 1-100 нг/мл, как-то 2-50 нг/мл, или 5-25 нг/мл, или 5-15 нг/мл, или 7,5-15 нг/мл, или 8-12 нг/мл или 9-11 нг/мл при определении так, как описано в примере 16.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат связывается с внеклеточным доменом тканевого фактора с кажущимся сродством ( $EC_{50}$ ) в 600 нг/мл или меньше, как-то 550 нг/мл или меньше или 500 нг/мл или меньше, например, со значением  $EC_{50}$  в пределах 200-600 нг/мл, как-то в пределах 300-600 нг/мл, или 350-550 нг/мл, или 400-500 нг/мл при определении так, как описано в примере 17.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в примере 18, со значением  $EC_{50}$  между 1 и 100 нг/мл на клетках A431.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в примере 18, со значением  $EC_{50}$  между 0,5 и 20 нг/мл на клетках HPAF-II.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в примере 18, со значением  $EC_{50}$  между 0,5 и 500 нг/мл, например, между 0,5 и 20 нг/мл на клетках NCI-H441.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в Примере 18, например, в раковых клетках, экспрес-сирующих более чем 200000 молекул тканевого фактора на клетку, как-то 200000-1000000 молекул тканевого фактора на клетку, например, 200000-500000 молекул тканевого фактора на клетку. Значение  $EC_{50}$  в одном воплощении может составлять от 0,1 до 100 нг/мл.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат индуцирует цитотоксичность при интернализации, как описано в примере 18, например, в раковых клетках, экспрес-сирующих более чем 20000 молекул тканевого фактора на клетку, например, 20000-200000 молекул тканевого фактора на клетку. Значение  $EC_{50}$  в одном воплощении может составлять от 0,5 до 500 нг/мл, как-то от 0,5 до 20 нг/мл.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат ингибирует рост опухолей, как описано в примере 19.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат ингибирует рост опухолей в клеточной линии, экспрессирующей более 1000 молекул тканевого фактора на клетку, как-то более 10000 молекул тканевого фактора на клетку, например, более 100000 молекул тканевого фактора на клетку, или же в пределах 1000-20000 молекул тканевого фактора на клетку или 20000-200000 молекул тканевого фактора на клетку или 200000-500000 молекул тканевого фактора на клетку или 200000-1000000 молекул тканевого фактора на клетку при определении роста опухолей так, как описано в примере 19.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат стабилен при  $-65^{\circ}C$  по меньшей мере в течение трех месяцев, при этом стабильность означает, что по меньшей мере 95% конъюгата антитело-препарат находится в виде мономерных молекул при определении так, как описано в примере 20.

В одном воплощении конъюгат антитело-препарат стабилен при  $5^{\circ}C$  по меньшей мере в течение трех месяцев, при этом стабильность означает, что по меньшей мере 95% конъюгата антитело-препарат находится в виде мономерных молекул при определении так, как описано в примере 20.

В другом аспекте изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-препарат, приведенный в любом из вышеперечисленных воплощений. В одном воплощении фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретения предусмотрен конъюгат антитело-препарат, приведенный в любом из вышеперечисленных воплощений, для применения в качестве медикамента.

В другом аспекте изобретения предусмотрен конъюгат антитело-препарат, приведенный в любом из вышеперечисленных воплощений, для применения при лечении заболеваний.

В другом аспекте изобретения предусмотрен конъюгат антитело-препарат, приведенный в любом из вышеперечисленных воплощений, для применения при лечении воспаления.

В другом аспекте изобретения предусмотрен конъюгат антитело-препарат, приведенный в любом из вышеперечисленных воплощений, для применения при лечении рака.

В одном воплощении рак выбирается из группы, состоящей из опухолей центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких, такого как NSCLC, рака молочной железы, особенно тройне отрицательного рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, раки печени и желчных протоков, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почек, рака предстательной железы, рака эндометрия, рака яичников, злокачественной меланомы, саркомы, опухолей неизвестного первичного происхождения, рака костного мозга, острой лимфобластной лейкемии, хронической лимфобластной лейкемии и неходжкинской лимфомы, рака кожи, глиомы, рака головного мозга, рака матки, острой миелоидной лейкемии и рака прямой кишки.

В одном воплощении рак представлен раком поджелудочной железы.

В одном воплощении рак представлен колоректальным раком.

В одном воплощении рак представлен раком яичников.

В одном воплощении рак представлен раком молочной железы.

В одном воплощении рак представлен раком предстательной железы.

В одном воплощении рак представлен раком мочевого пузыря.

В одном воплощении рак представлен раком, чувствительным к обработке ингибиторами тубулина.

В другом аспекте изобретения предусмотрен конъюгат антитело-препарат из любого из вышеприведенных воплощений, при этом медикамент предназначается для лечения рака в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, как-то химиотерапевтическими средствами.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение конъюгата антитело-препарат из любого из вышеприведенных воплощений для изготовления медикамента для лечения рака. В одном воплощении рак может быть выбран из числа раковых заболеваний, описанных выше.

В другом воплощении изобретения предусмотрен способ индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, который включает введение нуждающемуся в этом лицу эффективного количества конъюгата антитело-препарат из любого из вышеприведенных воплощений.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ лечения любого из вышеперечисленных раковых заболеваний путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества конъюгата антитело-препарат из любого из вышеприведенных воплощений. В одном воплощении конъюгат антитело-препарат вводится в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, как-то химиотерапевтическими средствами.

### Антитела

Настоящее изобретение касается конъюгатов препарат-антитело против TF, то есть содержащих и антитело, и лекарственный препарат, которые, в частности, могут быть конъюгированы друг с другом через линкер.

Антитела могут быть получены хорошо известными рекомбинантными методами с использованием хорошо известных систем экспрессирующих векторов и клеток хозяина. В одном воплощении антитела получают в клетках CHO с помощью экспрессирующей системы векторов GS, как изложено в De la Cruz Edmunds et al, 2006, *Molecular Biotechnology* 34: 179-190; EP216846, US5981216, WO 87/04462, EP323997, US5591639, US5658759, EP338841, US5879936 и US5891693.

После выделения и очистки антител из клеточной среды хорошо известными методами их конъюгируют с ауристатином через линкер, как изложено более подробно ниже.

Моноклональные антитела настоящего изобретения могут быть получены, например, гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), или же методами рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также можно выделить из фаговых библиотек антител при помощи методов, описанных, к примеру, в Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991); и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Так, к примеру, моноклональные антитела могут быть получены из гибридом, полученных из В-клеток селезенки мышей, иммунизированных нужным антигеном, к примеру, в виде клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей нужный антиген. Моноклональные антитела также могут быть получены из гибридом, происходящих из экспрессирующих антитела клеток иммунизированных людей или таких млекопитающих, как крысы, собаки, приматы и др.

В одном воплощении антитела изобретения представляют собой человеческие антитела. Человеческие моноклональные антитела против тканевого фактора могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не мыши. Такие трансгенные или трансхромосомные мыши включают мышей, которые именуется здесь как мыши HuMAb и мыши KM, соответственно, и собирательно называются "трансгенными мышами".

Мыши HuMAb содержат минилокус генов иммуноглобулина человека, который кодирует не прошедшие перегруппировку последовательности тяжелой ( $\mu$  и  $\gamma$ ) и легкой цепи к иммуноглобулина человека, вместе с направленными мутациями, инактивирующими эндогенные локусы цепей  $\mu$  и  $\kappa$  (Lonberg N. et al, *Nature* 368, 856-859 (1994)). Соответственно, мыши проявляют пониженную экспрессию IgM или  $\kappa$  мыши и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению классов и соматическим мутациям, образуя моноклональные антитела IgG,  $\kappa$  человека с высоким сродством (Lonberg N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994); Lonberg N. and Huszar D., *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995); и Harding F. and Lonberg N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764, 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992); Chen J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993); Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994); Taylor L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994); Fishwild D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). См. также US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo17 содержат разрыв JKD в эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), разрыв CMD в эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 из WO 01/14424), трансген KCo5 легкой каппа-цепи человека (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), и трансген HCo17 тяжелой цепи человека (как описано в US 5,770,429).

Мыши HCo12 содержат разрыв JKD в эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), разрыв CMD в эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 из WO 01/14424), трансген KCo5 легкой каппа-цепи человека (как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)) и трансген HCo12 тяжелой цепи человека (как описано в примере 2 из WO 01/14424).

Трансгенная линия мышей HCo17 (см. также US 2010/0077497) была создана путем совместного введения вставки рНС2 в 80 т.о. (Taylor et al. (1994) Int. Immunol. 6: 579-591), вставки рVX6 в 25 т.о. и искусственного хромосомного фрагмента дрожжей в 460 т.о. из хромосомы уIgH24. Эта линия была названа (HCo17) 25950. Затем линию (HCo17) 25950 скрещивали с мышами, содержащими мутацию CMD (как описано в примере 1 из PCT Publication WO 01109187), мутацию JKD (Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820) и трансген (KCo5) 9272 (Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). Полученные мыши экспрессируют трансгены тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека на фоне гомозиготности по разрывам эндогенных локусов тяжелой и легкой каппа-цепи мыши.

Трансгенная линия мышей HCo120 является результатом совместного введения трансгена рНС2 тяжелой цепи из минилокуса 30, содержащей гаметную вариабельную область (Vh) минихромосомы YAC уIgH10 и конструкции с минилокусом рVx6 (описанной в WO09097006). Затем линию (HCo120) скрещивали с мышами, содержащими мутацию CMD (описанную в примере 1 из PCT Publication WO 01/09187), мутацию JKD (Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 811-820) и трансген (KCo5) 9272 (Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851). Полученные мыши экспрессируют 10 трансгенов тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека на фоне гомозиготности по разрывам локусов эндогенной тяжелой и легкой каппа-цепи мыши.

Для получения мышей HuMab с благотворными эффектами линии Balb/c мышей HuMab скрещивали с мышами KCo5 [МК] (Balb), полученными при обратном скрещивании линии KCo5 (как описано в Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851) с мышами Balb/c дикого типа для получения мышей, описанных в WO 09097006. При этом скрещивании были получены гибриды Balb/c для линий HCo12, HCo17 и HCo120.

Линия мышей KM содержит гомозиготный разрыв эндогенного гена легкой каппа-цепи мыши, как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), и гомозиготный разрыв эндогенного гена тяжелой цепи мыши, как описано в примере 1 из WO 01/09187. Эта линия мышей несет трансген KCo5 легкой каппа-цепи человека, как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996), а также несет трансхромосому тяжелой цепи человека, состоящую из фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, как описано в WO 02/43478.

Спленоциты из этих трансгенных мышей можно использовать для получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела человека, в соответствии с хорошо известными методами. Моноклональные или поликлональные антитела человека по настоящему изобретению или антитела настоящего изобретения, происходящие из других видов, также можно получить трансгенно посредством получения других млекопитающих или растений, трансгенных по нужным последовательностям тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, и продукции в них антител в извлекаемой форме. При получении в трансгенных млекопитающих антитела можно получать и выделять из молока коз, коров или других млекопитающих. Например, см. US 5,827,690, US 5,756,687, US 5,750,172 и US 5,741,957.

Кроме того, человеческие антитела по настоящему изобретению или антитела настоящего изобретения из других видов могут быть получены дисплейными методами, включая, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей и другие хорошо известные методы, а полученные молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, как-то созреванию аффинности, поскольку такие способы хорошо известны в данной области (например, см. Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (фаговый дисплей); Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (фаговый дисплей); Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей); Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей); Scott, TIBS 17, 241-245 (1992); Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990); Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993); Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992); Chiswell and McCafferty, TIBTECH 10, 80-84 (1992); и US 5,733,743). Если дисплейные технологии используются для получения антител, не являющихся человеческими, то такие антитела можно гуманизировать.

Антитела изобретения может быть любого изотипа. Как правило, выбор изотипа определяется требуемыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Типичными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно использовать любые константные области легкой цепи человека - каппа или лямбда. При желании можно переключить класс антител против TF настоящего изобретения известными методами. Например, антитело настоящего изобретения, которое изначально было IgM, можно переключено на антитело класса IgG настоящего изобретения. Кроме того, можно использовать методы переключения класса для преобразования одного подкласса IgG на другой, к примеру, из IgG1 на IgG2. Таким образом, эффекторная функция антител настоящего изобретения может быть изменена переключением изотипа, например, на антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различного терапевтического применения. В одном воплощении антитела настоящего изобретения представлены

антителами IgG1, к примеру, IgG1,κ.

В одном воплощении антитела изобретения являются антителами полной длины, предпочтительно антителами IgG1, в частности антителами IgG1,κ. Термин антитело полной длины служит для обозначения того, что оно является естественным, целым антителом, т.е. не фрагментом или другим типом антител, у которых различные цепи антител подверглись перестройке человеком для получения новых антител (например, см. Sidhu SS, *Nature Biotechnology*, 25, 5, 537-538 (2007), где раскрыты антитела полной длины на дисплее). В другом воплощении антитела изобретения являются фрагментами антител или одноцепочечными антителами.

Фрагменты антител можно получить, например, путем фрагментации стандартными методами, а фрагменты подвергнуть скринингу на пригодность таким же образом, как описано здесь для целых антител. Например, фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно получить при обработке антител пепсином. Полученные фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно подвернуть восстановлению дисульфидных мостиков для получения Fab'-фрагментов. Fab'-фрагменты можно получить обработкой антител IgG папаином; Fab'-фрагменты можно получить при расщеплении антител IgG пепсином. F(ab')-фрагменты также можно получить путем связывания Fab', как описано ниже, через тиоэфирную связь или дисульфидную связь. Fab'-фрагменты представляют собой фрагменты антител, полученные при разрезании дисульфидной связи в шарнирном участке F(ab')<sub>2</sub>. Fab'-фрагменты можно получить при обработке F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента восстанавливающим реагентом, как-то дитиотреитолом. Фрагменты антител также можно получить при экспрессировании нуклеиновых кислот, кодирующих такие фрагменты, в рекомбинантных клетках (например, см. Evans et al, *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, может включать последовательности ДНК, кодирующие домен C<sub>H</sub>1 и шарнирный участок H-цепи, за которой следует стоп-кодон трансляции, получая при этом укороченный фрагмент молекулы антитела.

Антитела настоящего изобретения дополнительно раскрыты и охарактеризованы в WO 2010/066803 (Genmab A/S).

В одном воплощении антитело против TF является стабилизированным антителом IgG4. Примерами подходящих стабилизированных антител IgG4 являются антитела, у которых аргинин в положении 409 константной области тяжелой цепи IgG4 человека, который приведен в указателе EU как в Kabat et al., замещен лизином, треонином, метионином или лейцином, предпочтительно лизином (описано в WO 2006033386 (Kirin)) и/или у которых шарнирный участок содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys.

В другом воплощении стабилизированное антитело IgG4 против TF представляет собой антитело IgG4, содержащее тяжелую и легкую цепь, причем данная тяжелая цепь содержит константную область IgG4 человека с остатком, выбранным из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в положении, соответствующем 409, и/или остатком, выбранным из группы, состоящей из Ala, Val, Gly, Ile и Leu в положении, соответствующем 405, при этом данное антитело необязательно содержит одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок, но не содержит последовательности Cys-Pro-Pro-Cys в шарнирном участке. Предпочтительно данное антитело содержит остаток Lys или Ala в положении, соответствующем 409, либо участок CH3 антитела заменен участком CH3 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG3 человека.

В следующем воплощении стабилизированное антитело IgG4 против TF представляет собой антитело IgG4, содержащее тяжелую и легкую цепь, причем данная тяжелая цепь содержит константную область IgG4 человека с остатком, выбранным из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в положении, соответствующем 409, и/или остатком, выбранным из группы, состоящей из Ala, Val, Gly, Ile и Leu в положении, соответствующем 405, при этом данное антитело необязательно содержит одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок и при этом данное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в шарнирном участке. Предпочтительно данное антитело содержит остаток Lys или Ala в положении, соответствующем 409, либо участок CH3 антитела заменен участком CH3 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG3 человека.

В другом воплощении антитело против TF не является антителом типа IgG4, а, например, IgG1, IgG2 или IgG3, и было подвергнуто мутации с тем, чтобы уменьшить или даже устранить способность к выполнению эффекторных функций, таких как ADCC. Такие мутации описаны, например, в Dall'Acqua WF et al, *J Immunol.* 177(2): 1129-1138 (2006); и Nezareh M, *J Virol.* 75(24): 12161-12168 (2001).

#### Конъюгаты

Настоящим изобретением предусмотрены конъюгаты антител против TF с лекарственными препаратами (конъюгаты препарат-антитело против TF).

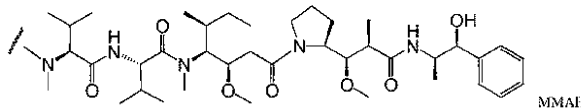
В одном аспекте конъюгаты препарат-антитело против TF настоящего изобретения включают антитела против TF, раскрытые в настоящем изобретении, конъюгированные с ауристатидами или пептидными аналогами и производными ауристатинов (US5635483; US5780588). Было показано, что ауристатины влияют на динамику микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) и обладают противораковой (US5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42:2961-2965). Молекула препарата ауристина может присоединяться к антителу через линкер, через N-конец или C-конец пеп-



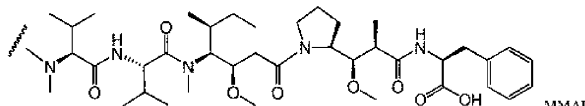
тидной молекулы препарата.

Типичные воплощения ауристатинов включают присоединяемые по N-концам молекулы препаратов монометилауристатина DE и DF, раскрытые в Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volume 45, abstract number 623, presented March 28, 2004, и описанные в US 2005/0238649).

Типичным воплощением ауристатина является MMAE (монометилауристин E), где волнистой линией обозначено ковалентное присоединение конъюгата антитело-препарат к линкеру (L):



Другим типичным воплощением ауристатина является MMAF (монометилауристин F), где волнистой линией обозначено ковалентное присоединение конъюгата антитело-препарат к линкеру (L) (US2005/0238649):

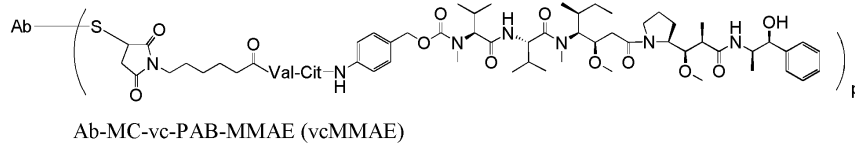
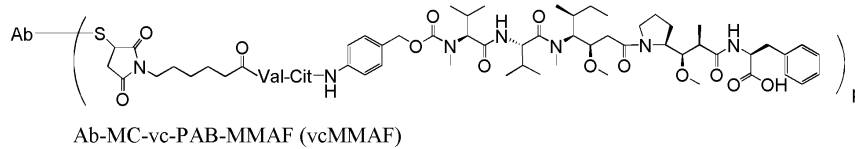


Конъюгаты препарат-антитело против TF по изобретению содержат звено линкера между звеном цитостатического или цитотоксического препарата и звеном антитела. В некоторых воплощениях препарат расщепляется при внутриклеточных условиях, так что при отщеплении линкера лекарственный препарат отделяется от антитела во внутриклеточном пространстве. В другом воплощении звено линкера не расщепляется, а препарат высвобождается, к примеру, при деградации антитела. В некоторых воплощениях линкер расщепляется расщепляющим агентом, присутствующим во внутриклеточной среде (например, внутри лизосом или эндосом или кавеол). Линкером может быть, например, пептидный линкер, который расщепляется внутриклеточным ферментом пептидазой или протеазой, включая, без ограничения, лизосомные или эндосомные протеазы. В некоторых воплощениях длина пептидного линкера составляет по меньшей мере две аминокислоты или три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин, в отношении которых известно, что все они гидролизуют дипептидные производные лекарств, приводя к высвобождению активного препарата внутри клеток мишени (например, см. Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). В определенном воплощении пептидным линкером, который расщепляется внутриклеточной протеазой, является линкер Val-Cit (валин-цитруллин) или Phe-Lys (фенилаланин-лизин) (например, см. US6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit и другие примеры линкеров Phe-Lys). Примеры структур с линкером Val-Cit или Phe-Lys включают, без ограничения, MC-vc-PAB, описанный ниже, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB или MC-Phe-Lys-GABA, где MC означает малеимидокапроил, vc означает Val-Cit, PAB - п-аминобензилкарбамат и GABA -  $\gamma$ -аминомасляная кислота. Преимущество внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства состоит в том, что это средство, как правило, ослаблено при конъюгировании, а стабильность конъюгатов в сыворотке, как правило, высока.

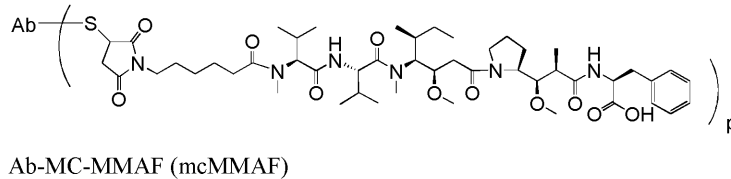
В следующем воплощении звено линкера не расщепляется, а препарат высвобождается при деградации антитела (см. US 2005/0238649). Как правило, такой линкер практически не чувствителен к внеклеточному окружению. В настоящем изобретении "практически не чувствителен к внеклеточному окружению" в отношении линкера означает, что не более 20%, обычно не более 15%, более обычно не более 10% и еще более обычно не более 5%, не более 3% или не более 1% линкера в образце соединения конъюгата антитело-препарат расщепляется тогда, когда конъюгат антитело-препарат находится во внеклеточном окружении (например, плазме). Будет ли линкер практически нечувствительным к внеклеточному окружению, можно определить, к примеру, путем инкубации соединения конъюгата антитело-препарат с плазмой в течение определенного времени (напр. 2, 4, 8, 16 или 24 часов), а затем измерения количества свободного препарата, присутствующего в плазме.

Другие типичные воплощения, содержащие MMAE или MMAF и различные линкерные компоненты, имеют следующие структуры (где Ab означает антитело, а p, которое означает нагруженность препаратом (или среднее количество цитостатических или цитотоксических молекул на молекулу антитела), составляет от 1 до 8, например, p может составлять 4-6, как-то 3-5, или же p может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Примеры, когда расщепляемый линкер соединен с ауристатином, включают MC-vc-PAB-MMAF (также обозначается как vcMMAF) и MC-vc-PAB-MMAF (также обозначается как vcMMAE), где MC означает малеимидокапроил, vc - линкер Val-Cit (валин-цитруллин), а PAB - п-аминобензилкарбамат:



Другие примеры включают ауристатины, соединенные с нерасщепляемым линкером, такие как mcMMAF (mc означает малеимидакопроил, причем MC означает то же самое, что и mc):



Нагруженность цитостатическим или цитотоксическим препаратом представлена  $p$ , которое означает среднее число молекул цитостатического препарата на антитело в молекуле (также обозначается как соотношение лекарства к антителу, DAR). Нагруженность цитостатическим или цитотоксическим препаратом может составлять от 1 до 20 молекул препарата на антитело и может приходиться на аминокислоты с полезными функциональными группами, такими, без ограничения, как амино- или сульфгидрильные группы, как в лизине или цистеине.

В зависимости от способа конъюгации,  $p$  может быть ограничено числом сайтов прикрепления на антителе, например, при прикреплении через сульфгидрильные группы, как в настоящем изобретении. Обычно антитела содержат немного сульфгидрильных групп (свободных и реактивных тиоловых групп цистеина), по которым могут присоединяться молекулы препарата, так как большинство тиоловых групп цистеина находится в виде дисульфидных мостиков. Поэтому в некоторых воплощениях антитело может быть подвергнуто восстановлению с помощью таких восстановителей, как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в частично или полностью восстановительных условиях, для получения реактивных сульфгидрильных групп. В некоторых воплощениях нагруженность препаратом у ADC изобретения составляет от 1 до 8, например,  $p$  может составлять 4-6, как-то 3-5, или же  $p$  может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, так как после (частичного) восстановления антитела становятся доступными максимум 8 сульфгидрильных остатков (именно 8 цистеинов задействовано в образовании межцепочечных дисульфидных связей).

В одном воплощении молекула линкера для препарата представлена vcMMAE. Молекула линкера vcMMAE для препарата и способы конъюгации изложены в WO 2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 и US 11/833,028 (Seattle Genetics, Inc.), (которые включены сюда в виде ссылки), причем молекула линкера vcMMAE связывается с антителами против TF по цистеинам при помощи способа, близкого приведенному там.

В одном воплощении молекула линкера для препарата представлена mcMMAE. Молекула линкера mcMMAE для препарата и способы конъюгации изложены в US7498298, US 11/833,954 и WO 2005081711 (Seattle Genetics, Inc.) (которые включены сюда в виде ссылки), причем молекула линкера mcMMAE связывается с антителами против TF по цистеинам при помощи способа, близкого приведенному там.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-011-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-098-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-111-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-114-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-011-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-098-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-111-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгат антитела против TF с препаратом представлен HuMab-TF-114-mcMMAF.

В альтернативном воплощении антитело против TF конъюгировано с терапевтической молекулой, такой как цитотоксин, химиотерапевтический препарат, цитокин, иммуносупрессор или радиоизотоп. Такие конъюгаты именуется здесь "иммуно-конъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько цитотоксинов, именуется "иммунотоксинами".

Цитотоксином или цитотоксическим средством является любое вещество, которое губительно (например, уничтожает) для клеток. Подходящими терапевтическими средствами для получения иммуноконъюгатов настоящего изобретения являются таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, майтанзин или его аналоги или производные, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин; калихеамицин или его аналоги или производные; антиметаболиты (как-то метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие реагенты (как-то мехлоретамин, тиоэпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, как-то карбоплатин; а также дуокармицин А, дуокармицин SA, CC-1065 (иначе рахелмицин) или аналоги или производные CC-1065), доластатин, пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепины (PDBs) или их аналоги, антибиотики (такие как дактиномицин (бывший актиномицин), блеомицин, даунорубицин (бывший дауномицин), доксорубицин, идарубицин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC)), антимитотические агенты (например, ингибиторы тубулина), как-то дифтерийный токсин и родственные ему молекулы (как-то цепь А дифтерийного токсина, её активные фрагменты и гибридные молекулы); токсины рицина (как-то рицин А или дегликозилированная цепь А рицина), холерный токсин, а Shiga-подобный токсин (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), токсин LT, токсин С3, Shiga-токсин, коклюшный токсин, столбнячный токсин, соевый ингибитор протеаз Bowman-Birk, экзотоксин *Pseudomonas*. алорин, сапорин, модекцин, желанин, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, токсины феномицин и еномицин. Другими подходящими для конъюгирования молекулами являются противомикробные/литические пептиды типа CLIP, магайнина 2, меллитина, цекропина и P18; рибонуклеаза (РНКаза), ДНКаза I, стафилококковый энтеротоксин А, противовирусный белок фитолакка, дифтерийный токсин и эндотоксин *Pseudomonas*. Например, см. Pastan et al, Cell 47, 641 (1986); и Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Терапевтические средства, которые могут вводиться в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF настоящего изобретения, как описано здесь, такие, например, как противораковые цитокины или хемокины, также являются кандидатами для терапевтических молекул, пригодных для конъюгации с антителами, раскрытыми в настоящем изобретении.

В другом альтернативном воплощении конъюгаты препарат-антитело против TF, раскрытые в настоящем изобретении, включают конъюгированную нуклеиновую кислоту или связанную с нуклеиновой кислотой молекулу. В одном таком воплощении конъюгированная нуклеиновая кислота представлена цитотоксической рибонуклеазой, бессмысловой нуклеиновой кислотой, молекулой ингибиторной РНК (например, молекулой siRNA) или иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой (например, иммуностимулирующей молекулой ДНК, содержащей мотив CpG). В другом альтернативном воплощении антитело против TF по изобретению конъюгировано с аптамером или рибозимом вместо ауристатиона или его функционального пептидного аналога или производного.

В другом альтернативном воплощении предусмотрены конъюгаты препарат-антитело против TF, содержащие одну или несколько меченых радиоизотопами аминокислот. Меченые радиоизотопами антитела против TF могут применяться для диагностических и для терапевтических целей (конъюгация с радиоактивно мечеными молекулами является другой возможной особенностью). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  и  $^{186}\text{Re}$ . Способы получения меченых радиоизотопами аминокислот и связанных с ними пептидных производных известны (например, см. Junghans et al, in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd edition, Chaffer and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 и US 5,697,902. Например, радиоизотоп может быть конъюгирован с помощью хлорамина Т.

В одном воплощении антитело конъюгировано с радиоизотопом или с хелатом, содержащим радиоизотоп. Например, антитело может быть конъюгировано с хелатным линкером, например, DOTA, DTPA или тиуксетаном, что позволяет образование комплекса антитела с радиоизотопом. Антитело может также или альтернативно содержать или быть конъюгированным с одной или несколькими радиоактивно мечеными аминокислотами или другими радиомечеными молекулами. Радиоактивно меченое антитело против TF может применяться для диагностических и для терапевтических целей. Неограничивающие примеры радиоизотопов включают  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{213}\text{Bs}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и  $^{227}\text{Th}$ .

Антитела против TF также могут быть химически модифицированы ковалентной конъюгацией с полимером, например, для увеличения времени полужизни в кровотоке. Типичные полимеры и способы присоединения их к пептидам представлены, к примеру, в US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 и US 4,609,546. Дополнительные полимеры включают полиоксипропилированные полиолы и полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG с молекулярным весом от 1000 до 40000, как-то от 2000 до 20000). Их можно использовать, к примеру, если антитело против TF является фрагментом.

Для конъюгирования антител против TF, раскрытых в настоящем изобретении, с конъюгируемыми молекулами типа тех, что описаны выше, можно использовать любые известные способы, включая способы, описанные в Hunter et al, Nature 144, 945 (1962); David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981); и Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982). Такие антитела могут быть получены путем химической конъюгации другой молекулы с N-концевой или C-концевой стороной антитела против TF или его фрагмента (например, цепи H или L антитела против TF) (например, см. Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Такие конъюгированные производные антител также могут быть получены при конъюгации по внутренним остаткам или сахарам, если нужно.

Вещества можно конъюгировать непосредственно или косвенно с антителами против TF, раскрытыми в настоящем изобретении. Одним из примеров непрямого конъюгирования второго агента является конъюгация через молекулу спейсера с остатками цистеина или лизина в антителе. В одном воплощении антитело против TF конъюгируют, через спейсер или линкер, с молекулой пролекарства, которая может быть активирована *in vivo* до терапевтического препарата. Спейсеры или линкеры после введения расщепляются связанными с раковыми клетками ферментами или другими специфическими для опухоли условиями, при которых образуется активный препарат. Примеры таких пролекарственных технологий и линкеров описаны в WO 02083180, WO 2004043493, WO 2007018431, WO 2007089149, WO 2009017394 и WO 201062171 от Syntarga BV et al. (все они включены сюда в виде ссылки). Подходящие технологии антитела-пролекарства и аналоги дуокармицина также приведены в U.S. Patent No. 6,989,452 (Medarex) (включенном сюда в виде ссылки).

В одном воплощении антитело против TF настоящего изобретения присоединяется к хелаторному линкеру, например, тиуксетану, что позволяет конъюгировать антитело с радиоизотопом.

В следующем аспекте изобретение касается экспрессирующих векторов, кодирующих антитела изобретения. Например, если антитело против TF настоящего изобретения конъюгируют с другой терапевтической молекулой, чем ауристин или его функциональный пептидный аналог или производное. Такие экспрессирующие вектора в одном воплощении могут применяться для экспрессии антител против TF настоящего изобретения, которые затем можно конъюгировать с молекулой, как описано здесь.

В одном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1-4, 5-8, 33-36, 37-40, 41-44, 45-48, 73-76 и 77-80.

В другом воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VH, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 5, 37 и 33.

В одном предпочтительном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей CDR3 V<sub>H</sub>, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO 4, 8, 40 и 36.

В другом предпочтительном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей V<sub>L</sub>, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 41, 45, 77 и 73.

В другом воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей CDR3 V<sub>L</sub>, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 44, 48, 80 и 76.

В предпочтительном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую варианты одной или нескольких из вышеприведенных аминокислотных последовательностей, причем данные варианты содержат не более 25 модификаций аминокислот, как-то 20, например, не более 15, 14, 13, 12 или 11 модификаций аминокислот, как-то 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 модификацию аминокислот, как-то делеций или вставок, предпочтительно замен типа консервативных замен, или же они по меньшей мере на 80% идентичны любой из данных последовательностей, например, по меньшей мере на 85%, или на 90%, или на 95% идентичны, как-то на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99% идентичны любой из вышеприведенных аминокислотных последовательностей.

В следующем воплощении экспрессирующий вектор дополнительно содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область легкой цепи, тяжелой цепи или же легкой и тяжелой цепи антитела, например, человеческого антитела.

Такие экспрессирующие вектора могут применяться для рекомбинантного получения антител изобретения.

Экспрессирующим вектором в контексте настоящего изобретения может быть любой подходящий

вектор, включая хромосомные, нехромосомные вектора и вектора из синтетических нуклеиновых кислот (последовательностей нуклеиновой кислоты, содержащих подходящий набор контролирующих экспрессию элементов). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговые ДНК, бакуловирусы, плазмиды дрожжей, вектора, полученные комбинацией плазмид и фаговой ДНК, и вектора из вирусных нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). В одном воплощении кодирующая антитело против TF нуклеиновая кислота содержится в "голом" векторе из ДНК или РНК, включая, к примеру, линейные экспрессирующие элементы (как описано, к примеру, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), сжатые вектора из нуклеиновой кислоты (как описано, к примеру, в US 6,077, 835 и/или WO 00/70087), плазмидные вектора типа pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, вектора из нуклеиновой кислоты минимального размера "midge" (как описано, к примеру, в Schakowski et al, *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или в виде осажденной векторной конструкции из нуклеиновой кислоты, например, осажденной CaPO<sub>4</sub> конструкции (как описано, к примеру, в WO 00/46147; Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986); Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978); и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие вектора из нуклеиновой кислоты и их применение хорошо известны (например, см. US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном воплощении вектор подходит для экспрессии антител против TF в бактериальных клетках. Примеры таких векторов включают такие экспрессирующие вектора, как BlueScript (Stratagene), вектора pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), вектора pET (Novagen, Madison WI) и др.).

Экспрессирующим вектором также или альтернативно может быть вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящими векторами являются, к примеру, вектора, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, как-то альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH (см. обзоры в F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience, New York (1987); и Grant et al., *Methods in Enzymol.* 153, 516-544 (1987)).

Нуклеиновая кислота и/или вектор также может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направить полипептид, как-то возникающую полипептидную цепь, в периплазматическое пространство или в среду клеточной культуры. Такие последовательности известны и включают лидера секреции или сигнальные пептиды, последовательности, направляющие в органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, последовательности транспорта в митохондрии, последовательности транспорта в хлоропласты), последовательности мембранной локализации/ якорные последовательности (например, последовательности остановки переноса, якорные последовательности GPI) и др.

В экспрессирующем векторе изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против TF, могут содержать или быть связаны с любым подходящим промотором, энхансером и другими способствующими экспрессии элементами. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер IE вируса CMV человека, а также промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и LTR вируса HIV), эффективные последовательности терминации поли(A), начало репликации для получения плазмид в *E. coli*, гены устойчивости к антибиотикам в качестве селективируемых маркеров и/или удобные сайты клонирования (например, полилинкеры). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцибельный промотор в отличие от конститутивного промотора типа IE CMV (специалистам должно быть известно, что такие термины фактически служат для описания степени экспрессии генов при определенных условиях).

В одном воплощении экспрессирующий вектор, кодирующий антитело против TF, может быть расположен и/или доставлен в клетки хозяина или организм животного при помощи вирусного вектора.

В следующем аспекте изобретение касается рекомбинантных эукариотических или прокариотических клеток хозяина типа трансфектомы, которые вырабатывают приведенные здесь антитела против TF по изобретению или биспецифичные молекулы по изобретению. Примеры клеток хозяина включают дрожжевые, бактериальные клетки и клетки млекопитающих, как-то клетки CHO или НЕК. Например, в одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, стабильно встроенную в клеточный геном и содержащую последовательность, которая кодирует экспрессию антитела против TF настоящего изобретения. В другом воплощении настоящего изобретения предусмотрены клетки, содержащие не встроенную нуклеиновую кислоту типа плазмиды, космиды, фагемиды или линейного экспрессирующего элемента, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессию антитела против TF по изобретению.

В другом аспекте изобретение касается гибридомы, вырабатывающей приведенные здесь антитела изобретения. В следующем аспекте изобретение касается трансгенных животных, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь человека, причем животные или растения вырабатывают антитела по изобретению.

Получение таких гибридом и трансгенных животных было описано выше.

В другом аспекте изобретение касается способа получения антител против TF по изобретению, который включает стадии:

а) культивирования гибридомы или клеток хозяина по изобретению, как описано выше, и

- b) очистки антител изобретения из культуральной среды, и необязательно
- c) трансформации антител против TF в ADC.

#### **Фармацевтические композиции**

После очистки конъюгатов препарат-антитело против TF они могут быть заключены в фармацевтические композиции с помощью хорошо известных фармацевтических носителей или наполнителей.

Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными вспомогательными веществами и наполнителями в соответствии со стандартными методами типа тех, что изложены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Фармацевтически приемлемые носители или наполнители, а также любые другие известные вспомогательные вещества и разбавители должны подходить для конъюгатов антитело-препарат настоящего изобретения и выбранного способа введения. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтической композиции определяется на основании отсутствия значительного отрицательного воздействия на требуемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции настоящего изобретения (например, не столь значительного воздействия (относительного ингибирования на 10% или меньше, относительного ингибирования на 5% или меньше и т.д.) или на связывание антигена).

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения также может включать разбавители, наполнители, соли, буфера, детергенты (например, неионные детергенты типа Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белка аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизирующие вещества и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Особенно хорошей мишенью для конъюгатов препарат-антитело против TF по изобретению могут быть раковые клетки, суперэкспрессирующие TF, так как может связываться больше антител на клетку. Так, в одном воплощении больные раком, подлежащие лечению конъюгатом препарат-антитело против TF по изобретению, представлены больными, например, раком поджелудочной железы, раком легких или колоректальным раком, у которых в опухолевых клетках установлено наличие одной или нескольких мутаций в K-ras и/или одной или нескольких мутаций в p53. Экспрессия TF находится под контролем двух крупнейших трансформирующих событий, вызывающих прогрессирование заболевания (активации онкогена K-ras и инактивации супрессора опухолей p53) зависимым от МЕК/митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI3K) образом (Yu et al. (2005) Blood 105:1734).

Фактический уровень дозы конъюгата антитело-препарат в фармацевтических композициях настоящего изобретения может варьироваться с тем, чтобы получить количество конъюгата антитело-препарат, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа для определенного пациента, композиции и способа применения, но не быть токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность используемой конкретной композиции настоящего изобретения, способа применения, времени введения, скорости выведения используемого конкретного соединения, продолжительности лечения, других лекарственных препаратов и/или материалов, используемых в комбинации с данной композицией, возраста, пола, веса, заболевания, общего состояния здоровья и предыдущей медицинской истории пациента, подлежащего лечению, и других подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическая композиция может вводиться любым подходящим способом. Подходящие способы введения конъюгатов антитело-препарат настоящего изобретения хорошо известны и могут быть выбраны рядовым специалистом.

В одном воплощении фармацевтическая композиция настоящего изобретения вводится парентерально.

Выражения "парентеральное введение" и "вводится парентерально" в настоящем изобретении означают другие способы введения, чем энтеральное и топическое, обычно посредством инъекции, и включают эпидермальное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное, внутриглазное, внутри-сердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, внутрисухожильное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное, внутричерепное, внутригрудное, эпидуральное и интрастернальное введение и вливание.

В одном воплощении фармацевтическая композиция вводится посредством внутривенного или подкожного введения или вливания.

Фармацевтически приемлемые носители включают всевозможные подходящие растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства поддержания изотоничности, антиоксиданты, замедляющие всасывание средства и др., которые физиологически совместимы с конъюгатами антитело-препарат настоящего изобретения.

Примерами подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях настоящего изобретения, являются вода, физраствор, фосфатно-солевой буфер, этанол, декстроза, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и др.) и подхо-

дящие их смеси, растительные масла, как-то оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и органические эфиры для инъекций типа этилолеата и/или различные буфера. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления *ex tempore* стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций хорошо известно. За исключением случаев, когда какая-то обычная среда или вещество несовместимы с конъюгатом препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения, предусмотрено их применение в фармацевтических композициях настоящего изобретения.

Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, за счет покрывающих материалов, таких как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и использованием поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и др.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутиловый гидроксианизол (ВНА), бутиловый гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и др.; и (3) хелаторы металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и др.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать средства поддержания изотоничности, такие как сахара, полиспирты, как-то маннитол, сорбитол, глицерин или хлористый натрий в композициях.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для выбранного способа применения, таких как консерванты, увлажняющие вещества, эмульгирующие вещества, диспергирующие вещества, консерванты или буфера, которые могут увеличить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Конъюгаты препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения могут быть приготовлены с носителями, которые будут предохранять от быстрого высвобождения соединения, например, составы с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразложимые биосовместимые полимеры типа этиленвинилацетата, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, поли-ортоэфиры и полимеры молочной кислоты сами по себе или вместе с воском или другими материалами, хорошо известными в данной области. Способы получения таких составов хорошо известны специалистам. Например, см. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения могут быть заключены в лекарственную форму, обеспечивающую надлежащее распределение *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления *ex tempore* стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-то обычная среда или вещество несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях настоящего изобретения. В композиции также могут входить дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосом или других упорядоченных структур, подходящий для высоких концентраций препарата. Носителем может быть водный или неводный растворитель или диспергирующая среда, содержащая, к примеру, воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, например, этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, с помощью таких покрытий, как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно следует включать в композицию изотонические вещества, к примеру, сахара, полиспирты, как-то глицерин, маннитол, сорбитол или хлористый натрий. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может обеспечиваться включением в композицию вещества, замедляющего всасывание, к примеру, соли моностеарата и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены введением конъюгата препарат-антитело против ТГ в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или несколькими ингредиентами, например, перечисленными выше, как положено, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Обычно дисперсии получают путем введения конъюгата препарат-антитело против ТГ в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие нужные ингредиенты, например, из пе-

речисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов получения являются вакуумная сушка и замораживание-высушивание (лиофилизации), дающие порошок активного вещества плюс дополнительных нужных ингредиентов из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может содержать один конъюгат препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения или несколько конъюгатов препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения.

Как описано выше, в другом аспекте, изобретение касается приведенных здесь конъюгатов препарат-антитело против ТФ по изобретению для применения в качестве лекарств.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ по изобретению могут применяться для различных целей. В частности, конъюгаты препарат-антитело против ТФ по изобретению могут применяться для лечения различных форм рака. В одном аспекте конъюгаты препарат-антитело против ТФ по изобретению применяются для лечения различных твердых форм рака, как-то опухолей центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких (например, немелкоклеточного рака легких), рака молочной железы (например, втройне отрицательного рака молочной железы), рака пищевода, рака желудка, рака печени и желчевыводящих протоков, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почек, рака предстательной железы, рака эндометрия, рака яичников, злокачественной меланомы, саркомы (мягких тканей, например, костей и мышц), опухолей неизвестного первичного происхождения (т.е. неизвестных первичных), лейкемии, рака костного мозга (как-то множественной миеломы), острой лимфобластной лейкемии, хронической лимфобластной лейкемии и неходжкинской лимфомы, острой миелоидной лейкемии (AML), рака кожи, глиомы, рака головного мозга, матки и прямой кишки.

Кроме того, с помощью конъюгатов препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения можно лечить аутоиммунное воспаление, как-то миопатии или рассеянный склероз.

Также по настоящему изобретению можно лечить связанные с раком нарушения гемостаза.

Далее, с помощью антител против ТФ настоящего изобретения можно лечить такие воспалительные заболевания, как миопатии, ревматоидный артрит, остеоартрит, анкилозирующий спондилит, подагра, спондилоартропатия, болезнь Бехтерева, синдром Рейтера, псориагическая артропатия, энтеропатический спондилит, ювенильная артропатия, реактивная артропатия, инфекционный или постинфекционный артрит, туберкулезный артрит, вирусный артрит, грибковый артрит, сифилитический артрит, гломерулонефрит, терминальная стадия почечной недостаточности, системная красная волчанка, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительная болезнь кишечника, кистозный фиброз, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), астма, аллергическая астма, бронхит, острый бронхиолит, хронический бронхиолит, идиопатический фиброз легких или рассеянный склероз.

Также с помощью конъюгатов препарат-антитело против ТФ можно лечить сосудистые заболевания, такие как рестеноз сосудов, сосудистые заболевания миокарда, сосудистые заболевания головного мозга, ретинопатия и дегенерация желтого пятна, включая, без ограничения, мокнущую AMD.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения могут быть полезными при лечении пациентов с риском сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, гипертония, диабет, дислипидемия и острый коронарный синдром, включая, без ограничения, острый инфаркт миокарда, инсульт.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для подавления тромбозов, как-то DVT, почечной эмболии, легочной эмболии, артериального тромбоза, или для лечения тромбозов, возникающих после хирургических операций на артериях, шунтирования периферических сосудов или аортокоронарного шунтирования, артериовенозного шунтирования, удаления имплантов, таких как стенты или катетеры.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для подавления ишемического реперфузионного повреждения почек.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для лечения гиперлипотеинемии или гиперпаратиреоза.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для лечения васкулита, ANCA-положительного васкулита или болезни Бехчета.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для блокирования травматической дыхательной недостаточности, как-то острого респираторного дистресс-синдрома или острого повреждения легких.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для блокирования вызванных инфекцией дисфункций органов, как-то почечной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома или острого повреждения легких.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными для лечения различных тромбоэмболических заболеваний, например, возникающих при ангиопластике, инфаркте миокарда, нестабильной стенокардии и стенозе коронарных артерий.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения также могут быть полезными при профилактическом лечении опосредованных ТФ осложнений таких системных инфекций, как сепсис



или пневмония.

Конъюгаты препарат-антитело против TF настоящего изобретения также могут быть полезными при профилактическом лечении пациентов с атеросклеротическими сосудами, подверженных риску тромбоза.

Конъюгаты препарат-антитело против TF настоящего изобретения также могут быть полезными для лечения реакции "трансплантат против хозяина".

Конъюгаты препарат-антитело против TF настоящего изобретения также могут быть полезными для усиления приживления  $\beta$ -клеток при трансплантации островков, для предотвращения васкулопатии сердечных аллотрансплантатов (CAV) и для предотвращения острого отторжения трансплантатов.

Кроме того, изобретение касается способа подавления роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих TF, который включает введение нуждающемуся в этом индивиду конъюгата препарат-антитело против TF по изобретению. В одном воплощении такие опухолевые клетки связаны с раком, таким как рак предстательной железы, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, тройне отрицательный рак молочной железы), колоректальный рак (например, метастатический колоректальный рак), рак поджелудочной железы, рак эндометрия, рак яичников, кожная меланома, лейкемия, рак костного мозга (например, множественная миелома), острая лимфобластная лейкемия, хроническая лимфобластная лейкемия и неходжкинская лимфома, рак кожи, рак простаты, глиома, рак головного мозга, почек, матки, мочевого пузыря, острой миелоидной лейкемии (AML) и рак прямой кишки.

Изобретение также касается применения конъюгатов препарат-антитело против TF, связывающихся с TF человека, для изготовления лекарств для лечения рака, как-то одного из конкретных раковых заболеваний, приведенных выше.

В одном воплощении отбор пациентов для лечения конъюгатами препарат-антитело против TF основывается на уровне TF в моче и/или крови. В предпочтительном воплощении лечению подлежат пациенты с относительно высоким уровнем TF в моче и/или крови. Например, лечению подлежат пациенты, у которых уровень TF в моче составляет более 20 нг/мл, как-то более 40 нг/мл, например, более 100 нг/мл, как-то более 200 нг/мл. При этом уровень TF в сыворотке пациентов может составлять более 100 пг/мл, как-то более 200 пг/мл. Его можно определить, например, методом ELISA. Методы для этого включают, без ограничения, описанные ниже в связи с диагностическим применением.

Тем не менее, в рамки настоящего изобретения также входит лечение конъюгатами препарат-антитело против TF настоящего изобретения и пациентов с более низким уровнем TF в моче и/или крови.

В одном воплощении отбор пациентов, подлежащих лечению конъюгатами препарат-антитело против TF настоящего изобретения, может основываться на уровне экспрессии TF. Уровень экспрессии TF можно оценить путем обработки пациентов радиоактивно меченым антителом против TF с последующим измерением уровня радиоактивности у пациентов. Радиоактивно меченое антитело против TF может быть представлено антителом против TF, описанным в настоящем изобретении, т.е. антителом из описанных здесь конъюгатов препарат-антитело против TF, или другим антителом против TF. Примерами радиоактивных меток могут быть любые из тех, что описаны выше в связи с радиоактивным мечением антител. Методы для этого включают, без ограничения, описанные ниже в связи с диагностическим применением.

В другом воплощении способов лечения по настоящему изобретению во время терапии отслеживается эффективность лечения, например, в заданные моменты времени. В одном воплощении эффективность можно отслеживать по измерению уровня TF в моче или крови, к примеру, методом ELISA. Методы для этого включают, без ограничения, описанные ниже в связи с диагностическим применением. В другом воплощении эффективность может определяться путем визуализации пораженного участка, например, по одному или нескольким снимкам методом ПЕТ-СТ, к примеру, с помощью меченого антитела против TF, как-то меченого антитела против TF, описанного в настоящем изобретении. Кроме того, меченые антитела против TF, как-то раскрытые здесь меченые антитела 011, 098, 114 и 111 против TF можно использовать для выявления TF-продуцирующих опухолей, например, методом ПЕТ-СТ.

Схемы дозировки в вышеприведенных способах лечения и применения подбираются так, чтобы обеспечить оптимальный требуемый терапевтический ответ. Например, можно вводить однократную дозу, можно вводить несколько дробных доз по времени или же можно пропорционально уменьшать или увеличивать дозу, исходя из конкретной терапевтической ситуации. Парентеральные композиции можно составлять в виде дозовых форм для легкости введения и однородности дозировки. Дозовая форма в настоящем изобретении относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве стандартной дозировки для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на получение требуемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для дозовых форм настоящего изобретения определяется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и требуемого конкретного терапевтического эффекта, и (б) ограничений, существующих в области составления рецептур такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидов.

Эффективные дозировки и схемы дозировки для конъюгатов препарат-антитело против TF зависят

от подлежащего лечению заболевания и может быть установлены специалистами. Типичный, без ограничения, диапазон для терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения составляет 0,1-100 мг/кг, как-то 0,1-50 мг/кг, например, 0,1-20 мг/кг, как-то 0,1-10 мг/кг, как-то 0,5-5 мг/кг, например, 5 мг/кг, как-то 4 мг/кг или 3 мг/кг или 2 мг/кг или 1 мг/кг или 0,5 мг/кг или 0,3 мг/кг. Типичный, без ограничения, диапазон для терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения составляет 0,02-30 мг/кг, как-то 0,1-20 мг/кг или 0,5-10 мг/кг или 0,5-5 мг/кг, например, 1-2 мг/кг, в частности, для приведенных здесь антител 011, 098, 114 или 111.

Врач с рядовой квалификацией в данной области может легко установить и прописать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач может начать с дозы конъюгата препарат-антитело против ТГ, используемого в фармацевтической композиции, на меньшем уровне, чем это требуется для получения терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу, пока не будет достигнут требуемый эффект. В общем, подходящая суточная доза композиции настоящего изобретения должна быть такой, чтобы количество соединения составляло самую низкую дозу, достаточную для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза будет в целом зависеть от факторов, описанных выше. Введение может осуществляться, например, внутривенно, внутримышечно, внутривентриально или подкожно, например, проксимально к местонахождению мишени. Если нужно, эффективная суточная доза фармацевтической композиции может вводиться в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более дробных доз, вводимых по отдельности через соответствующие промежутки в течение суток, необязательно в виде дозовых форм. Хотя конъюгаты препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения можно вводить и сами по себе, однако предпочтительно конъюгаты препарат-антитело против ТГ вводятся в виде фармацевтической композиции, как описано выше.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ можно вводить вливанием в еженедельной дозе от 10 до 1500 мг/м<sup>2</sup>, как-то от 30 до 1500 мг/м<sup>2</sup>, или от 50 до 1000 мг/м<sup>2</sup>, или от 10 до 500 мг/м<sup>2</sup>, или от 100 до 300 мг/м<sup>2</sup>. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, как-то от 3 до 5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывного вливания на протяжении от 2 до 24 ч, как-то от 2 до 12 ч.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ вводятся путем вливания каждую третью неделю в дозе от 30 до 1500 мг/м<sup>2</sup>, как-то от 50 до 1000 мг/м<sup>2</sup> или от 100 до 300 мг/м<sup>2</sup>. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, как-то от 3 до 5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывного вливания на протяжении от 2 до 24 ч, как-то от 2 до 12 ч.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ вводятся путем медленного непрерывного вливания на протяжении длительного времени, как-то более 24 ч, для снижения токсических побочных эффектов.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ можно вводить в еженедельной дозе от 50 мг до 2000 мг, как-то, к примеру 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500 или 2000 мг, вплоть до 16 раз, как-то от 4 до 10 раз, как-то от 4 до 6 раз. Введение может осуществляться путем непрерывного вливания на протяжении от 2 до 24 ч, как-то от 2 до 12 ч. Такая схема может повторяться один или несколько раз по необходимости, например, через 6 месяцев или 12 месяцев. Дозировка может определяться или подбираться путем измерения количества конъюгата препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения в крови после введения, например, отбирая биологические образцы и используя антиидиотипические антитела, мишенью которых является антиген-связывающий участок конъюгатов препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ вводятся в качестве поддерживающей терапии, к примеру, раз в неделю на протяжении 6 месяцев или больше.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против ТГ вводятся по схеме, включающей одно вливание конъюгата препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения с последующим вливанием антитела против ТГ настоящего изобретения, как-то раскрытого здесь антитела 011, 098, 114 или 111, содержащего радиоактивный изотоп. Такая схема может быть повторена, например, через 7-9 дней.

В качестве неограничивающего примера лечение по настоящему изобретению может проводиться при введении конъюгата препарат-антитело против ТГ настоящего изобретения раз в неделю, раз в 2 недели, раз в 3 недели или раз в месяц в количестве 0,1-100 мг/мг, как-то 0,3-3 мг/мг, например, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мг в день, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 день или же по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 неделю или в некоторых случаях 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 неделю после начала лечения или же в любой комбинации, используя однократные или дробные дозы через каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч или же в любой комбинации.

"Эффективное количество" для противоопухолевой терапии также можно измерить по его способности стабилизировать течение болезни. Способность соединения к подавлению рака можно оценить на модельной системе у животных, прогнозирующей эффективность на опухолях человека. С другой сторо-

ны, это свойство композиции можно оценить, исследуя способность соединения ингибировать клеточный рост или индуцировать апоптоз методами *in vitro*, известными практикующим специалистам. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размеры опухоли либо иным образом ослаблять симптомы у субъекта. Рядовой специалист сможет определить такие количества, исходя из таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная композиция или выбранный способ введения.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ можно вводить профилактически для уменьшения риска развития рака, замедления начала возникновения события при прогрессировании рака и/или снижения риска рецидива при ремиссии рака. Это может быть особенно полезно тем пациентам, у которых трудно локализовать опухоль, наличие которой известно по другим биологическим факторам.

Конъюгаты препарат-антитело против ТФ также можно вводить при комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими терапевтическими средствами, уместными для подлежащего лечению заболевания. Соответственно, в одном воплощении лечебный конъюгат препарат-антитело против ТФ предназначен для комбинирования с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, как-то цитотоксическими, химиотерапевтическими или антиангиогенными средствами.

Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным. При одновременном введении средства вводятся в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, как получится. Таким образом, настоящим изобретением также предусмотрены способы лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих ТФ, как описано выше, которые включают введение конъюгата препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, как описано ниже.

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих ТФ у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения и по меньшей мере одного химиотерапевтического средства нуждающегося в этом субъекту.

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или предотвращения рака, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения и по меньшей мере одного химиотерапевтического средства нуждающегося в этом субъекту.

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрено применение конъюгата препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения для изготовления фармацевтической композиции, предназначенной для введения по меньшей мере с одним химиотерапевтическим средством для лечения рака.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из антиметаболитов, таких как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарабин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин и аналогичных средств.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из алкилирующих средств, таких как мехлорэтамин, тиоэпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотосин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины типа карбоплатина и аналогичных средств.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из антимитотических средств типа таксанов, например, доцетакселя, паклитакселя, и алкалоидов барвинка, к примеру, виндесина, винкристина, винбластина и винорелбина.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из ингибиторов топоизомеразы, таких как топотекан или иринотекан.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из цитостатических препаратов, таких как эпопозид и тенипозид.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из ингибиторов факторов роста, как-то ингибиторов ErbB1 (EGFR) (таких как иресса, эрбитукс (цетуксимаб), тарцева и аналогичные средства), ингибиторов ErbB2 (Her2/neu) (таких как герцептин и другие подобные средства) и аналогичных средств.

В одном воплощении такое химиотерапевтическое средство может быть выбрано из ингибиторов тирозинкиназы, таких как иматиниб (Glivec, Gleevec STI571), лапатиниб, РТК787/ZK222584 и аналогичные средства.

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих ТФ у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения и по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или иной васкуляризации нуждающегося в этом субъекту.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы, ингибиторы матриксных металлопротеаз (как-то маримастат, неовастат, ВАУ 12-9566, АГ 3340, ВМС-275291 и аналогичные средства), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (как-то ТНР-470, скваламин, 2-метоксиэстрадиол, комбрета-статины, эндостатин, ангиостатин, пеницилламин, SCH66336 (Schering-

Plough Corp., Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica Inc, Titusville, NJ) и аналогичные средства), антагонисты ангиогенных факторов роста (как-то ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных агентов и/или их рецепторов (типа VEGF, bFGF и ангиопоэтина-1), талидомид, аналоги талидомида (как-то CC-5013), Sugen 5416, SU5402, антиангиогенные рибозимы (например, ангиозим), интерферон-а (например, интерферон- $\alpha$ 2a), сурамин и аналогичные средства), ингибиторы киназы VEGF-R и ингибиторы других антиангиогенных тирозинкиназ (например, SU011248), ингибиторы эндотелиального интегрин/сигнального пути выживания (как-то витаксин и аналогичные средства), антагонисты/хелаторы меди (как-то тетратиомолибдат, каптоприл и аналогичные средства), карбоксиамидо-триазол (CAI), АВТ-627, СМ101, интерлейкин-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, а также нуклеотидные молекулы, ингибирующие ангиогенез (как-то антисмысловая ДНК VEGF, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая p53, и кДНК, кодирующая дефектный рецептор-2 VEGF) и аналогичные средства.

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации и/или иной васкуляризации являются антиангиогенные производные гепарина и родственные им молекулы (например, гепариназа III), темозоломид, NK4, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), ингибиторы циклооксигеназы-2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1, антиангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагиллин и его аналоги, аналоги соматостатина, пентозанполисульфат, текогалан натрия, дальтепарин, тумстатин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других соответствующих мишеней (такие как mAbs против  $\alpha$ -v/ $\beta$ -3 интегрин и против кининостатина) и аналогичные средства.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой противораковый иммуноген, как-то раковый антиген/опухолевый антиген (например, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM/TACSTD1), муцин 1 (MUC1), карциноэмбриональный антиген (CEA), опухолевый гликопротеин 72 (TAG-72), g100, мелан-А, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, связанные с раком вирусные вакцины (например, вакцины от папилломавируса человека), опухолевые белки теплового шока и аналогичные средства. Ряд других подходящих раковых антигенов/опухолевых антигенов, описанных здесь, и аналогичные молекулы, известные в данной области, тоже могут применяться в таком воплощении. Противораковые иммуногенные пептиды также включают антиидиотипические "вакцины", как-то антиидиотипические антитела к ВЕС2, митомумаб, SeaVac и родственные им антиидиотипические антитела, антиидиотипическое антитело к антителу MG7 и другие противораковые антиидиотипические антитела (например, см. Birebent et al, Vaccine 21(15), 1601-12 (2003); Li et al., Chin Med J (Engl) 114(9), 962-6 (2001); Schmitt et al., Hybridoma 13(5), 389-96 (1994); Maloney et al., Hybridoma 4(3), 191-209 (1985); Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9 (1986); Pohl et al., Int J Cancer 50(6), 958-67 (1992); Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8 (1996); и Maruyama, J Immunol Methods 264(1-2), 121-33 (2002)). Такие антиидиотипические Abs необязательно могут быть конъюгированы с носителем, которым может быть синтетическая (как правило, инертная) молекула носителя, белок (к примеру, гемоцианин моллюска блюдечко (KLH) (например, см. Ochi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)) или клетки (к примеру, эритроциты - например, см. Wi et al., J Immunol Methods 122(2), 227-34 (1989)).

В одном воплощении изобретения конъюгат препарат-антитело против TF комбинируется с иммуноонкологическим препаратом типа Yervoу (ипилимумаб), который потенциально действует, индуцируя Т-клеточный иммунитет против рака. Циторедукция с помощью конъюгата препарат-антитело против TF в комбинации с иммуностимулирующим препаратом может принести значительную клиническую пользу пациентам.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой противораковый цитокин, хемокин или их комбинации. Примеры подходящих цитокинов и факторов роста включают IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$  (например, INF $\alpha$ 2b), IFN $\beta$ , GM-CSF, CD40L, лиганд Flt3, фактор стволовых клеток, анцестим и TNF $\alpha$ . Подходящими хемокинами могут быть Glu-Leu-Arg (ELR)-отрицательные хемокины, такие как IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1 $\alpha$  из семейств CXC и C-C хемокинов человека. Подходящие цитокины включают производные цитокинов, варианты цитокинов, фрагменты цитокинов и слитые белки цитокинов. Эти и другие способы или применения с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих пептиды естественного происхождения, могут дополнительно или альтернативно выполняться методами "активации генов" и повышающей регуляции генов путем гомологичной рекомбинации типа тех, что описаны в US 5,968,502, US 6,063,630, US 6,187,305 и EP 0505500.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой регулятор контроля клеточного цикла /апоптоза (или "регулирующий агент"). Регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза может включать молекулы, которые воздействуют на и модулируют регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза, такие как (i) cdc-25 (например, NSC 663284), (ii) циклин-зависимые киназы, которые суперстимулируют клеточный цикл (как-то флавопиридолы

(L868275, HMR1275), 7-гидроксистауропорин (UCN-01, KW-2401) и росковитин (R-росковитин, CYC202)), и (iii) модуляторы теломеразы (как-то BIBR1532, SOT-095, GRN163 и композиции, описанные, к примеру, в US 6,440,735 и US 6,713,055). Неограничивающие примеры молекул, влияющих на апоптозные пути, включают родственный TNF индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL)/апоптозный лиганд-2 (Apo-2L), антитела, активирующие рецепторы TRAIL, IFNs и антисмысловые Bcl-2.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой гормональное регуляторное средство типа средств, используемых для антиандрогенной и антиэстрогенной терапии. Примерами таких гормональных регуляторных средств являются тамоксифен, идоксифен, фулвестрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстильбестрол, этинилэстрадиол/этинил, антиандрогены (такие как флутаминд/эулексин), прогестины (такие как гидроксипрогестерон капроат, медроксипрогестерон/провера, мегестрол ацепат/ мегас), адренкортикостероиды (такие как гидрокортизон, преднизон), рилизинг-гормон лютеинизирующего гормона (и его аналоги и другие агонисты LHRH, такие как бусерелин и госерелин), ингибиторы ароматазы (такие как анастрозол/аримидекс, аминоглютетимид/ цитраден, экземестан), ингибиторы гормонов (такие как октреотид/сандостатин) и аналогичные средства.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой антианергическое средство (например, соединения небольших молекул, белки, гликопротеины или антитела, нарушающие толерантность к опухолям и раковым антигенам). Примерами таких соединений являются молекулы, блокирующие активность CTLA-4, как-то MDX-010/Yervoy (ипилимумаб) (Phan et al, PNAS USA 100, 8372 (2003)), который потенциально действует, индуцируя Т-клеточный иммунитет против рака. Циторедукция с помощью конъюгата препарат-антитело против TF в комбинации с иммуностимулирующим препаратом может принести значительную клиническую пользу пациентам.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой нуклеиновую кислоту, содержащую ген супрессора опухолей, или вектор типа дефектного по репликации аденовируса, кодирующего рекомбинантный p53/SCH58500 дикого типа человека, и др.; антисмысловую нуклеиновую кислоту, направленную на онкоген, мутированный или дерегулированный ген; или siRNA, направленную на мутированный или дерегулированный ген. Примеры мишеней для супрессора опухолей включают, к примеру, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 и DCC.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний может представлять собой противораковую нуклеиновую кислоту, как-то генасенс (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (инкапсулированный в липосомах антисмысловый олигонуклеотид к c-raf/ISIS-5132), MG98 и другие антисмысловые нуклеиновые кислоты, направленные на PKC $\alpha$ , кластерин, IGFБPs, протеинкиназу А, циклин D1 или Bcl-2h.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF настоящего изобретения для лечения выше описанных заболеваний может представлять собой противораковую ингибиторную молекулу РНК (например, см. Lin et al, Curr Cancer Drug Targets 1(3), 241-7 (2001), Erratum in: Curr Cancer Drug Targets 3(3), 237 (2003); Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004); Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105 (2004); Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003); Yang et al., Oncogene 22(36), 5694-701 (2003); и Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003)).

Композиции и комбинированные способы введения по настоящему изобретению также включают введение вакцин из нуклеиновых кислот типа вакцин из "голой" ДНК, кодирующей такие раковые антигены/опухолевые антигены (например, см. US 5,589,466, US 5,593,972, US 5,703,057, US 5,879,687, US 6,235,523 и US 6,387,888). В одном воплощении комбинированный способ введения и/или комбинированная композиция включает композицию аутологичной вакцины. В одном воплощении комбинированный способ введения и/или комбинированная композиция включает вакцину из целых клеток или клеток, экспрессирующих цитокин (например, экспрессирующих рекомбинантный IL-2 фибробластов, экспрессирующих цитокины дендритных клеток и т.п.) (например, см. Kowalczyk et al., Acta Biochim Pol. 50(3), 613-24 (2003); Reilly et al., Methods Mol Med. 69, 233-57 (2002); и Tirapu et al., Curr Gene Ther. 2(1), 79-89 (2002)). Другим примером такого подхода с аутологичными клетками, который может быть полезным в комбинированных способах настоящего изобретения, является метод индивидуализированной иммунотерапии MyVax® (раньше назывался GTOP-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, США).

В одном воплощении настоящим изобретением предусмотрены комбинированные композиции и комбинированные способы введения, в которых конъюгаты препарат-антитело против TF по настоящему изобретению комбинируются или вводятся совместно с вирусом, вирусными белками и т.п. Полезными

компонентами таких композиций и способов могут быть, к примеру, дефектные по репликации вирусы, которые обычно способны только на один или всего лишь несколько циклов репликации *in vivo* и направлены на опухолевые клетки. Такие вирусные агенты могут содержать или быть связанными с нуклеиновыми кислотами, кодирующими такие иммуностимуляторы, как GM-CSF и/или IL-2. Полезными компонентами таких способов и композиций могут быть как природные онколитические, так и рекомбинантные онколитические вирусы (например, вирусы HSV-1, реовирусы, дефектные по репликации и чувствительные к репликации аденовирусы и др.). Соответственно, в одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены комбинированные композиции и способы введения, в которых конъюгаты препарат-антитело против TF комбинируются или вводятся совместно с онколитическим вирусом. Примеры таких вирусов включают онколитические аденовирусы и герпесвирусы, которые могут быть или не быть модифицированными вирусами (например, см. Shah et al, *J Neurooncol.* 65(3), 203-26 (2003); Stiles et al, *Surgery* 134(2), 357-64 (2003); Sunarmura et al., *Pancreas* 28(3), 326-9 (2004); Teshigahara et al., *J Surg Oncol.* 85(1), 42-7 (2004); Varghese et al., *Cancer Gene Ther.* 9(12), 967-78 (2002); Wildner et al., *Cancer Res.* 59(2), 410-3 (1999); Yamanaka, *Int J Oncol.* 24(4), 919-23 (2004); и Zwiebel et al., *Semin Oncol.* 28(4), 336-43 (2001).

Комбинированные композиции и комбинированные способы введения настоящего изобретения также могут включать методы "цельноклеточной" и "адоптивной" иммунотерапии. Например, такие способы могут включать инфузию или повторное вливание клеток иммунной системы (к примеру, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TILs), как-то Т-клеток CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> (например, Т-клеток, подвергшихся экспансии под действием опухолевых антигенов и/или генетических усилителей), экспрессирующих антитела В-клеток или других клеток, продуцирующих/презентирующих антитела, дендритных клеток (DCs) (например, рекомбинантных дендритных клеток, экспрессирующих антитела к цитокинам, дендритных клеток, подвергавшихся культивированию с вызывающим их экспансию агентом типа GM-CSF и/или Flt3-L, и/или связанных с опухолями нагруженных антигеном дендритных клеток), противоопухолевых клеток NK, так называемых гибридных клеток или их комбинаций. В таких способах и композициях могут быть полезными и клеточные лизаты. Клеточные "вакцины" в клинических испытаниях, которые могут быть полезными в таких аспектах, включают клеточные лизаты Canvaxin, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) и Melacine®. Антигены, выделяющиеся из раковых клеток, и их смеси (например, см. Bystryk et al., *Clinical Cancer Research Vol. 7*, 1882-1887, July 2001), необязательно в смеси с такими адьювантами, как квасцы, тоже могут быть компонентами в таких способах и комбинированных композициях.

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против TF по настоящему изобретению можно вводить пациентам в сочетании с применением способа внутренней вакцинации. Внутренняя вакцинация означает индуцированную гибель опухолевых или раковых клеток, как-то индуцированную лекарствами или индуцированную радиацией гибель опухолевых клеток у пациента, которая, как правило, вызывает иммунный ответ, направленный на (i) опухолевые клетки в целом или (ii) части опухолевых клеток, включая (a) секретлируемые белки, гликопротеины или другие продукты, (b) мембрано-связанные белки или гликопротеины или другие компонентные, связанные или встроенные в мембраны, и/или (c) внутриклеточные белки или другие другие внутриклеточные компоненты.

Иммунный ответ, индуцированный внутренней вакцинацией, может быть гуморальным (т.е. опосредованным антителами-комплементом) или опосредованным клетками (например, развитием и/или возрастанием числа эндогенных цитотоксических Т-лимфоцитов, распознающих погибшие внутриопухолевые клетки или их части). Наряду с лучевой терапией, неограничивающимися примерами лекарств и агентов, которые можно использовать для индуцирования такой гибели опухолевых клеток и внутренней вакцинации, являются стандартные химиотерапевтические средства, ингибиторы клеточного цикла, антиангиогенные препараты, моноклональные антитела, индуцирующие апоптоз вещества и ингибиторы передачи сигналов.

Примерами других противораковых средств, которые могут быть адекватными в качестве терапевтических средств для применения в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF по настоящему изобретению для лечения вышеописанных заболеваний, являются средства, индуцирующие дифференцировку, аналоги ретиноевой кислоты (такие как полностью транс-ретиноевая кислота, 13-цис-ретиноевая кислота и аналогичные вещества), аналоги витамина D (такие как сеокальцитол и аналогичные вещества), ингибиторы ErbB3, ErbB4, IGF-IR, инсулиновых рецепторов, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 и аналогичные средства.

Примерами других противораковых средств, которые могут быть адекватными в качестве терапевтических средств для применения в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF по настоящему изобретению для лечения вышеописанных заболеваний, являются катепсин В, модуляторы активности дегидрогеназы катепсина D, глутатион-S-трансферазы (такие как глутацилцистеинсинтетаза и лактатдегидрогеназа) и аналогичные средства.

Примерами других противораковых средств, которые могут быть адекватными в качестве терапев-

тических средств для применения в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF по настоящему изобретению для лечения вышеописанных заболеваний, являются эстрамустин и эпирубицин.

Примерами других противораковых средств, которые могут быть адекватными в качестве терапевтических средств для применения в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF по настоящему изобретению для лечения вышеописанных заболеваний, являются ингибиторы HSP90 типа 17-аллиламиногелд-анамицина, антитела против таких опухолевых антигенов, как PSA, CA125, KSA и др., интегрин типа интегрин  $\beta 1$ , ингибиторы VCAM и аналогичные средства.

Примерами других противораковых средств, которые могут быть адекватными в качестве терапевтических средств для применения в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF по настоящему изобретению для лечения вышеописанных заболеваний, являются ингибиторы кальциейрина (такие как вальсподар, PSC 833 и другие ингибиторы MDR-1 или  $\beta$ -гликопротеина), ингибиторы TOR (такие как сиролimus, эверолимус и рапамицин) и ингибиторы механизмов "самонаведения лимфоцитов" (такие как FTY720), а также средства, воздействующие на клеточную сигнализацию, такие как ингибиторы молекул адгезии (например, антитела против LFA и др.).

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против TF по изобретению предназначены для применения с одним или несколькими другими терапевтическими антителами, такими как бевацизумаб (Avastin®), залутумумаб, цетуксимаб (Erbix®), панитумумаб (Vectibix™), офатумумаб (Arzetta®), занолумумаб, даратумумаб (HuMax-CD38), ранибизумаб (Lucentis®), даклизумаб (Zenarax®), базиликсимаб (Simulect®), инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®), натализумаб (Tysabri®), омализумаб (Xolair®), эфализумаб (Raptiva®), нимотузумаб, ритуксимаб (Rituxan®/MabThera®) и/или трастузумаб (Herceptin®). Другие терапевтические антитела, которые могут применяться в комбинации с конъюгатами препарат-антитело против TF настоящего изобретения, приведены в WO 98/40408 (антитела, связывающиеся с нативным TF человека), WO 04/094475 (антитела, способные связываться с тканевым фактором человека, которые не ингибируют опосредованное фактором свертывание крови по сравнению с контролем - нормальной плазмой), WO 03/093422 (антитела, связывающиеся с большим средством с комплексом TF:VIIa чем с самим TF), WO 03/037361 (агонисты или антагонисты TF для лечения, связанного с апоптозом) или WO 2010/066803 (моноклональные антитела человека против тканевого фактора).

В одном воплощении конъюгаты препарат-антитело против TF можно вводить вместе с введением одного или нескольких агентов, содействующих доступу конъюгата препарат-антитело против TF или комбинированной композиции внутрь опухоли. Такие способы могут выполняться, к примеру, в связи с введением релаксина, который способен расслабить опухоль (например, см. US 6,719,977). В одном воплощении конъюгат препарат-антитело против TF может быть связан с проникающим в клетки пептидом (CPP). Проникающие в клетки пептиды и родственные им пептиды (как-то искусственные проникающие в клетки антитела) описаны, к примеру, в Zhao et al., J Immunol Methods 254(1-2), 137-45 (2001); Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000); Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76 (2004); Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75 (2003); Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77 (1998); и Tseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих TF у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF настоящего изобретения и по меньшей мере одного противовоспалительного средства нуждающемуся в этом субъекту.

В одном воплощении такое противовоспалительное средство может быть выбрано из аспирина и других салицилатов, ингибиторов Cox-2 (таких как рофекоксиб и целекоксиб), NSAIDs (таких как ибупрофен, фенпрофен, напроксен, сулиндак, диклофенак, пироксикам, кетопрофен, дифлунисал, набуметон, этодолак, оксапрозин и индометацин), антител против IL6R, антител против IL8 (например, антител, описанных в WO 2004058797, например, 10F8), антител против IL15 (например, антител, описанных в WO 03017935 и WO 2004076620), антител против IL15R, антител против CD4 (например, занолумумаб), ан- антител против CD11a (например, эфализумаб), антител против  $\alpha 4/\beta 1$ -интегрин (VLA4) (например, натализумаб), CTLA4-Ig для лечения воспалительных заболеваний, преднизолона, преднизона, модифицирующих заболевание противоревматических препаратов (DMARD) типа метотрексата, гидроксихлорохина, сульфасалазина, ингибиторов синтеза пиримидинов (таких как лефлуномид), блокаторов рецептора IL-1 (таких как анакинра), блокаторов TNF- $\alpha$  (таких как этанерсепт, инфликсимаб и адалимумаб) и аналогичных средств.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих TF у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF настоящего изобретения и по меньшей мере одного иммуносупрессорного и/или иммуномодулирующего средства нуждающемуся в этом субъекту.

В одном воплощении такое иммуносупрессорное и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты, микофенолата мофетила, кортикостероидов типа преднизона, метотрексата, солей золота, сульфасалазина, противомаларийных препа-

ратов, бреквинара, лефлуномида, мизорибина, 15-дезоксиспергуалина, 6-меркаптопурина, циклофосфамида, роапамицина, такролимуса (FK-506), ОКТЗ, глобулина против тимочитов, тимопентина, тимозина- $\alpha$  и аналогичных средств.

В одном воплощении такое иммуносупрессорное и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из иммуносупрессорных антител, как-то антител, связывающихся с р75 рецептора IL-2, антител против CD25 (например, описанных в WO 2004045512 типа AB1, AB7, AB11 и AB12), или антител, связывающихся, к примеру, с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN $\gamma$ R, TNF $\alpha$ R или TNFR (состоит из двух субъединиц: CD120a и CD120b), IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-8R, IL-10R, CD11a или CD58, либо антител, связывающихся с их лигандами.

В одном воплощении такое иммуносупрессорное и/или иммуномодулирующее средство может быть выбрано из растворимых молекул IL-15R, IL-10R, B7 (B7-1, B7-2, их вариантов и фрагментов), ICOS и OX40, ингибиторов отрицательного регулятора T-клеток (как-то антител против CTLA4) и аналогичных средств.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих TF у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF по настоящему изобретению и антитела против C3b(i) нуждающемуся в этом субъекту.

В одном воплощении терапевтическое средство для применения в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против TF для лечения вышеописанных заболеваний может быть выбрано из ингибиторов деацетилаз гистонов (к примеру, фенилбутирата) и/или агентов репарации ДНК (к примеру, ферментов репарации ДНК и аналогичных композиций типа димерицина).

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-011-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-098-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-111-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-114-vcMMAE.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-011-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-098-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-111-mcMMAF.

В одном воплощении конъюгатом препарат-антитело против TF для применения в комбинированной терапии с одним или несколькими вышеприведенными средствами является HuMab-TF-114-mcMMAF.

Способы настоящего изобретения для лечения вышеописанных заболеваний, включающие введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF по настоящему изобретению, также могут включать противораковую фотодинамическую терапию (к примеру, противораковую лазерную терапию - которая необязательно может осуществляться с помощью фотосенсибилизирующего средства, например, см. Zhang et al, J Control Release 93(2), 141-50 (2003)), противораковую звуковолновую и ударноволновую терапию (например, см. Kambe et al., Hum Cell 10(1), 87-94 (1997)) и/или противораковую нутрицевтическую терапию (например, см. Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004); и Rafi, Nutrition 20(1), 78-82 (2004). Кроме того, конъюгаты препарат-антитело против TF могут применяться для получения фармацевтических композиций для лечения заболеваний, как описано выше, которые должны применяться с противораковой фотодинамической терапией (например, противораковой лазерной терапией - которая необязательно может осуществляться с помощью фотосенсибилизирующего средства, противораковой звуковолновой и ударноволновой терапией и/или противораковой нутрицевтической терапией).

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих TF у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF, как-то конъюгата препарат-антитело против TF на-



стоящего изобретения, и проведение радиотерапии нуждающемуся в этом субъекту.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний с участием клеток, экспрессирующих TF у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против настоящего изобретения и проведение радиотерапии нуждающемуся в этом субъекту.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрено применение конъюгатов препарат-антитело против TF настоящего изобретения для получения фармацевтической композиции для лечения рака, которая должна применяться в комбинации с радиотерапией.

Радиотерапия может включать облучение или введение пациенту радиоактивных фармпрепаратов. Источник излучения может быть либо внешним или внутренним для подлежащего лечению пациента (облучение, к примеру, может быть в виде наружной лучевой терапии (EBRT) или брахитерапии (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать при выполнении таких способов, включают, например, радий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-123, йод-131 и индий-111.

В следующем воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ лечения или предотвращения рака, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата препарат-антитело против TF настоящего изобретения в сочетании с хирургией.

Как описано выше, фармацевтическая композиция настоящего изобретения может вводиться при комбинированной терапии, т.е. в сочетании с одним или несколькими средствами, адекватными для подлежащего лечению заболевания, либо в виде отдельных фармацевтических композиций, либо вместе с соединением настоящего изобретения, составленным вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, как описано выше. Такая комбинированная терапия может потребовать меньшие дозы соединения настоящего изобретения и/или вводимых вместе с ним средств, что позволяет избежать токсичности или осложнений, связанных с различными монотерапиями.

В дополнение к вышесказанному другие адекватные комбинированные терапии включают следующее:

для лечения рака поджелудочной железы: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с антиметаболитом типа 5-фторурацила и/или гемцитабина, возможно в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из 90Y-hPAM4, ARC-100, ARQ-197, AZD-6244, метилбардоксолон, циксутумумаба (IMC-A12), фолитиксорина кальция, GVAX, ипилимумаба, KRX-0601, мербарона, MGCD-0103, MORAb-009, PX-12, Rh-Apo2L, TLN-4601, трабедерсена, волоциксимаба (M200), WX-671, пеметрекседа, рубитекана, иксабепилона, OCX-0191 Vion, 216586-46-8, лапатиниба, матузумаба, иматиниба, сорафиниба, трастузумаба, эксаберилона, эрлотиниба, авастина и цетуксимаба;

для лечения колоректального рака: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из гемцитабина, бевацизумаба, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, оксалиплатина, иринотекана, 5-FU/LV, капецитабина, UFT, средств, направленных на EGFR, как-то цетуксимаба, панитумумаба, нимотузумаба, залутумумаба; ингибиторов VEGF или ингибиторов тирозинкиназ типа сунитиниба;

для лечения рака молочной железы: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антиметаболитов, антрациклинов, таксанов, алкилирующих агентов, антигормональных эптоилонов (фемар, тамоксифен и др.), ингибиторов ErbB2 (Her2/neu) (типа герцептина и аналогичных средств), CAF/FAC (циклофосфамид, доксорубин, 5FU), AC (цикло, доксо), CMF (цикло, метотрексат, 5FU), доцетаксель + капецитабин, GT (паклитаксель, гемцитабин), FEC (цикло, эпи, 5FU) в комбинации с герцептином: паклитаксель ± карбоплатин, винорелбин, доцетаксель, CT в комбинации с лапатинибом; капецитабин;

для лечения рака мочевого пузыря: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антиметаболитов (гемцитабин, алимта, метотрексат), аналогов платины (цисплатин, карбоплатин), ингибиторов EGFR (типа цетуксимаб или залутумумаб), ингибиторов VEGF (типа авастина), доксорубина, ингибиторов тирозинкиназ типа гефитиниба, трастузумаба, антимитотических средств типа таксанов, к примеру, паклитакселя, и алкалоидов барвинка, к примеру, винбластин;

для лечения рака предстательной железы: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гормональной/антигормональной терапии, как-то антиандрогенами, агонистами релизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LHRH) и такими химиотерапевтическими препаратами, как таксаны, митоксантрон, эстрамустин, 5-FU, винбластин, иксабепилон;

для лечения рака яичников: конъюгат препарат-антитело против TF по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антимитотических средств типа таксанов и алкалоидов барвинка, каеликс, топотекан.

#### **Диагностическое применение**

Антитела против TF по изобретению могут применяться и для диагностических целей. Описанные

здесь антитела против ТФ в одном воплощении могут быть конъюгированы с детектирующим агентом или меткой вместо лекарственного препарата, что делает их пригодными для диагностики. В одном воплощении диагностическое применение антител против ТФ или конъюгата антител против ТФ с детектирующим агентом может применяться в комбинации с одним или несколькими способами настоящего изобретения, в частности, с фармацевтическим применением конъюгатов препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения. Антитела против ТФ, конъюгированные с детектирующим агентом, позволяют в некоторых случаях непосредственно детектировать связывание антител против ТФ с ТФ, а примеры "детектирующих агентов" или "меток" приведены в дальнейшем, причем упоминание "антител против ТФ" в дальнейшем также может включать, где это уместно, "антитела против ТФ, конъюгированные с детектирующим агентом или меткой". Термин "диагностическое применение" также включает измерение уровня ТФ, например, в плазме, моче, или уровня экспрессии ТФ в биоптатах в связи с отбором пациентов для лечения или с определением эффективности лечения, как описано выше, а также применение, например, радиоактивно меченых антител против ТФ, например, для отбора пациентов для лечения, как описано выше. Таким образом, в следующем аспекте изобретение касается диагностической композиции, содержащей антитела против ТФ, как определено здесь, причем диагностическая композиция в предпочтительном воплощении может применяться в комбинации с конъюгатом препарат-антитело против ТФ настоящего изобретения.

В одном воплощении антитела против ТФ настоящего изобретения могут применяться *in vivo* или *in vitro* для диагностики заболеваний, в патогенезе которых активную роль играют клетки, экспрессирующие ТФ, путем измерения уровня ТФ или уровня содержащих ТФ клеток на поверхности мембран. Это может осуществляться, к примеру, приведением в контакт тестируемого образца, необязательно вместе с контрольным образцом, с антителом против ТФ при условиях, способствующих образованию комплекса между антителом против ТФ и ТФ. Затем детектируется образование комплекса (например, методом ELISA). При использовании контрольного образца вместе с тестируемым образцом комплекс детектируется в обоих образцах, и любые статистически значимые отличия в образовании комплексов между образцами свидетельствуют о наличии ТФ в тестируемом образце.

Итак, в следующем аспекте антитела против ТФ настоящего изобретения также могут применяться в способе выявления наличия антигена ТФ или экспрессирующих ТФ клеток в образце, который включает:

контактирование образца с антителом против ТФ по изобретению или биспецифической молекулой по изобретению в условиях, способствующих образованию комплекса между антителом и ТФ; и анализ образовавшегося комплекса.

В одном воплощении способ выполняется *in vitro*.

В частности, антитела против ТФ настоящего изобретения также могут применяться в способах идентификации и диагностики инвазивных клеток и тканей и других клеток, являющихся мишенью для антител против ТФ настоящего изобретения, и мониторинга хода терапевтического лечения, состояния после лечения, риска развития рака, прогрессирования рака и др.

В одном из примеров такого диагностического определения антитела против ТФ настоящего изобретения могут применяться в способе диагностики уровня инвазивных клеток в ткани. Такой способ включает образование иммунокомплекса между антителами против ТФ и потенциальными ТФ-содержащими тканями и детектирование образования иммунокомплекса, причем образование иммунокомплекса коррелирует с наличием инвазивных клеток в ткани. Контакт может осуществляться *in vivo*, с использованием меченых выделенных антител и стандартных методов визуализации, или же *in vitro* на образцах ткани.

Антитела против ТФ настоящего изобретения также могут применяться для выявления ТФ-содержащих пептидов и фрагментов пептидов в любых подходящих биологических образцах любым подходящим способом. Примеры стандартных иммунологических методов, предусмотренных настоящим изобретением, включают, без ограничения, методы ELISA, RIA, FACS, методы плазмонного резонанса, хроматографические методы, иммуногистохимию тканей, методы Western-блот и/или иммунопреципитации с использованием антител против ТФ. Антитела против ТФ настоящего изобретения также могут применяться для выявления ТФ и фрагментов ТФ у человека. Подходящие метки для антител против ТФ и/или вторичных антител, используемых в таких методах, включают, без ограничения, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, дихлор-триазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примеры подходящих люминесцентных веществ включают люминол; и примеры подходящих радиоактивных веществ включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^3\text{H}$ .

Антитела против ТФ также могут применяться для проведения анализов в биологических образцах методом конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов пептида ТФ, помеченных детектируемым веществом, и немеченых антител против ТФ. При таком анализе биологический образец, мече-

ный стандартный пептид TF и антитела против TF смешивают и определяют количество меченого стандарта TF, связанного с немеченым антителом против TF. Количество пептида TF в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта TF, связанного с антителом против TF.

Антитела против TF особенно полезны при визуализации опухолей *in vivo*. Визуализации опухолей *in vivo*, ассоциированных с TF, может осуществляться любым подходящим методом. Например, можно использовать мечение  $^{99}\text{Tc}$  или мечение другим изотопом, дающим гамма-излучение, чтобы пометить антитела против TF в опухолях или вторично пометить (например, меткой FITC) комплексы антител против TF:TF из опухолей и визуализировать при помощи гамма-сцинтилляционной камеры (например, установки Elscint Apex 409ECT), как правило, с использованием низкоэнергетического коллиматора с высоким разрешением или низкоэнергетического универсального коллиматора. Затем можно определить радиоактивность в окрашенных тканях в качестве показателя содержания TF-ассоциированных пептидов в опухоли. Изображения, полученные с применением таких методов, можно использовать для оценки биораспределения TF у пациента, млекопитающего или ткани, к примеру, при использовании TF или фрагментов TF в качестве биомаркера на наличие инвазивных раковых клеток. Варианты такого метода могут включать применение магнитно-резонансной томографии (MRI) для улучшения изображений по сравнению с методами гамма-камеры. Подобные методы и принципы иммуносцинтиграфии описаны, например, в Srivastava (ed.) *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press, 1988); Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990); и Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al. (eds.) (Chapman & Hall, 1993). Такие снимки можно использовать и для адресной доставки других противораковых средств, примеры которых описаны здесь (например, апоптозных агентов, токсинов или композиций для химиотерапии СНОР). Кроме того, такие снимки могут также или альтернативно служить основанием для хирургических методов удаления опухолей. Кроме того, такие методы визуализации *in vivo* могут способствовать идентификации и локализации опухолей в ситуации, когда у пациента установлена опухоль (по присутствию других биомаркеров, метастазов и т.д.), но её невозможно идентифицировать обычными аналитическими методами. Все эти способы являются предметом настоящего изобретения, и такие способы, в частности, могут применяться в сочетании с лечением пациента с помощью конъюгатов препарат-антитело против TF настоящего изобретения.

Визуализация *in vivo* и другие способы диагностики, предусмотренные настоящим изобретением, особенно полезны при выявлении микрометастазов у больных людей (например, тех, у кого ранее не был диагностирован рак или в период выздоровления/ ремиссии от рака). Было показано, что раковые клетки карциномы, которые могут составлять до 90% всех раковых клеток, к примеру, очень хорошо окрашиваются с помощью композиций антител против TF. Обнаружение с помощью описанных здесь моноклональных антител против TF может свидетельствовать о наличии агрессивной/ инвазивной карциномы или же указывать на целесообразность использования против таких микрометастазов родственных моноклональных антител против TF.

В одном воплощении антитела против TF настоящего изобретения могут применяться в способе визуализации *in vivo*, в котором антитело против TF настоящего изобретения конъюгируют со способствующим детектированию рентгеноконтрастным веществом, конъюгированное антитело вводят в организм путем инъекции в кровоток и определяют присутствие и локализацию меченого антитела в организме. По этой методике и другим способам диагностики, предусмотренным здесь, антитела против TF настоящего изобретения могут применяться в способе скрининга на наличие связанных с болезнью клеток у больного человека или в биологическом образце, взятом у больного.

Для диагностической визуализации радиоизотопы могут быть связаны с антителом против TF как непосредственно, так и косвенно через промежуточную функциональную группу. Полезными промежуточными функциональными группами являются хелаторы, как-то этилендиаминтетрауксусная кислота и диэтилентриаминпентауксусная кислота (например, см. US 5,057,313).

Наряду с радиоизотопами и рентгеноконтрастными веществами, способы диагностики могут выполняться с помощью антител против TF, конъюгированных с красителями (например, с комплексом биотин-стрепавидин), контрастными веществами, флуоресцентными соединениями или молекулами и усиливающими агентами (например, парамагнитными ионами) для магнитно-резонансной томографии (MRI) (например, см. US Pat. No. 6,331,175, в котором описаны методы MRI и получение антител, конъюгированных с усиливающим агентом для MRI). Такие диагностические/детектирующие вещества могут быть выбраны из веществ, используемых для магнитно-резонансной томографии, и флуоресцентных соединений. Для того чтобы нагрузить антитела против TF радиоактивными металлами или парамагнитными ионами, может потребоваться подвергнуть их реакции с реагентом, имеющим длинный "хвост", к которому прикрепляется множество хелатирующих групп для связывания ионов. Таким хвостом может быть полимер, например, полилизин, полисахарид или другая функционализирующая цепь с подвешенными группами, с которыми могут связываться хелатирующие группы, например, порфирины, полиамины, краун-эфир, бистриосемикарбазоны, полиоксимы и аналогичные группы, применимые для этой це-

ли. Хелаты могут быть конъюгированы с антителами против TF стандартными химическими методами.

Итак, настоящим изобретением предусмотрены диагностические конъюгаты антител против TF, в которых антитело против TF конъюгировано с контрастным веществом (как-то для магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии или с усилителем контрастности ультразвука) или радионуклидом, который может быть представлен, к примеру, гамма-, бета-, альфа-излучающим или излучающим электроны Оже или позитроны изотопом.

В следующем аспекте изобретение касается набора для выявления присутствия антигена TF или экспрессирующих TF клеток в образце, который содержит:

антитело против TF по изобретению или биспецифическую молекулу изобретения; и

инструкции по применению набора, причем набор предпочтительно также содержит антитело против TF, конъюгированное с детектирующим веществом или контрастным веществом по настоящему изобретению.

В одном воплощении антитела против TF настоящего изобретения также могут применяться в наборе для диагностики рака, включающем контейнер, содержащий антитело против TF и один или несколько реагентов для детектирования связывания антител против TF с пептидом TF. Такой набор, в частности, может дополнительно включать конъюгат препарат-антитело против TF настоящего изобретения. Реагенты могут включать, к примеру, флуоресцентные метки, ферментные метки или другие детектируемые метки. Реагенты могут включать и вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем ферментативные реакции дают продукт, который можно визуализировать. В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен диагностический набор, содержащий одно или несколько антител против TF настоящего изобретения в меченом или немеченом виде в подходящем контейнере, реагенты для инкубации при непрямом определении и субстраты или функционализирующие реагенты для детектирования при таком определении, в зависимости от природы метки. Также могут входить контрольные реагенты и инструкции по применению.

Диагностические наборы также могут поставляться для применения с антителом против TF, как-то конъюгированным/меченым антителом против TF, для выявления клеточной активности или детектирования наличия пептидов TF в образце ткани или организме. В таких диагностических наборах, а также наборах для терапевтического применения, тоже описанных здесь, антитела против TF обычно предоставляются в лиофилизированном виде в контейнере, либо сами по себе, либо в сочетании с другими антителами, специфичными для клеток мишени или пептида. Как правило, сюда же входит и фармацевтически приемлемый носитель (например, инертный разбавитель) и/или его компоненты, такие как трис-буфер, фосфатный или карбонатный буфер, стабилизаторы, консерванты, биоциды, инертные белки, напр. сывороточный альбумин и др. (обычно в отдельном контейнере для смешивания) и дополнительные реагенты (также обычно в отдельном контейнере). В некоторые наборы также входит вторичное антитело, способное связываться с антителом против TF, которое, как правило, находится в отдельном контейнере. Второе антитело обычно конъюгировано с меткой и составлено таким же образом, как и антитело против TF настоящего изобретения. При помощи способов, описанных выше и далее здесь, антитела против TF могут применяться для определения подмножеств раковых/опухолевых клеток и характеристики таких клеток и родственных им тканей/новообразований.

Детектирование *in situ* может осуществляться путем взятия гистологических образцов у пациентов и применения комбинации меченых антител против TF (антител против TF, конъюгированных с детектирующим агентом) настоящего изобретения к таким образцам. Антитела против TF настоящего изобретения могут применяться путем нанесения или наложения меченых антител против TF настоящего изобретения на биологический образец. По такой методике можно определить не только наличие TF или фрагментов TF, но также и распределение таких пептидов в исследуемой ткани (например, при оценке распространения раковых клеток). При применении настоящего изобретения рядовые специалисты в данной области должны хорошо понимать, что для осуществления такого детектирования *in situ* можно модифицировать любые из широкого спектра гистологических методов (как-то методики окрашивания).

Далее настоящее изобретение раскрывается на следующих примерах, которые не следует воспринимать как дополнительные ограничения.

### Примеры

Пример 1. Экспрессирующие конструкции для тканевого фактора (TF).

Создавали полностью оптимизированные по кодонам конструкции для экспрессии TF или его внеклеточных доменов в клетках НЕК, NS0 или CHO. Белки, кодируемые этими конструкциями, идентичны TF с кодом доступа NP\_001984 в Genbank. Конструкции содержали подходящие рестрикционные сайты для клонирования и оптимальную последовательность Козака (Kozak, 1987). Конструкции клонировали в экспрессирующем векторе рЕЕ13.4 для млекопитающих (Lonza Biologics) (Bebbington, Renner et al, 1992), получая рЕЕ13.4TF. Для амплификации из синтетической конструкции части, кодирующей внеклеточный домен (ECD) (аминокислоты 1-251) TF, использовали метод ПЦР, добавляя С-концевой His-тег, содержащий 6 остатков His (TFECDHis). Конструкцию клонировали в рЕЕ13.4 и полностью секвенировали для подтверждения правильности конструкции.

Пример 2. Кратковременная экспрессия в клетках НЕК-293F.

Клетки Freestyle 293-F (субклон НЕК-293, адаптированный для культивирования в суспензии в химически определенной среде Freestyle (НЕК-293F)) получали от Invitrogen и трансфецировали подходящей плазмидной ДНК с помощью 293 фектина (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. При экспрессии антител экспрессировали совместно подходящие вектора тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в примере 10.

Пример 3. Полуустойчивая экспрессия в клетках NS0.

pEE13.4TF стабильно трансфецировали в клетки NS0 и отбирали стабильные клоны на рост в отсутствие глутамина и в присутствии 7,5 мкМ метилсульфоксимида (MSX). Пул клонов выращивали в суспензионной культуре, поддерживая давление отбора. Пулы тестировали на экспрессию TF методом FACS и выделяли их для дальнейшего использования.

Пример 4. Стабильная экспрессия в клетках CHO.

pEE13.4TF стабильно трансфецированы в клетки CHO-K1SV (Lonza Biologies) и отбирали стабильные клоны на рост в отсутствие глутамина и в присутствии 50 мкМ MSX. Отбирали единичные клоны, подвергали их экспансии и тестировали на экспрессию TF методом FACS, как описано ниже. Отбирали клоны с высоким уровнем экспрессии отбирали и выделяли их для дальнейшего использования.

Пример 5. Очистка TF с His-тегом.

TFECDHis экспрессировали в клетках НЕК-293F. His-тег в TFECDHis способствует очистке методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. При этом хелатор фиксирован на хроматографической смоле и заряжен катионами  $Co^{2+}$ . Содержащий TFECDHis супернатант инкубировали со смолой в режиме batch (т.е. в растворе). Белок с His-тегом прочно связывается с шариками смолы, тогда как другие белки, находящиеся в супернатанте культуры, связываются не прочно. После инкубации шарики извлекают из супернатанта и набивают в колонку. Колонку промывают для удаления слабо связанных белков. Прочно связанные белки TFECDHis затем элюируют буфером, содержащим имидазол, который конкурирует со связыванием His с  $Co^{2+}$ . Элюент удаляют из белка заменой буфера на обессоливающий колонку.

Пример 6. Процедура иммунизации трансгенных мышей.

Антитела 042, 092-A09, 098 и 101 получали при следующих иммунизациях: трех мышей HCo120 (2 самца и 1 самка, линия GG2713), трех мышей HCo17 (2 самца и 1 самка, линия GG2714), трех мышей HCo12-BALB/c (3 самца, линия GG2811), трех мышей HCo17 (3 самца, линия GG2201) и трех мышей HCo12 (3 самца, линия GG2198) (Medarex, San Jose, CA, США); см. ссылки в приведенном выше абзаце о мышцах HuMab) иммунизировали через каждые две недели поочередно  $5 \times 10^6$  полуустойчиво трансфецированных клеток NS0-TF или 20 мкг белка TFECDHis. В общей сложности проводили 8 иммунизации, 4 внутрибрюшинно (IP) и 4 подкожно (SC) в основание хвоста. Первую иммунизацию клетками проводили в полном адьюванте Фрейнда (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, США). При всех других иммунизациях клетки вводили IP в PBS, а TFECDHis вводили SC, используя неполный адьювант Фрейнда (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, США). Когда титры в сыворотке стали достаточными (положительным считали разведение сыворотки 1:50 или ниже при антиген-специфическом скрининге методом, описанным в примере 7, по меньшей мере 2 раза подряд за две недели), мышам дополнительно дважды вводили внутривенно (IV) 10 мкг белка TFECDHis в 100 мкл PBS за 4 и 3 дня до слияния.

Антитела 109, 111 и 114 получали при следующих иммунизациях: трех мышей HCo120 (3 самки), трех мышей HCo17 (3 самки), трех мышей HCo12-BALB/c (3 самки), трех мышей HCo17 (3 самца) и трех мышей HCo12 (3 самки) иммунизировали через каждые две недели  $5 \times 10^6$  полуустойчиво трансфецированных клеток NS0-TF. Первую иммунизацию клетками проводили в CFA, при всех остальных (7) иммунизациях клетки вводили IP в PBS. Когда титры в сыворотке стали достаточными (как определено выше), мышам дополнительно дважды вводили IV  $1 \times 10^6$  полуустойчиво трансфецированных клеток NS0-TF в 100 мкл PBS за 4 и 3 дня до слияния.

Антитела 011, 017-D12 и 025 получали при следующих иммунизациях: трех мышей HCo120 (3 самца), трех мышей HCo17 (2 самца и 1 самка), трех мышей HCo12-BALB/c (3 самки), трех мышей HCo17 (3 самца) и трех HCo12 мышей (2 самца и 1 самка) иммунизировали через каждые две недели 20 мкг белка TFECDHis. Первую иммунизацию (внутрибрюшинно) белком проводили в CFA, при всех остальных (7) иммунизациях белок вводили поочередно подкожно и внутрибрюшинно в IFA. Когда титры сыворотки стали достаточными (как определено выше), мышам дополнительно дважды вводили внутривенно (IV) 10 мкг белка TFECDHis в 100 мкл PBS за 4 и 3 дня до слияния.

Пример 7. Гомогенный антиген-специфический метод скрининга.

Присутствие антител против TF в сыворотке иммунизированных мышей или HuMab (моноклональных антител человека) в супернатантах культур гибридомы или трансфектомы определяли гомогенным антиген-специфическим методом скрининга (четыре квадранта) по технологии флуориметрического анализа в микрообъеме (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, США).

Для этого применяли комбинацию из 3 клеточных методов и одного на основе шариков. В клеточных методах определяли связывание с клетками TH1015-TF (клетки НЕК-293F, временно экспрессирующие TF; получали как описано выше) и A431 (которые экспрессируют TF на клеточной поверхности).

сти), а также клетками НЕК293 дикого типа (не экспрессируют TF, отрицательный контроль). В методе на основе шариков определяли связывание с биотинилированным TF, посаженным на шарики со стрептавидином (SB1015-TF).

Образцы добавляли к клеткам/шарикам, чтобы происходило связывание с TF. После этого детектировали связывание HuMab с помощью флуоресцентного конъюгата (козий IgG-Cy5 против человека; Jackson ImmunoResearch). В качестве положительного контроля использовали мышинное антитело против TF человека (ERL; соединенное с Alexa-647 на Genmab), а в качестве отрицательного контроля - объединенную сыворотку мышей HuMab и мышинное антитело с chrompure-Alexa647. Образцы сканировали на установке Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (8200 CDS) и считывали показания в виде 'отсчет×флуоресценция'.

Пример 8. Получение гибридом для HuMab.

Мышей HuMab при появлении достаточного антиген-специфического титра (определяли как и выше) подвергали эвтаназии и извлекали селезенку и лимфатические узлы, окружающие брюшную аорту и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфатических узлов с клетками миеломы мыши проводили методом электрослияния на установке CEEF 50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, США), в основном следуя инструкциям производителя. Отбор и культивирование полученных гибридом HuMab проводили по стандартным методикам (например, как описано в Coligan J.E., Bierer B.E., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Пример 9. Масс-спектрометрия очищенных антител.

Небольшие порции содержащих антитела супернатантов по 0,8 мл из 6-луночной стадии или Hyperflask очищали на колонках PhyTip, содержащих смолу с белком G (PhyNexus Inc., San Jose, США), на установке Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, США). Колонки PhyTip использовали согласно инструкциям производителя, но буфера заменяли на: связывающий буфер PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Нидерланды) и элюирующий буфер 0,1М глицин-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Германия). После очистки образцы нейтрализовали 2М трис-HCl pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Нидерланды). А в некоторых случаях подвергали очистке большие объемы супернатантов культур методом аффинной колоночной хроматографии с белком А.

После очистки образцы наносили на 384-луночный планшет (Waters, квадратные лунки на 100 мкл, № 186002631). Образцы подвергали дегликозилированию в течение ночи при 37°C с помощью N-гликозидазы F (Roche, кат. № 11365177001). Добавляли (1 мкл на лунку) DTT (15 мг/мл) и инкубировали 1 ч при 37°C. Образцы (5 или 6 мкл) обессоливали на Acquity UPLC™ (Waters, Milford, США) с колонкой VEN300 C18, 1,7мкм, 2,1×50 мм при 60°C. В качестве элюентов А и В использовали воду MQ и ацетонитрил класса LC-MS (Biosolve, кат. № 01204101, Valkenswaard, Нидерланды), соответственно, в обоих случаях с 0,1% муравьиной кислотой (Fluka, кат. № 56302, Buchs, Германия). Времяпролетные масс-спектры при ионизации электрораспылением регистрировали online на масс-спектрометре micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Германия), работающем в режиме положительных ионов. Перед анализом проводили калибровку в интервале 900-3000 m/z с помощью настроечной смеси ES (Agilent Technologies, Santa Clara, США). Масс-спектры подвергали деконволюции с помощью программы DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker), используя алгоритм поиска Maximal Entropy для молекулярных весов в районе от 5 до 80 кДа.

После деконволюции полученные массы тяжелой и легкой цепи для всех образцов сопоставляли с целью поиска дубликатов антител. При сравнении тяжелых цепей учитывали возможное присутствие вариантов С-концевого лизина. В результате получили список уникальных антител, где уникальность определяется как уникальная комбинация тяжелых и легких цепей. В том случае, когда обнаруживались дубликаты антител, использовали результаты других тестов, чтобы решить, какой материал лучше всего использовать для продолжения экспериментов.

При анализе методом MS молекулярных весов тяжелой и легкой цепей 118 TF-специфичных гибридом получили 70 уникальных антител (уникальных комбинаций тяжелой цепи и легкой цепи). Их характеризовали по целому ряду функциональных анализов, идентифицируя наших ведущих кандидатов - TF-специфичные антитела.

Пример 10. Анализ последовательности варьируемых доменов HuMab против TF и клонирование их в экспрессирующих векторах.

Выделяли тотальную РНК HuMabs против TF из  $5 \times 10^6$  гибридомных клеток и получали 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) из 100 нг тотальной РНК с помощью набора SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech) согласно инструкциям производителя. Амплифицировали кодирующие участки  $V_H$  (варируемой области тяжелой цепи) и  $V_L$  (варируемой области легкой цепи) методом ПЦР и клонировали в вектор pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) с помощью набора для клонирования Zero Blunt PCR (Invitrogen). Для каждого HuMab секвенировали 16 клонов  $V_L$  и 8 клонов  $V_H$ . Последовательности представлены в Перечне последовательностей и на фиг. 1.

В табл. 1А и табл. 1В (ниже) приведены сведения о последовательностях антител и наиболее гомологичных гаметных последовательностях.

Таблица 1 А. Гомология тяжелых цепей

Ab	Ген V и его аллель	Идентичность по V-области, %	Ген J и его аллель	Ген D и его аллель	Длина CDR-IMGT
098	IGHV1-69*04	95,49% (275/288 нт)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96,53% (278/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98,26% (283/288 нт)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97,92% (282/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95,83% (276/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97,57% (281/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96,18% (277/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
114	IGHV3-33*01, IGHV3-33*03	94,44% (272/288 нт)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
111	IGHV3-30-3*01	97,57% (281/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
042	IGHV3-23*01	98,26% (283/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD1-1*01	[8,8,11]

Таблица 1В. Гомология легких цепей

Ab	Ген V и его аллель	Идентичность по V-области, % (нт)	Ген J и его аллель	Длина CDR-IMGT
011	IGKV1D-16*01	98,57% (275/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99,28% (277/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99,64% (278/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99,29% (280/282 нт)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99,65% (281/282 нт)	IGKJ4*01	[7.3.8]
111	IGKV3-11*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
042	IGKV3-20*01	99,29% (280/282 нт)	IGKJ1*01	[7.3.9]

Ссылки на перечень последовательностей (последовательности на фиг. 1) На фиг. 1 клон 017-D12 именуется "017", а клон 092-A09 именуется "092".

Область V <sub>H</sub>		Область V <sub>H</sub>	
SEQ ID No: 1	VH 114	SEQ ID No: 21	VH 101
SEQ ID No: 2	VH 114, CDR1	SEQ ID No: 22	VH 101, CDR1
SEQ ID No: 3	VH 114, CDR2	SEQ ID No: 23	VH 101, CDR2
SEQ ID No: 4	VH 114, CDR3	SEQ ID No: 24	VH 101, CDR3
SEQ ID No: 5	VH 011	SEQ ID No: 25	VH 025
SEQ ID No: 6	VH 011, CDR1	SEQ ID No: 26	VH 025, CDR1
SEQ ID No: 7	VH 011, CDR2	SEQ ID No: 27	VH 025, CDR2
SEQ ID No: 8	VH 011, CDR3	SEQ ID No: 28	VH 025, CDR3
SEQ ID No: 9	VH 017-D12	SEQ ID No: 29	VH 109
SEQ ID No: 10	VH 017-D12, CDR1	SEQ ID No: 30	VH 109, CDR1
SEQ ID No: 11	VH 017-D12, CDR2	SEQ ID No: 31	VH 109, CDR2
SEQ ID No: 12	VH 017-D12, CDR3	SEQ ID No: 32	VH 109, CDR3
SEQ ID No: 13	VH 042	SEQ ID No: 33	VH 098
SEQ ID No: 14	VH 042, CDR1	SEQ ID No: 34	VH 098, CDR1
SEQ ID No: 15	VH 042, CDR2	SEQ ID No: 35	VH 098, CDR2
SEQ ID No: 16	VH 042, CDR3	SEQ ID No: 36	VH 098, CDR3
SEQ ID No: 17	VH 092-A09	SEQ ID No: 37	VH 111
SEQ ID No: 18	VH 092-A09, CDR1	SEQ ID No: 38	VH 111, CDR1
SEQ ID No: 19	VH 092-A09, CDR2	SEQ ID No: 39	VH 111, CDR2
SEQ ID No: 20	VH 092-A09, CDR3	SEQ ID No: 40	VH 111, CDR3
Область V <sub>L</sub>		Область V <sub>L</sub>	
SEQ ID No: 41	VL 114	SEQ ID No: 61	VL 101
SEQ ID No: 42	VL 114, CDR1	SEQ ID No: 62	VL 101, CDR1
SEQ ID No: 43	VL 114, CDR2	SEQ ID No: 63	VL 101, CDR2
SEQ ID No: 44	VL 114, CDR3	SEQ ID No: 64	VL 101, CDR3
SEQ ID No: 45	VL 011	SEQ ID No: 65	VL 025
SEQ ID No: 46	VL 011, CDR1	SEQ ID No: 66	VL 025, CDR1
SEQ ID No: 47	VL 011, CDR2	SEQ ID No: 67	VL 025, CDR2
SEQ ID No: 48	VL 011, CDR3	SEQ ID No: 68	VL 025, CDR3
SEQ ID No: 49	VL 017-D12	SEQ ID No: 69	VL 109
SEQ ID No: 50	VL 017-D12, CDR1	SEQ ID No: 70	VL 109, CDR1
SEQ ID No: 51	VL 017-D12, CDR2	SEQ ID No: 71	VL 109, CDR2
SEQ ID No: 52	VL 017-D12, CDR3	SEQ ID No: 72	VL 109, CDR3
SEQ ID No: 53	VL 042	SEQ ID No: 73	VL 098
SEQ ID No: 54	VL 042, CDR1	SEQ ID No: 74	VL 098, CDR1
SEQ ID No: 55	VL 042, CDR2	SEQ ID No: 75	VL 098, CDR2
SEQ ID No: 56	VL 042, CDR3	SEQ ID No: 76	VL 098, CDR3
SEQ ID No: 57	VL 092-A09	SEQ ID No: 77	VL 111
SEQ ID No: 58	VL 092-A09, CDR1	SEQ ID No: 78	VL 111, CDR1
SEQ ID No: 59	VL 092-A09, CDR2	SEQ ID No: 79	VL 111, CDR2
SEQ ID No: 60	VL 092-A09, CDR3	SEQ ID No: 80	VL 111, CDR3

HuMab 092-A09 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 17 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 57.

HuMab 101 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 21 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 61.

HuMab 025 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 25 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 65.

HuMab 109 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 29 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 69.

HuMab 017-D12 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 9 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 49.

HuMab 114 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 1 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 41.

HuMab 042 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 13 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 53.

HuMab 011 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 5 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 45.

HuMab 098 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 33 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 73.

HuMab 111 против TF представляет собой полноразмерное, полностью человеческое моноклональное антитело типа IgG1,κ, содержащее последовательность V<sub>H</sub> по SEQ ID No: 37 и последовательность V<sub>L</sub> по SEQ ID No: 77.

Пример 11. Очистка антител.

Супернатанты из культур фильтровали через накладные фильтры на 0,2 мкм и наносили на колонки с 5 мл белка А (rProtein A FF, Amersham Bioscience) и элюировали 0,1 М лимонной кислотой-NaOH, pH 3. Элюат немедленно нейтрализовали 2М трис-HCl, pH 9 и диализировали в течение ночи до 12,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). После диализа образцы стерилизовали фильтрованием через накладные фильтры на 0,2 мкм. Чистоту определяли методом SDS-PAGE, а концентрацию измеряли по нефелометрии и поглощению при 280 нм. Очищенные антитела разделяли на порции и хранили при -80°C. После оттаивания порции очищенных антител хранили при 4°C. Молекулярную массу тяжелых и легких цепей антител, экспрессируемых гибридами, определяли методом масс-спектрометрии, как описано в примере 9.

Пример 12. Связывание HuMabs против TF с внеклеточным доменом TF методом ELISA.

Специфичность полученных HuMabs против TF определяли методом ELISA. Планшеты для ELISA (Microlon; Greiner Bio-One) в течение ночи при +4°C покрывали 0,5 мкг/мл TFECdHis в PBS, pH 7,4. Покрытые планшеты сливали и блокировали 1 час при комнатной температуре 2% об. куриной сывороткой (Gibco, Paisley, Scotland) в PBS и промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (PBST). После этого делали серийные разведения HuMabs в PBSTC (PBS с добавлением 2% об. куриной сыворотки и 0,05% об. Tween-20) и инкубировали их 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием (300 об/мин). Связавшиеся HuMabs детектировали с помощью конъюгированных с HRP козьих антител против IgG человека (Jackson ImmunoResearch), разведенных 1:5,000 в PBSTC, которые инкубировали 1 час при комнатной температуре со встряхиванием (300 об/мин). Далее реакцию проявляли с помощью ABTS (Roche Diagnostics) при комнатной температуре в темноте, останавливали через 15-30 минут добавлением 2% масс. щавелевой кислоты, а затем измеряли поглощение при 405 нм. В качестве отрицательного контроля использовали HuMab-KLH (моноклональное антитело человека против KLH (гемоцианина моллюска блюдечко). В качестве положительного контроля использовали мышинное антитело против TF человека (ERL) (в виде меченого HRP конъюгата против IgG мыши). Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программы GraphPad Prism V4.03.

Как видно из фиг. 3, все антитела против TF связывались с TFECdHis. Значения EC<sub>50</sub> для HuMabs представляют средние из 3 экспериментов и колеблются от 0,13 до 0,17 нМ (табл. 2 ниже).



Таблица 2

HuMab к TF	EC <sub>50</sub> (нМ)
11	0,16
017-D12	0,25
42	0,23
092-A09	0,18
101	0,28
98	0,13
114	0,17
25	0,34
109	0,27

Пример 13. Связывание HuMabs против TF с мембраносвязанным TF. Связывание HuMabs против TF с мембраносвязанным TF определяли методом FACS, используя трансфицированные TF клетки CHO или экспрессирующие TF клетки раковых линий MDA-MB-231, (трансфицированные люциферазой) A431 и Вх-PC3.

Клетки ресуспендировали в PBS ( $2 \times 10^6$  клеток/мл), помещали в 96-луночные планшеты с V-образным дном (50 мкл/луночку). К клеткам добавляли 50 мкл серийного разведения HuMab в буфере FACS (PBS с добавлением 0,1% BSA и 0,02% Na-азиды) и инкубировали 30 минут на льду. После трехкратной отмывки буфером FACS добавляли 50 мкл конъюгированных с фикоэритрином (PE) козьих антител против IgGfc человека 81 (Jackson ImmunoResearch), разведенных 1:100 в буфере FACS. После 30 мин на льду (в темноте) клетки отмывали три раза и определяли специфическое связывание HuMabs методом проточной цитометрии на установке FACSCalibur (BD Biosciences). В качестве отрицательного контроля использовали HuMab-KLH. В качестве положительного контроля использовали мышинное антитело против TF с последующим конъюгированным с PE антителом против IgGfc мыши. Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программы GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

На фиг. 4 представлен пример кривых связывания TF-специфичных HuMabs с клетками MDA-MB-231. В табл. 3 приведена сводка значений EC<sub>50</sub> для связывания TF-специфичных HuMabs с трансфицированными TF клетками CHO (S1015-TF), клетками MDA-MB-231, A431 и Вх-PC3.

Таблица 3. Сводка значений EC<sub>50</sub> и максимальной средней интенсивности флуоресценции (max MFI) при определении методом FACS для TF-специфичных HuMabs с различными типами клеток. Значения EC<sub>50</sub> приводятся в нМ. Max MFI для клеток MDA-MB-231, ВхPC3 и A431 при 30 мкг/мл антител, для S1015-TF - при 7,5 мкг/мл антител.

Группа	HuMab к TF	MDA-MB-231		Вх-PC3		A431		S1015-TF-012	
		EC <sub>50</sub>	Max MFI	EC <sub>50</sub>	Max MFI	EC <sub>50</sub>	Max MFI	EC <sub>50</sub>	Max MFI
I	13	1,58	2451	1,86	1305	8,04	3622	1,07	5207
I	44	0,87	1881	1,88	1136	1,45	2646	2,13	5021
I	87-Lg6	8,28	1107	7,19	1030				
II	11	0,47	2143	1,01	1280	0,20	2606	1,32	5654
II	017-D12	1,33	2401	1,61	1422	1,24	3296	1,21	5792
II	42	0,25	1518	2,45	1701				
II	092-A09	0,53	2290	0,84	1262	0,83	3137	1,32	5409
II	101	0,85	2071	2,25	1220	3,16	2934	1,77	5859
II/III	98	0,99	1956	1,38	1151	1,40	2755	0,96	5229
II/III	114	0,47	2438	0,80	1407	0,90	3433	1,72	6095
III	3	3,20	1798	4,98	1106	6,94	2530	2,06	4247
III	25	0,69	2254	0,88	1320	5,19	3170	0,73	5808
III	109	2,16	2052	4,04	1324	1,74	3124	0,92	5629
III	111	1,03	1774	1,83	1128	2,88	3043	0,55	5353

Пример 14. Ингибирование связывания FVIIa с TF.

Ингибирование связывания FVIIa с TF антителами HuMabs против TF измеряли на клетках MDA-MB-231 методом FACS. Клетки MDA-MB-231 отмывали PBS, чтобы удалить сыворотку, и высевали на 96-луночные планшеты (100 000 клеток на луночку). Клетки инкубировали с HuMabs против TF в DMEM/0,1% BSA в течение 15 мин с последующей инкубацией с 100 нМ FVIIa в DMEM/0,1% BSA при 4°C в течение 30 мин. Клетки отмывали PBS/0,1% BSA/0,02% азиды натрия (буфер FACS) и инкубировали с 10 мкг/мл кроличьего антитела против FVIIa (Abcam [ab7053]). Клетки отмывали буфером FACS и инкубировали с разведенным 1:50 меченым PE козьим антителом против IgG кролика (Jackson [111-116-144]). Клетки отмывали буфером FACS и измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) на FACSCanto II (Becton Dickinson).

Концентрацию антител, необходимую для 50%-го ингибирования (IC<sub>50</sub>), рассчитывали с помощью GraphPad Prism (нелинейный регрессионный анализ).

Из фиг. 5 и табл. 4 видно, что HuMab-TF-098 (IC<sub>50</sub> = 1,2 мкг/мл), -114 (IC<sub>50</sub> не поддается вычислению) и -011 (IC<sub>50</sub> = 0,6 мкг/мл) эффективно подавляли связывание FVIIa с клетками MDA-MB-231, тогда как HuMab-TF-013, -044 и -111 не ингибировали (или ингибировали в гораздо меньшей степени) связывание FVIIa.

Таблица 4. Сводка значений  $IC_{50}$  для ингибирования антителами HuMabs против TF связывания FVIIa. Представлены значения  $IC_{50}$  (в мкг/мл) для ингибирования HuMabs против TF связывания 100 нМ FVIIa с TF на клетках MDA-MB-231, полученные в одном репрезентативном эксперименте.

Антитело (HuMab-TF-)	$IC_{50}$
098	1,218
111	н/о <sup>а</sup>
013	н/о <sup>а</sup>
044	н/о <sup>а</sup>
114	н/о <sup>а</sup>
011	0,6472

а) не поддается вычислению.

Пример 15. Опосредованная антителами интернализация и гибель клеток, вызванная HuMabs против TF при анализе с помощью анти-каппа-ЕТА'.

Чтобы установить, пригодны ли HuMabs против TF для подхода типа конъюгата антитело-препарат, применяли обобщенный метод измерения гибели клеток *in vitro* с использованием направленного на каппа-цепи экзотоксина А *Pseudomonas* (анти-каппа-ЕТА'). В этом методе использовали высокоаффинный домен против легкой каппа-цепи человека, конъюгированный с укороченной формой экзотоксина А *Pseudomonas*. После интернализации конъюгат доменного антитела против каппа с ЕТА' подвергается протеолизу и восстановлению дисульфидных связей с отделением каталитического и связывающего домена. Каталитический домен переносится из системы Гольджи в эндо-плазматический ретикулум через удерживающий мотив KDEL, а затем перемещается в цитозоль, где он ингибирует синтез белка и индуцирует апоптоз (Kreitman RJ., *BioDrugs* 2009, 23(1): 1-13. Recombinant Immunotoxins Containing Truncated Bacterial Toxins for the Treatment of Hematologic Malignancies).

Опосредованную антителом интернализацию и вызванную токсином гибель клеток тестировали для различных HuMabs против TF. Тестировали три различные линии клеток со сравнимым уровнем экспрессии TF. Эти клетки также экспрессируют EGFR (на различном уровне), что позволяет использовать положительный контроль - антитело (2F8), которое связывается с EGFR и вызывает интернализацию EGFR. Количество молекул TF и EGFR, экспрессируемых на клеточных линиях, определяли с помощью набора Qifi (Dako, Glostrup, Дания); клетки A431: среднее число молекул TF на клетку примерно 500000, среднее число молекул EGFR примерно 500000; клетки VxPC3: среднее число молекул TF на клетку примерно 500000, среднее число молекул EGFR на клетку примерно 200000; клетки MDA-MB-231: среднее число молекул TF на клетку примерно 500000, среднее число молекул EGFR на клетку примерно 100000. Клетки высевали при оптимальной концентрации (A431: 2500 клеток/луночку; VxPC3: 3000 клеток/луночку; MDA-MB-231: 5000 клеток/луночку) в среду для клеточных культур в 96-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner Bio-one) и давали им прикрепиться. Для идентификации HuMabs против TF, способствующих интернализации и гибели клеток токсином, инкубировали анти-каппа-ЕТА' при фиксированной концентрации (0,5 мкг/мл [A431 и VxPC3]; 0,25 мкг/мл [MDA-MB-231]), не вызывающей неспецифической гибели клеток в отсутствие антител, в течение 30 мин с оттитрованным количеством HuMabs против TF перед добавлением к клеткам. Через 3 дня определяли содержание жизнеспособных клеток с помощью AlamarBlue (BioSource International, San Francisco, США) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию регистрировали на считывающем устройстве EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Финляндия) при стандартных настройках для AlamarBlue. В качестве положительного контроля включали антитело 2F8 с анти-каппа-ЕТА'. В качестве отрицательного контроля использовали контрольное антитело на изотип (IgG1-b12).

Из фиг. 6 и табл. 5 видно, что все преинкубированные с анти-каппа-ЕТА' HuMabs против TF, кроме одного (HuMab-TF-087), вызывали гибель клеток A431, VxPC3 и MDA-MB-231 дозозависимым образом. Преинкубированные с анти-каппа-ЕТА' HuMab-TF-098, -114 и -011 вызывали гибель более эффективно ( $EC_{50}$  между  $9 \times 10^{-5}$  и  $4 \times 10^{-4}$  мкг/мл на клетках A431), чем преинкубированные с анти-каппа-ЕТА' HuMab-TF-013, -111 и -044 ( $EC_{50}$  между  $2,0 \times 10^{-2}$  и  $9,8 \times 10^{-2}$  мкг/мл на клетках A431). Преинкубированное с анти-каппа-ЕТА' HuMab-TF-087 не вызывало гибели клеток.

Для каждой линии клеток представлен один репрезентативный эксперимент: A431 (а), VxPC3 (b) и MDA-MB-231 (с). Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI)  $\pm$  S.E.M. для трех лунок с клетками, обработанными HuMabs против TF, преинкубированными с анти-каппа-ЕТА'. Верхняя пунктирная линия представляет максимальный сигнал, полученный в отсутствие преинкубированных с анти-каппа-ЕТА' HuMabs против TF; нижняя пунктирная линия представляет максимальную гибель клеток, полученную со стауроспорином.

Таблица 5. Сводка значений  $EC_{50}$  и степени гибели клеток, вызванной HuMabs против TF, преинкубированными с анти-каппа-ETA'

Антитело (HuMab-TF-)	A431		VxPC3		MDA-MB-231	
	Гибель (%)	$EC_{50}$ (мкг/мл)	Гибель (%)	$EC_{50}$ (мкг/мл)	Гибель (%)	$EC_{50}$ (мкг/мл)
098	95	$9,0 \times 10^{-5}$	99	$1,3 \times 10^{-5}$	96	$7,2 \times 10^{-4}$
111	92	$3,4 \times 10^{-2}$	98	$1,5 \times 10^{-2}$	88	$2,3 \times 10^{-2}$
013	80	$2,0 \times 10^{-2}$	96	$9,4 \times 10^{-3}$	56	н/о <sup>а</sup>
044	66	$9,8 \times 10^{-2}$	96	$1,5 \times 10^{-2}$	44	н/о <sup>а</sup>
087	3	н/о <sup>а</sup>	56	н/о <sup>а</sup>	8	н/о <sup>а</sup>
114	97	$2,6 \times 10^{-4}$	99	$7,3 \times 10^{-4}$	99	$2,5 \times 10^{-3}$
011	96	$3,9 \times 10^{-4}$	98	$2,6 \times 10^{-4}$	88	$3,0 \times 10^{-3}$
2F8	99	$7,1 \times 10^{-6}$	98	$3,5 \times 10^{-5}$	84	$1,5 \times 10^{-3}$
B12	5	н/о <sup>а</sup>	22	н/о <sup>а</sup>	0	н/о <sup>а</sup>

а) не поддается вычислению

Приведены значения  $EC_{50}$  (в мкг/мл) и максимальной гибели указанных линий клеток, обработанных HuMabs против TF, преинкубированными с анти-каппа-ETA', полученные в одном репрезентативном эксперименте. Степень гибели клеток (% погибших клеток) рассчитывали следующим образом:

$$\frac{(MFI_{\text{необработанные}} - MFI_{\text{обработанные конъюгированным HuMab}})}{(MFI_{\text{необработанные}} - MFI_{\text{обработанные}})}$$

стауреспорином)  $\times 100\%$ .

Пример 16. Получение ADCs против TF.

HuMab-011, HuMab-098 и HuMab-111 и отрицательный контроль - IgG1-b12 временно продуцировали в клетках HEK-293F (HuMab-011, HuMab-111 и IgG1-b12) или получали в стабильной линии клеток CHO (HuMab-098). Антитела очищали методом хроматографии с белком А по стандартной методике, получая в конечном счете примерно 400 мг очищенного антитела. Далее антитела конъюгировали с vcMMAE и mcMMAF, соответственно. Примерно 200 мг HuMab-011, HuMab-098 или HuMab-111 конъюгировали с vcMMAE или с mcMMAF. Препарат-линкер vcMMAE или mcMMAF подвергали алкилированию с цистеинами восстановленных антител по методикам, описанным в литературе (Sun et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290; McDonagh et al. (2006) Protein Eng. Design Sel. 19: 299-307; Alley et al. (2008) Bioconjugate Chem. 19: 759-765). Реакцию останавливали добавлением избытка N-ацетилцистеина. Остаток неконъюгированного препарата удаляли при очистке, и конечные конъюгаты препарат-антитело против TF переводили в PBS. После этого конъюгаты препарат-антитело против TF подвергали анализу на концентрацию (по поглощению при 280 нм), соотношение препарат-антитело ('DAR') методом обратнофазовой хроматографии (RP-HPLC) и гидрофобной хроматографии (HIC), содержание неконъюгированного препарата (методом обратнофазовой хроматографии), степень агрегации (методом эксклюзионной хроматографии, SEC-HPLC) и уровень эндотоксина (методом LAL). Результаты представлены ниже в табл. 6.

Таблица 6. Сводка различных характеристик конъюгатов антитело-препарат

Определение	HuMab-TF-011		HuMab-TF-098		HuMab-TF-111		IgG1-b12	
	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF
Концентрация (мг/мл)	10,69	9,86	9,28	10,96	9,83	10,4	5,49	8,74
DAR по RP-HPLC	3,9	3,9	3,9	4,0	4,3	4,1	3,6	3,9
DAR по HIC	3,9	4,1	3,7	3,9	4,1	4,2	3,4	3,9
Неконъюгированный препарат (%)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Агрегаты по SEC-HPLC (%)	5,3	5,3	0,8	0,7	1,2	0,8	0,6	1,0
Эндотоксин	0,2	0,2	0,131	<0,05	0,07	0,07	0,05	<0,05

Пример 17. Связывание ADCs против TF с рекомбинантным внеклеточным доменом TF при определении методом ELISA.

Связывание ADCs против TF с TF измеряли методом ELISA (с фиксацией рекомбинантного внеклеточного домена TF) и сравнивали со связыванием неконъюгированных HuMabs против TF. Планшеты для ELISA (Greiner BioOne) в течение ночи при 4°C покрывали 1,25 мкг/мл (по 100 мкл на лунку) рекомбинантного TFECdHis в PBS (B. Braun Melsungen AG). Планшеты три раза отмывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20 (PBST), блокировали PBST по 200 мкл/лунку при комнатной температуре в течение 1 ч со встряхиванием (300 об/мин), отмывали три раза PBST и сливали. После этого добавляли 100 мкл ADCs против TF или неконъюгированных HuMabs против TF в виде серийных разведений в PBST и инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 90 мин. Планшеты три раза отмывали три PBST и сливали. Связавшиеся ADCs против TF и неконъюгированные HuMabs детектировали добавлением конъюгированного с HRP мышинового антитела против IgG1 человека (100 мкл; 0,015 мкг/мл; San-

quin; # M1328) в буфере определения и инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты отмывали три раза PBST, сливали и инкубировали со 100 мкл раствора ABTS (50 мл буфера ABTS [Roche] и одна таблетка ABTS [50 мг; Roche]). После инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл щавелевой кислоты на лунку (2% об.; Riedel de Haen) в темноте на 10 мин. В планшетах измеряли OD при 405 нм на считывающем устройстве для ELISA (Biotek Instruments, EL808 Absorbance Microplate Reader).

В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG1-b12 к постороннему антигену (как неконъюгированное, так и в формате ADC).

Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

На фиг. 7 представлены кривые связывания, свидетельствующие, что все HuMabs и ADCs против TF связывались в сходном диапазоне с внеклеточным доменом TF при анализе методом ELISA (значения EC<sub>50</sub> от 370 до 470 нг/мл).

В табл. 7 представлены значения EC<sub>50</sub> для связывания HuMabs и ADCs против TF с внеклеточным доменом TF. Значения EC<sub>50</sub> приводятся в нг/мл.

Таблица 7. Сводка значений EC<sub>50</sub> для связывания TF-специфичных HuMabs и ADCs с внеклеточным доменом TF при определении методом ELISA

HuMab-TF-	EC <sub>50</sub> (ELISA)		
	Неконъюгированное	vcMMAE	mcMMAF
011	373	469	431
098	422	426	401
111	377	464	416

Пример 18. Опосредованная антителами интернализация и гибель клеток, вызванная ADCs против TF, при анализе на клетках *in vitro*.

Для определения способности ADCs против TF индуцировать цитотоксичность проводили анализ на клетках *in vitro*.

Гибель клеток из трех клеточных линий тестировали для различных ADCs против TF. Клетки A431 получали из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ: ACC 91), клетки HPAF-II и NCI-H441 получали из American Type Culture Collection (ATCC: CRL-1997 и HTB-174). Клетки высевали при оптимальной концентрации (A431:  $2,5 \times 10^3$  клеток/лунку; HPAF-II HNCI-H441:  $5 \times 10^3$  клеток/лунку) в среде для клеточных культур в 96-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner Bio-one) и давали им прикрепиться. Добавляли серийные разведения ADCs против TF и инкубировали при 37°C в течение 72 ч (A431 и HPAF-II) или 96 ч (NCI-H441). Содержание жизнеспособных клеток определяли с помощью AlamarBlue (BioSource International, San Francisco, США) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию регистрировали на считывающем устройстве EnVision 2101 Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Финляндия) при стандартных настройках для AlamarBlue. В качестве отрицательного контроля использовали ADCs с антителом IgG1-b12, связывающимся с посторонним антигеном. Для индукции максимальной гибели клеток использовали стауроспорин (Sigma, # S6942).

Обе линии клеток - A431 и HPAF-II экспрессируют более 200 000 молекул тканевого фактора на клетку и поэтому могут рассматриваться как экспрессирующие тканевой фактор на высоком уровне.

Клетки NCI-H441 экспрессируют примерно 80 000 молекул тканевого фактора на клетку и поэтому могут рассматриваться как экспрессирующие тканевой фактор на промежуточном уровне.

Из фиг. 8 и табл. 8 видно, что все ADCs против TF вызывали гибель клеток A431, HPAF-II и NCI-H441 дозозависимым образом. HuMab-TF-098 и -011 вызывали гибель клеток слегка более эффективно (IC<sub>50</sub> от 9 до 22 нг/мл на клетках A431, от 1 до 5 нг/мл на клетках HPAF-II и от 1 до 10 нг/мл на клетках NCI-H441), чем HuMab-TF-111 (IC<sub>50</sub> от 46 до 83 нг/мл на клетках A431, от 4 до 15 нг/мл на клетках HPAF-II и 416 нг/мл на клетках NCI-H441). Для каждой линии клеток представлен один репрезентативный эксперимент: A431 (a) и HPAF-II (b). Данные приведены в процентах выживания  $\pm$  S.E.M. в двойных лунках с клетками, обработанными ADCs против TF.

Таблица 8. Сводка значений IC<sub>50</sub> и степени гибели клеток, вызванной ADCs против TF

ADC (HuMab-TF-)	A431		HPAF-II		NCI-H441	
	Гибель (%)	IC <sub>50</sub> (нг/мл)	Гибель (%)	IC <sub>50</sub> (нг/мл)	Гибель (%)	IC <sub>50</sub> (нг/мл)
098-vcMMAE	92	9	71	1	60	10
098-mcMMAF	85	13	73	5	63	4
011-vcMMAE	93	10	71	3	60	10
011-mcMMAF	78	22	72	5	53	5
111-vcMMAE	90	46	73	4	51	416
111-mcMMAF	73	83	74	15	62	416
IgG1-b12-vcMMAE	н/о <sup>a</sup>	0	н/о <sup>a</sup>	н/о <sup>a</sup>	0	н/о <sup>a</sup>
IgG1-b12-mcMMAF	н/о <sup>a</sup>	0	н/о <sup>a</sup>	н/о <sup>a</sup>	0	н/о <sup>a</sup>

a) не поддается вычислению.

Приведены значения  $IC_{50}$  (в нг/мл) и максимальной гибели (при концентрации в 10 мкг/мл) указанных линий клеток, обработанных ADCs против TF, полученные в одном репрезентативном эксперименте. Степень гибели клеток (% погибших клеток) рассчитывали следующим образом:

$$\frac{(MFI_{\text{необработанные}} - MFI_{\text{обработанные ADC против TF}}) / (MFI_{\text{необработанные}} - MFI_{\text{обработанные стауропоорином}}) \times 100\%.$$

Пример 19. Терапевтическое лечение привитых опухолей A431 и HPAF-II у мышей SCID с помощью ADCs против TF.

Эффективность ADCs против TF *in vivo* определяли на привитых подкожно (SC) опухлях-ксенотрансплантатах A431 и HPAF-II у мышей SCID. Самкам мышей SCID в правый бок вводили  $5 \times 10^6$  раковых клеток A431 (полученных из DSMZ) или  $2 \times 10^6$  HPAF-II (полученных из ATCC) в 200 мкл PBS с последующими четырьмя инъекциями ADCs против TF или контролей (IgG1-b12; как в виде ADC, так и неконъюгированного), начиная с того момента, когда размер опухоли составил примерно 200-250 мм<sup>3</sup> для ксенотрансплантатов A431: день 11, день 14, день 18 и день 21, либо примерно 100-150 мм<sup>3</sup> для ксенотрансплантатов HPAF-II: день 13, 16, 20 и 23 (60 мкг/мышь в 100 мкл, внутривенно (IV)). Объем опухоли измеряли по меньшей мере два раза в неделю. Объемы опухоли (мм<sup>3</sup>) рассчитывали по измерениям кронциркулем (PLEXX) как:  $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$ .

Из фиг. 9 видно, что все ADCs против TF эффективно подавляли рост привитых подкожно (s.c.) опухолей A431 (a) и HPAF-II (b). Данные представлены в виде среднего размера опухолей  $\pm$  S.E.M. на группу (n = 7 мышей на группу). На модели HPAF-II конъюгаты vsMMAE значительно более эффективно подавляли рост опухолей, чем конъюгаты mcMMAF.

Пример 20. Стабильность ведущего клона ADCs против TF и ADCs IgG1-b12.

Стабильность конъюгированных с MMAE и MMAF материалов тестировали при хранении в течение 10 дней, 1, 2 и 3 месяцев при  $< -65^\circ\text{C}$  и  $5^\circ\text{C}$ . В этом примере представлены данные только по трем месяцам, поскольку аналогичные результаты были получены для всех промежуточных точек времени. Кроме того, стабильность материалов тестировали при повторных циклах замораживания-оттаивания.

Приготовленные партии ADC (четыре партии IgG, конъюгированных с двумя различными линкерами, табл. 6) подвергали глубокой заморозке. Для тестирования на стабильность их оттаивали и разбавляли до 1 мг/мл в PBS. Разбавленный материал делили на порции по 300 мкл в криопробирках, а пробирки ставили на хранение при температуре  $< -65^\circ\text{C}$  или  $5^\circ\text{C}$ . Для замораживания-оттаивания по три флакона из каждой партии замораживали при  $< -65^\circ\text{C}$  на всю ночь, а затем оставляли оттаиваться при комнатной температуре. Цикл замораживания-оттаивания повторяли еще два раза (в целом образцы подвергали замораживанию-оттаиванию по три раза). Все материалы анализировали в начале исследования (t=0) методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) и на связывание с тканевым фактором (TFECDHis) методом ELISA. Такие же анализы проводили для образцов, хранившихся в течение трех месяцев (t=3 месяца) при  $< -65^\circ\text{C}$  и  $5^\circ\text{C}$  и для замороженных-оттаявших образцов.

SDS-PAGE проводили в восстановительных и невосстановительных условиях в гелях 4-12% Nu-PAGE Bis-Tris (Invitrogen, Breda, Нидерланды) по модифицированному методу Laemli (Laemli 1970 Nature 227(5259): 680-5), при этом пробы разгоняли при нейтральном pH. Гели SDS-PAGE окрашивали Coomassie и делали цифровые снимки на установке Optigo Imaging System (Isogen Life Science).

HP-SEC проводили на разделительном блоке Waters Alliance 2695 или 2795 (Waters, Etten-Leur, Нидерланды), подсоединенном к колонке TSK HP-SEC (G3000SWxl; Tosoh Bioscience, через Omnilabo, Breda, Нидерланды) и двухволновому детектору поглощения Waters 2487 (Waters). Пробы разгоняли при 1 мл/мин. Результаты обрабатывали с помощью программы Empower, версия 2, и выражали на пик в процентах от общей высоты пика.

Связывание с рекомбинантным белком внеклеточного домена TF анализировали методом ELISA, как описано выше в примере 17.

На фиг. 10 a-d представлен анализ методом SDS-PAGE неконъюгированных и конъюгированных ведущих клонов против TF и IgG1-b12 в начале испытания на стабильность (t=0). При невосстановительном SDS-PAGE (a,b) неконъюгированный IgG1 мигрировал в виде зоны интактного IgG примерно в 150 кД. Как и ожидалось, ADCs в значительной степени распадались на фрагменты IgG меньших размеров (125 кД=HHL, 99 кД=HH, 67 кД=HL, 51 кД=H и 25 кД=L) вследствие денатурирующих условий SDS-PAGE и нековалентной природы молекул ADC (разрушение дисульфидных связей) (фиг. 10 a,b). При восстановительном SDS-PAGE (фиг. 10 c,d) проявлялись зоны неконъюгированной легкой цепи (L0) и легкой цепи с одним присоединенным (L1) препаратом (MMAE или MMAF). Наблюдалось частичное разрешение неконъюгированной тяжелой цепи (H0) и конъюгированных с MMAE форм (H1, H2 и H3). Конъюгированные с MMAF и неконъюгированные формы тяжелой цепи разделялись плохо, но проявлялись как диффузная полоса в 50 кД.

Результаты SDS-PAGE для образцов после трех месяцев хранения при обеих температурах ( $< -65^\circ\text{C}$  и  $5^\circ\text{C}$ ) были сравнимы с данными при t=0, как видно из фиг. 10 e-f. Также не наблюдалось отличий для подвергнутых замораживанию-оттаиванию образцов по сравнению с исходным материалом при анализе

методом SDS-PAGE (данные не приводятся).

На фиг. 11 представлено наложение профилей HP-SEC для различных партий ADC при t=0 и t=3 месяца при обеих температурах. В условиях нативного HP-SEC материал ADC (t=0) выходил как один пик мономерных молекул IgG с небольшим количеством димерных молекул IgG. Не наблюдалось никаких изменений для конъюгированного с MMAE и MMAF HuMab-TF-098 (a, b) и HuMab-TF-011 (c, d) после трех месяцев хранения. Однако материал ADC HuMab-TF-111 (e, f) и IgG1-b12 (g, h) проявлял снижение выхода (высоты пика) через t=3 месяца. Такое снижение выхода уже наблюдалось в образцах при t=10 дней и оставалось неизменным после длительного хранения вплоть до 3 месяцев.

Содержание мономерных молекул IgG (% мономеров) рассчитывали из профиля пиков HP-SEC, а данные приведены в табл. 9. Для сравнения приведен % мономеров у неконъюгированного материала. Данные показывают, что > 95% материала ADC состояло из интактных мономерных молекул IgG. Содержание мономеров оставалось неизменным после трех месяцев хранения при < -65°C и 5°C, свидетельствуя, что за это время не образовались агрегаты.

Анализ методом HP-SEC подвергнутых замораживанию/оттаиванию образцов показал, что выход пика IgG у всех образцов был близок к выходу при t=0 (данные не приводятся). Однако замораживание-оттаивание материала HuMab-TF-ADC приводило к небольшому снижению % мономеров (1,5-3,6%), как видно из табл. 9. Это связано с образованием небольшого количества агрегатов (димерных молекул IgG, судя по данным HP-SEC; данные не приводятся).

Связывание неконъюгированных и конъюгированных HuMab-TF-098, -011 и -111 с рекомбинантным белком внеклеточного домена TF (TFECDHis) тестировали методом ELISA. После трех месяцев хранения при < -65°C и 5°C связывающая способность не изменилась по сравнению с таковой при t=0, как видно из фиг. 12. Близкие результаты были получены для подвергнутых замораживанию-оттаиванию образцов (данные не приводятся).

Эксперименты по стабильности показали, что материал ADC, при 1 мг/мл, был стабильным при < -65°C и при 5°C в течение по меньшей мере трех месяцев при определении методами SDS-PAGE, HP-SEC и по связыванию с TFECDHis. Повторное замораживание-оттаивание материала вызывало небольшое образование агрегатов.

Таблица 9. Анализ образцов ADC методом HP-SEC. Данные представлены в виде процента мономерных молекул

		T=0	t=3 месяца		Замораживание-оттаивание (3 отдельных флакона)		
			< -65°C	5°C	1	2	3
HuMab-TF-098	Линкер-токсин						
	неконъюгированное	> 99	–	–	–	–	–
	vcMMAE	98,3	97,6	98,3	96,8	96,1	96,2
	mcMMAF	95,4	98,2	98,2	92,3	92,0	91,9
HuMab-TF-011	неконъюгированное	96,1	–	–	–	–	–
	vcMMAE	96,3	95,2	95,6	93,4	93,0	92,9
	mcMMAF	95,8	96,6	96,4	94,2	93,5	93,7
HuMab-TF-111	неконъюгированное	> 99	–	–	–	–	–
	vcMMAE	98,3	98,3	98,4	96,5	94,6	95,9
	mcMMAF	97,9	97,8	> 99	95,5	95,1	94,8
IgG1-b12	неконъюгированное	> 99	–	–	–	–	–
	vcMMAE	98,2	96,2	97,3	98,3	98,2	98,3
	mcMMAF	98,6	98,8	98,8	98,1	97,9	98,0

Пример 21. Доза-эффект ADCs против TF при терапевтическом лечении привитых опухолей-ксенотрансплантатов HPAF-II у мышей SCID.

Эффективность ADCs против TF *in vivo* далее анализировали при лечении привитых подкожно опухолей-ксенотрансплантатов HPAF-II у мышей SCID различными дозами ADCs против TF. Опухоли-ксенотрансплантаты HPAF-II прививали, как описано выше, а затем следовали четыре инъекции vcMMAE-ADCs против TF в двух различных дозах (6 и 20 мкг/мышь [добавляли IgG1-b12 до конечной дозы в 60 мкг IgG1 на мышь] в 100 мкл, IP) или контрольного неконъюгированного mAb (IgG1-b12; 60 мкг/мышь в 100 мкл, IP); начиная с того момента, когда размеры опухолей составляли примерно 100-150 мм<sup>3</sup>: день 10, 13, 17 и 21. Объем опухолей измеряли по меньшей мере два раза в неделю. Объемы опухолей (мм<sup>3</sup>) рассчитывали по измерениям кронциркулем (PLEXX) как: 0,52×(длина)×(ширина)<sup>2</sup>.

Из фиг. 13 видно, что в дозе 20 мкг всех три конъюгата vcMMAE эффективно подавляли рост привитых подкожно опухолей HPAF-II. В дозе 6 мкг все три конъюгата vcMMAE лишь немного замедляли, но не подавляли рост опухоли.

#### Эквиваленты

Специалистам в данной области должны быть известны или они сами смогут установить всего лишь путем простого экспериментирования многие эквиваленты описанных здесь конкретных воплощений изобретения. Такие эквиваленты должны быть охвачены прилагаемой формулой изобретения. В

рамки изобретения также входят любые комбинации воплощений, изложенных в зависимых пунктах формулы.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор (TF), содержащий:

(i) антитело, которое связывается с тканевым фактором и включает область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 8, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 46, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 47, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 48, и

(ii) ауристин или его функциональный пептидный аналог или производное, конъюгированный с антителом через линкер.

2. Конъюгат для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, содержащий:

(i) антитело, которое связывается с тканевым фактором и включает область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 34, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 35, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 36, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 74, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 75, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 76, и

(ii) ауристин или его функциональный пептидный аналог или производное, конъюгированный с антителом через линкер.

3. Конъюгат для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, содержащий:

(i) антитело, которое связывается с тканевым фактором и включает область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 38, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 39, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 40, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 78, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 79, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 80, и (ii) ауристин или его функциональный пептидный аналог или производное, конъюгированный с антителом через линкер.

4. Конъюгат для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, содержащий:

(i) антитело, которое связывается с тканевым фактором и включает область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 42, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 43, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 44, и

(ii) ауристин или его функциональный пептидный аналог или производное, конъюгированный с антителом через линкер.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, в котором антитело включает

область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; или

область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; или

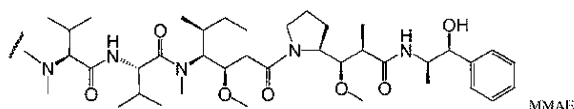
область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; или

область  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и область  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

6. Конъюгат по любому из пп.1-5, в котором антитело является полноразмерным антителом.

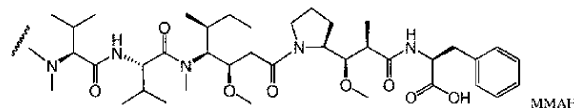
7. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, в котором антитело является полностью человеческим моноклональным антителом типа IgG1, предпочтительно IgG1,к.

8. Конъюгат по любому из пп.1-7, в котором ауристин представлен монометилауристином E (ММАЕ):



где волнистой линией обозначен сайт прикрепления для линкера.

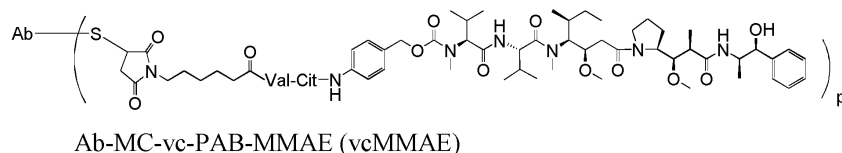
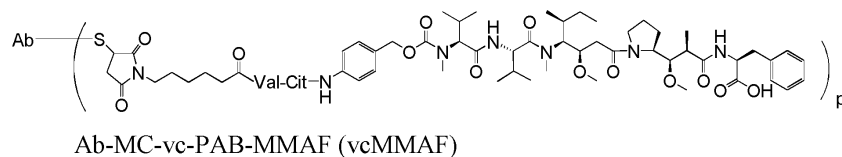
9. Конъюгат по любому из пп.1-4, в котором ауристин представлен монометилауристином F (MMAF):



где волнистой линией обозначен сайт прикрепления для линкера.

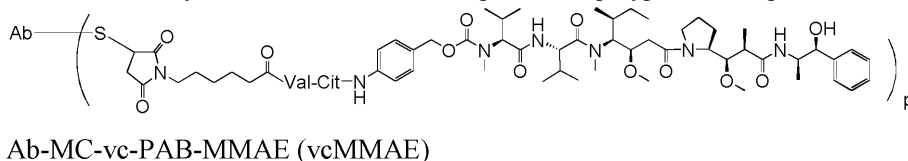
10. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, в котором линкер прикрепляется к сульфгидрильным остаткам антитела против TF, полученным при (частичном) восстановлении антитела против TF.

11. Конъюгат по любому из пп.1-7, в котором линкер-ауристин представлен vcMMAF или vcMMAE:



где  $p$  означает число от 1 до 8, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF.

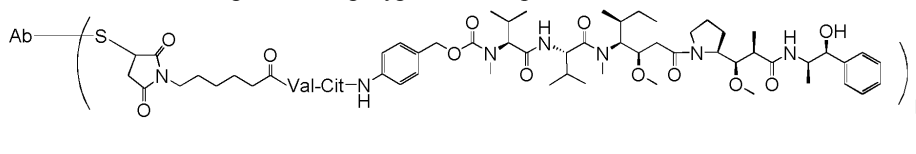
12. Конъюгат по любому из пп.1-8 и 10-11, в котором линкер-ауристин представлен vcMMAE:



где  $p$  означает число от 1 до 8, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF.

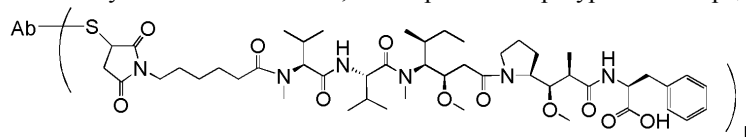
13. Конъюгат по п.12, где  $p$  означает число от 3 до 5.

14. Конъюгат по п.1, в котором линкер-ауристин представлен vcMMAE:



где  $p$  означает число от 3 до 5, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF, которое включает (i) область  $V_H$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 8, и область  $V_L$ , содержащую участок CDR1 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 46, участок CDR2 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 47, и участок CDR3 с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 48.

15. Конъюгат по любому из пп. 1-7 или 9-11, в котором линкер-ауристин представлен mcMMAF:



где  $p$  означает число от 1 до 8, S означает сульфгидрильный остаток антитела против TF, а Ab означает антитело против TF.



16. Фармацевтическая композиция для индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, содержащая конъюгат по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Применение конъюгата по любому из пп.1-15 для лечения рака.

18. Применение по п.17, в котором рак выбирается из группы, состоящей из опухолей центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких, такого как NSCLC, рака молочной железы, особенно тройне отрицательного рака молочной железы, рака пищевода, рака желудка, рака печени и желчных протоков, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почек, рака предстательной железы, рака эндометрия, рака яичников, злокачественной меланомы, саркомы, опухолей неизвестного первичного происхождения, рака костного мозга, острой лимфобластной лейкемии, острой миелоидной лейкемии (AML), хронической лимфобластной лейкемии и неходжкинской лимфомы, рака кожи, глиомы, рака головного мозга, рака матки и рака прямой кишки.

19. Применение по п.17 для лечения рака поджелудочной железы.

20. Применение по п.17 для лечения колоректального рака.

21. Применение по п.17 для лечения рака яичников.

22. Применение по п.17 для лечения рака молочной железы.

23. Применение по п.17 для лечения рака предстательной железы.

24. Применение по п.17 для лечения рака мочевого пузыря.

25. Применение комбинации конъюгата по любому из пп.1-13 с химиотерапевтическим средством для лечения рака.

26. Применение конъюгата по любому из пп.1-15 для изготовления медикамента для лечения рака.

27. Способ индуцирования клеточной гибели или ингибирования роста и/или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих тканевой фактор, который включает введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-15.

28. Способ лечения любого из заболеваний, определенных в любом из пп.17-24, который включает введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-15.

29. Способ по п.28, который дополнительно включает введение одного или нескольких для лечения рака.

VH:

```

[---CDR1---]          [---CDR2---]          [-----CDR3-----]
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSNYAMHWVRQAPGKGLWVAALWYDCVNIYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCCARRPGT-----FYGLDVWGQGTTLTVSS  VH1015-114 (1)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSNYAMHWVRQAPGKGLWVSAISSGSGDYTYTDSVKGKRFITSRDINSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCCARSPWG-----YYLDSWGQGTTLTVSS  VH1015-011 (5)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKGLWVAISSGSGDSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGYPL-----LWYFDLWGRGTLTVSS  VH1015-017 (9)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKGLWVSAISSGSGGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPWT-----YTFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-042 (13)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYAMHWVRQAPGKGLWVSAISSGSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKTPWG-----YTFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-092 (17)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSNYAMHWVRQAPGKGLWVSAISSGSGVTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKTPWG-----YTFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-101 (21)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMHWVRQAPGKGLWVAISNDGYNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDQQLG-----RGYFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-025 (25)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYAMHWVRQAPGKGLWVAISNDGYNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDQQLG-----RGYFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-109 (29)
QVQLVQSGAEVSRPQSPKSLSCASGGSFNRYPIFWRQAPGQGFQEWGRIIPILGITYAQAQKFGQVITADKSTAYMELNSLRSEDTAVYYCAGGDD-----LD--AFDIWGQGTTLTVSS  VH1015-098 (33)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNRYAMHWVRQAPGKGLWVAISNDGINKYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDHTMV-----RGAFDYWGQGTTLTVSS  VH1015-111 (37)

```

VL:

```

[---CDR1---]          [CDR2]          [---CDR3---]
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKQPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGQTKVEIK  VL1015-114 (41)
DIQMTQSPSSLASAGDRVITTCRASQGISS--RLAWYQKQPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP--YTFGQGTKLEIK  VL1015-011 (45)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQKQPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP--RTFGGQTKVEIK  VL1015-017 (49)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQKQPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP--RTFGGQTKVEIK  VL1015-042 (53)
DIQMTQSPSSLASVGDRTVITTCRASQGISS--RLAWYQKQPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP--YTFGQGTKLEIK  VL1015-092 (57)
DIQMTQSPSSLASVGDRTVITTCRASQGISS--RLAWYQKQPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLYTFGQGTKLEIK  VL1015-101 (61)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS--YLAWYQKQPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWP--LTFGGQTKVEIK  VL1015-025 (65)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS--YLAWYQKQPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWP--LTFGGQTKVEIK  VL1015-109 (69)
DIQMTQSPSSLASVGDRTVITTCRASQGISS--RLAWYQKQPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP--YTFGQGTKLEIK  VL1015-098 (73)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS--YLAWYQKQPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWP--LTFGGQTKVEIK  VL1015-111 (77)

```

Фиг. 1

## SEQ ID NO: 81:

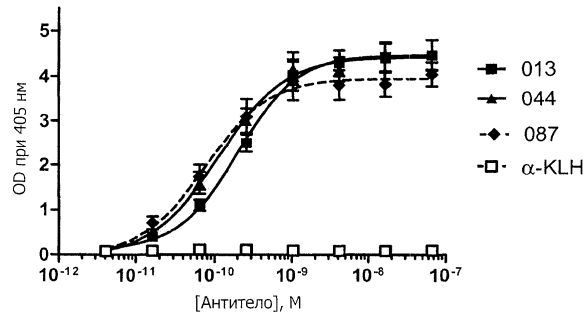
1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDRRVES  
 101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED  
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GOPREPOVYT LPPSOEEMTK NOVSLTCLVK  
 251 GFYPSDIAVE WESNGOPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG  
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTOKS LSLSLGK

## SEQ ID NO: 82:

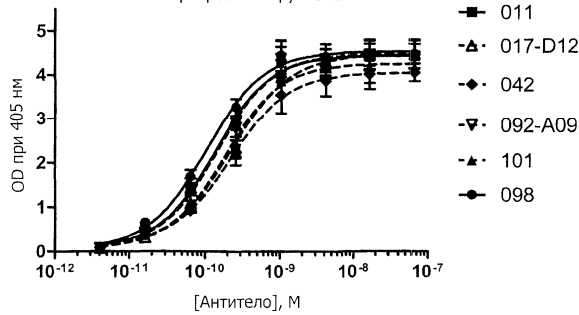
1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDRRVAP  
 101 EFLGGPSVFL FFPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV  
 151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI  
 201 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
 251 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL  
 301 HNHYTQKSLK LSLGK

Фиг. 2

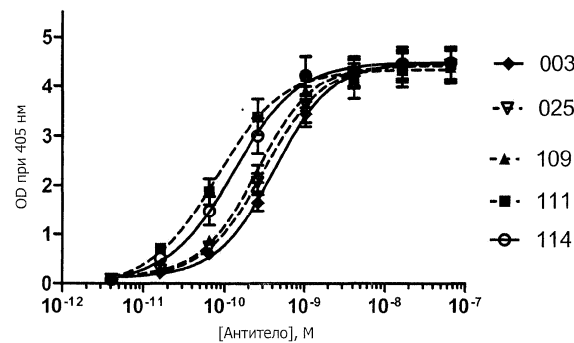
ELISA на TFECDis  
 перекрестная группа I



ELISA на TFECDis  
 перекрестная группа II

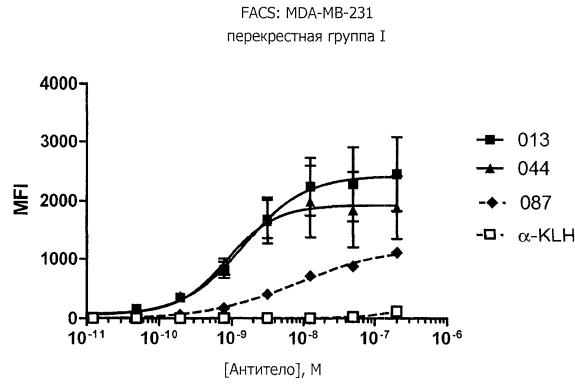


ELISA на TFECDis  
 перекрестная группа III (II/III)

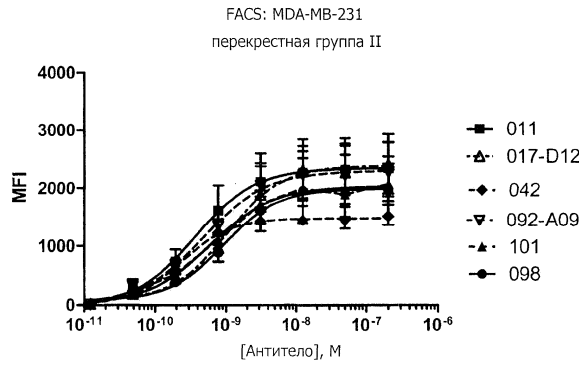


Фиг. 3

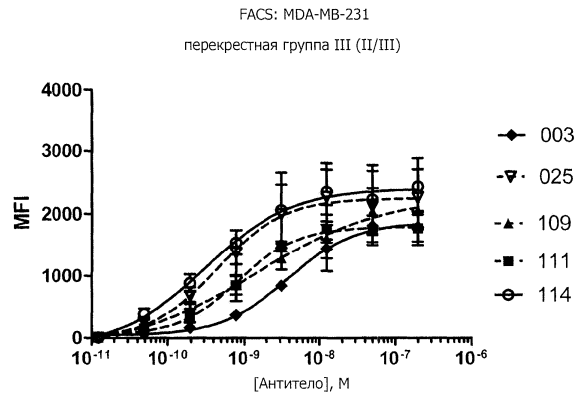
a)



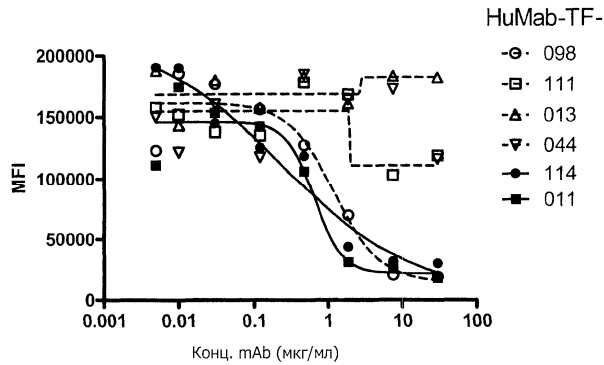
b)



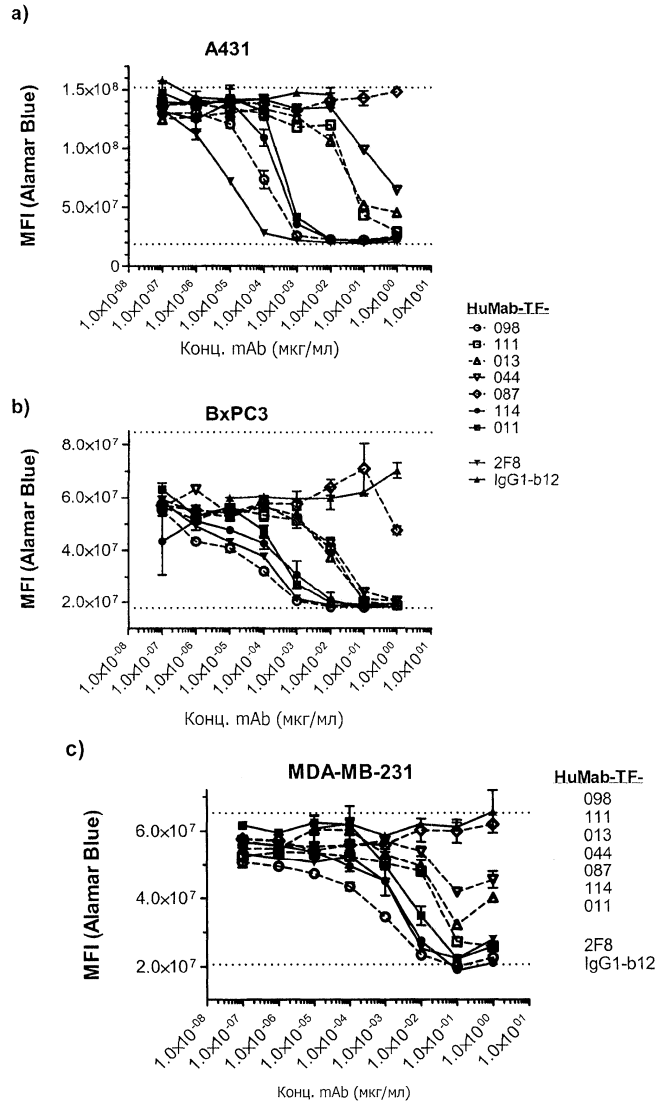
c)



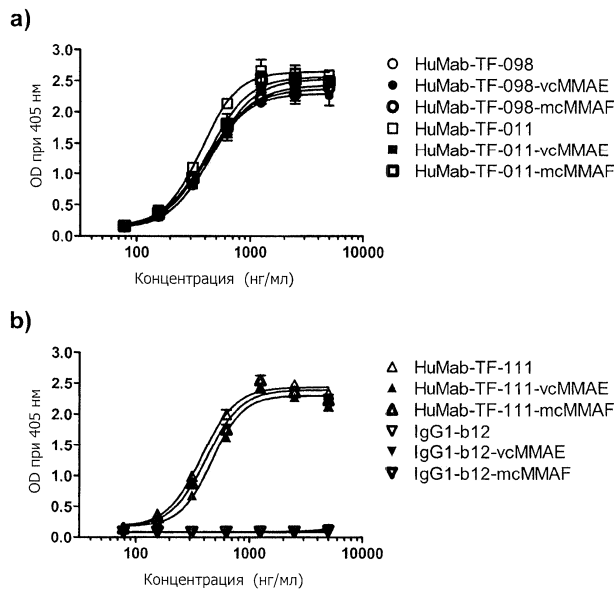
Фиг. 4



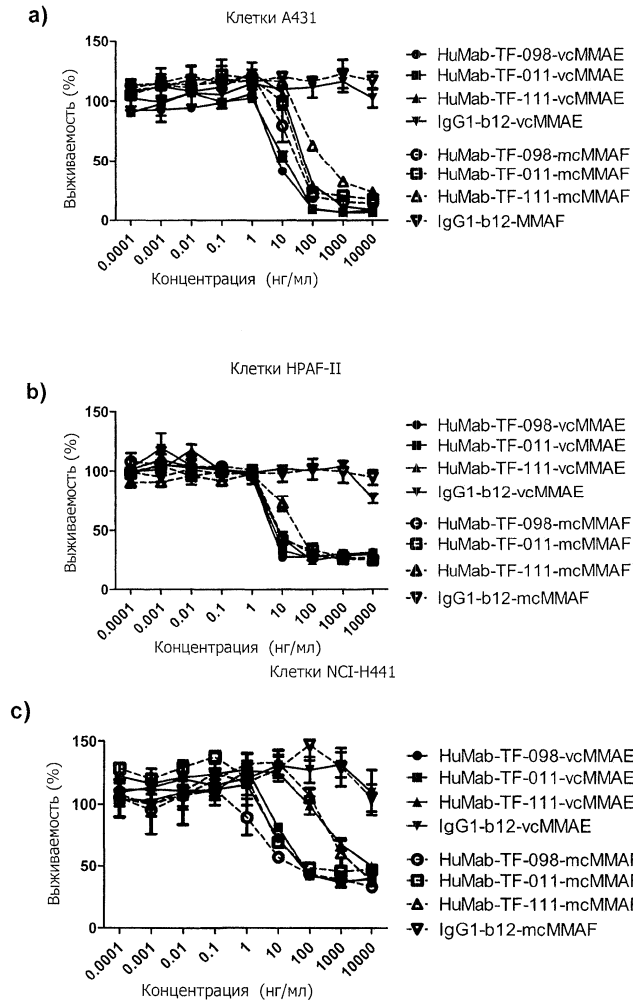
Фиг. 5



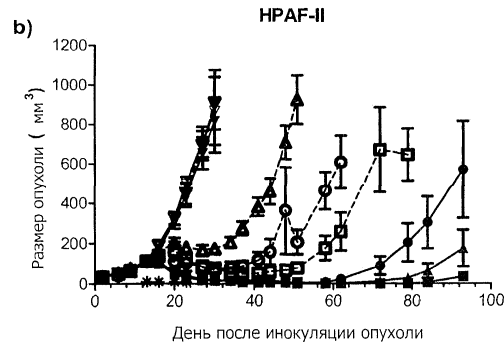
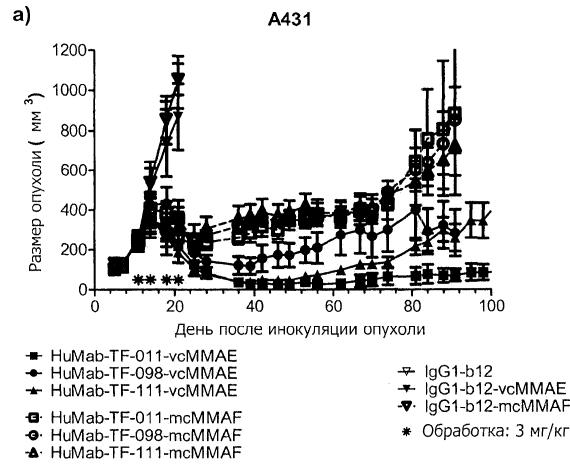
Фиг. 6



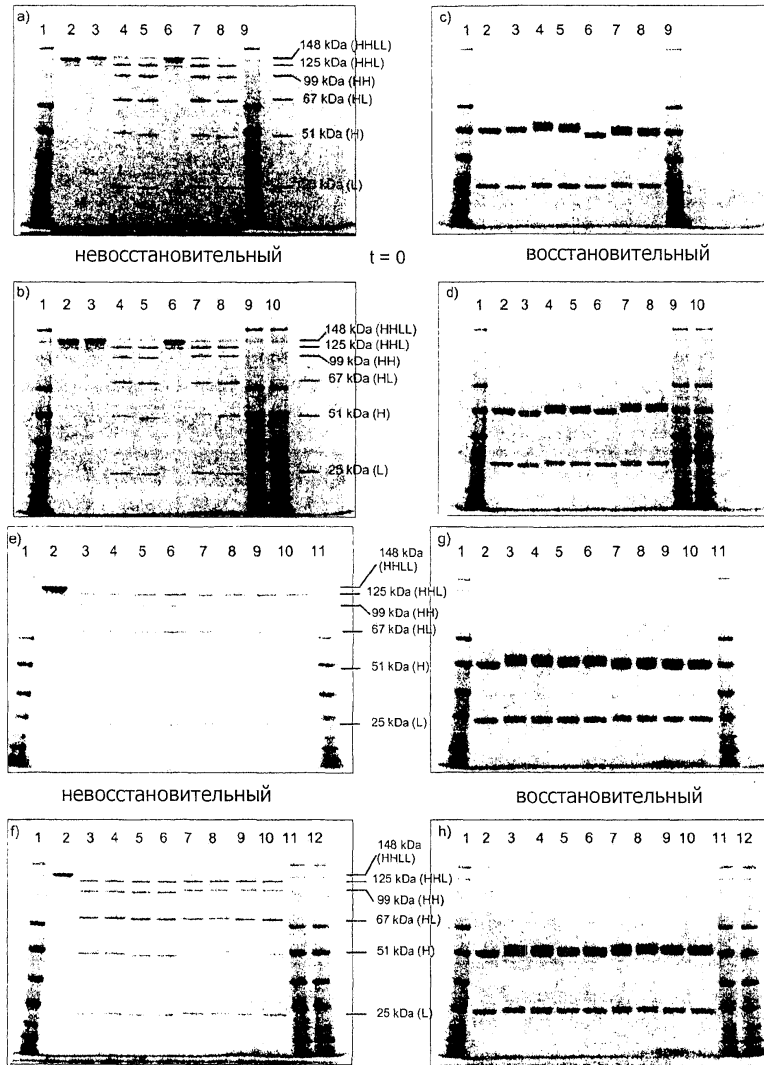
Фиг. 7



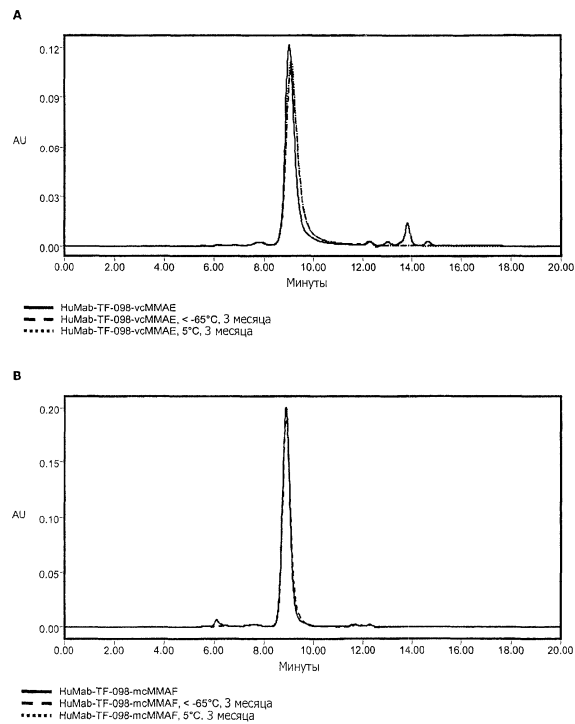
Фиг. 8

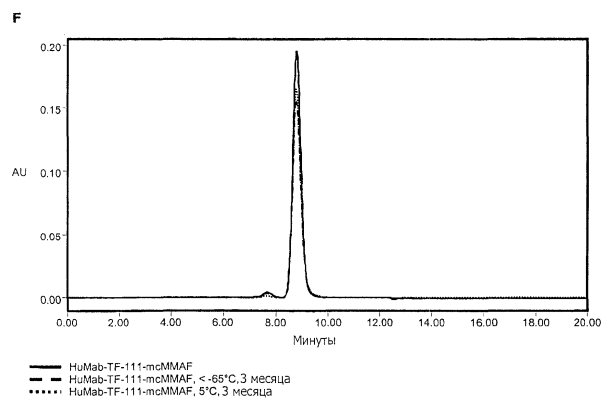
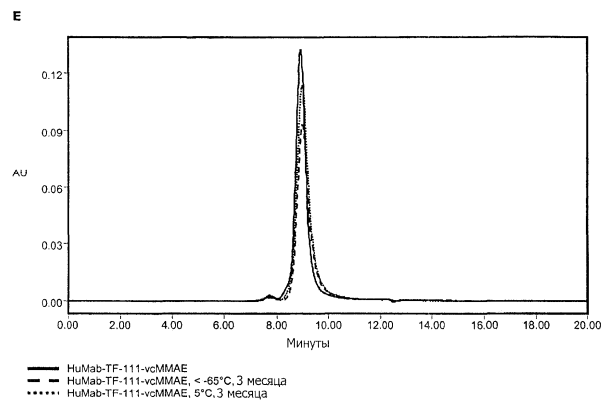
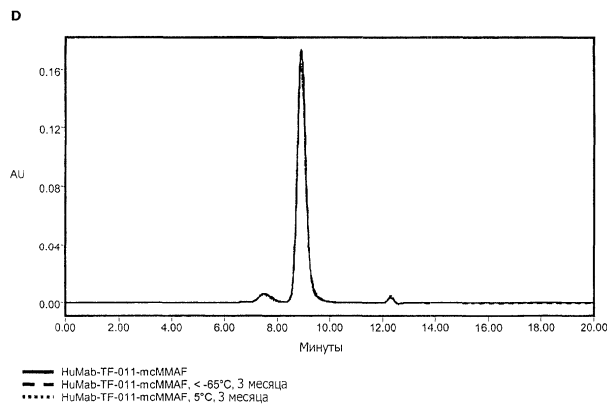
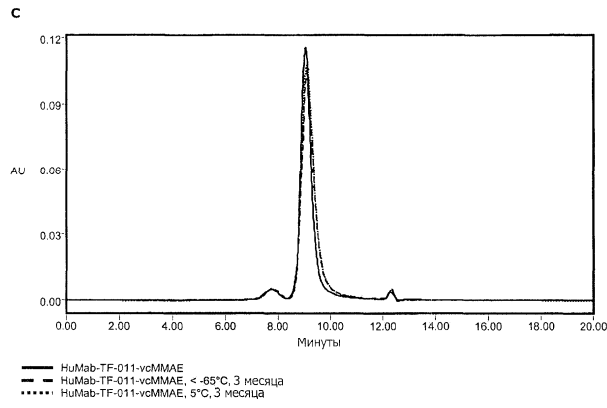


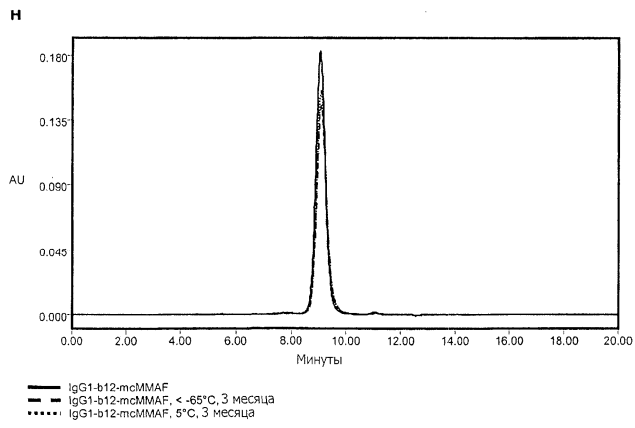
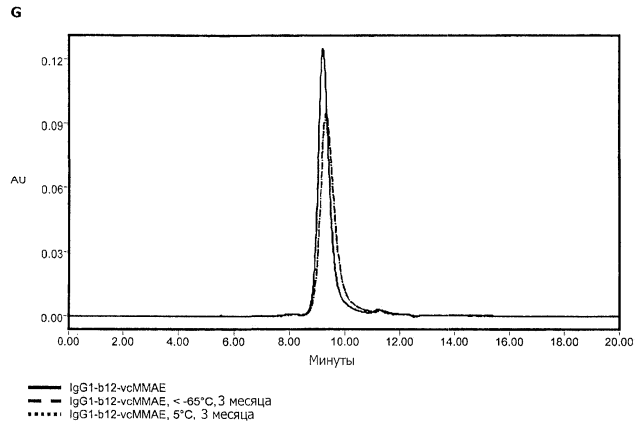
Фиг. 9



Фиг. 10

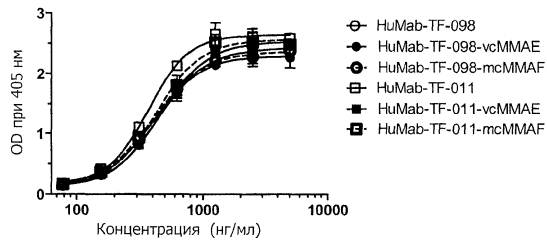




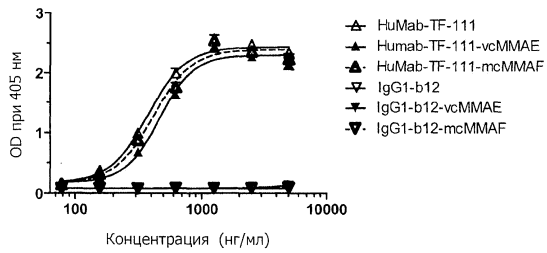


Фиг. 11

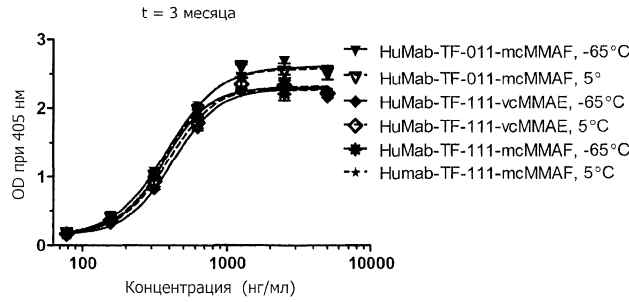
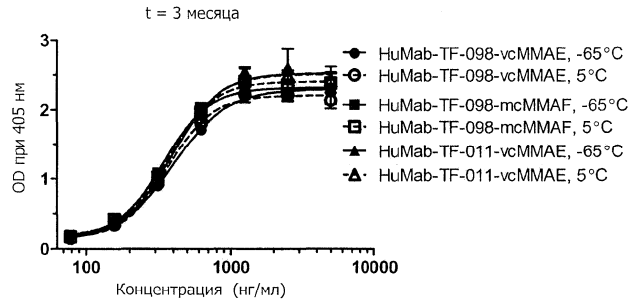
t = 0



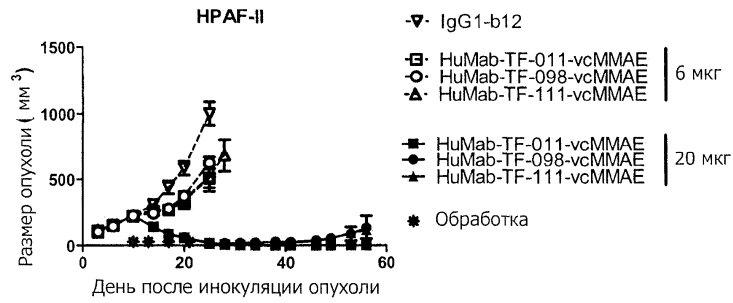
t = 0







Фиг. 12



Фиг. 13

