

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036927**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.15**

**(21)** Номер заявки  
**201690599**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.10.10**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54) КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ LY75 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

---

**(31)** 61/890,098; 61/890,104

**(32)** 2013.10.11

**(33)** US

**(43)** 2016.07.29

**(86)** PCT/GB2014/053057

**(87)** WO 2015/052537 2015.04.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОКСФОРД БИОТЕРЕПЬЮТИКС  
ЛТД (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Терретт Джонатан Александер (US),  
Акройд Джеймс Эдвард (GB)**

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

**(56)** WO-A1-9623882

PREMKUMAR VUMMIDI GIRIDHAR ET AL.: "Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells", CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS; OFFICIAL JOURNAL OF THE METASTASIS RESEARCH SOCIETY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 28, no. 8, 2 September 2011 (2011-09-02), pages 887-897, XP019976075, ISSN: 1573-7276, DOI: 10.1007/S10585-011-9420-X, last sentence of the introduction par.; page 896, LH column, last full par.

WO-A2-2009061996

---

**(57)** В изобретении представлены антитела, которые связываются с LY75. Также представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, векторы экспрессии, клетки-хозяева и способы экспрессии антител. Антитела можно применять для лечения рака, в том числе рака поджелудочной железы, рака яичника, рака молочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака пищевода, рака кожи, рака щитовидной железы, рака легкого, рака мочевого пузыря, множественной миеломы и лимфомы.

---

**B1**

**036927**

**036927  
B1**

### Введение

Настоящее изобретение в целом относится к областям иммунологии и молекулярной биологии. Более конкретно, в данном документе представлены антитела и другие терапевтические белки, направленные против LY75, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела и терапевтические белки, способы получения моноклональных антител и других терапевтических белков и способы лечения заболеваний, таких как формы рака, опосредованные экспрессией/активностью LY75 и/или ассоциированные с аномальной экспрессией/активностью его лигандов.

### Предпосылки изобретения

Лимфоцитарный антиген 75 действует в качестве эндоцитирующего рецептора, направляющего захваченные антигены из внеклеточного пространства в специализированный антиген-процессирующий компартмент, и, как полагают, вызывает снижение пролиферации В-лимфоцитов. Экспрессия лимфоцитарного антигена 75 наблюдалась при раке поджелудочной железы, яичника, молочной железы, ободочной и прямой кишки, пищевода, кожи, щитовидной железы и легкого (немелкоклеточном), а также при множественной миеломе и многих различных подтипах лимфомы и лейкоза.

В WO 2009/061996 раскрыты выделенные моноклональные антитела, связывающиеся с DEC-205 (LY75) человека, и родственные композиции и молекулы на основе антител. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антитела, а также терапевтические и диагностические способы применения антител.

В WO 2008/104806 раскрыты аффинные реагенты, способные к связыванию с LY75, для применения в лечении или профилактике рака.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении представлены антитела, направленные против LY75, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела по настоящему изобретению, способы получения антител к LY75 и способы лечения заболеваний, таких как нарушения, опосредованные LY75, например формы рака у человека, включающие рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак кожи, рак щитовидной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак желудка, лейкоз, множественную миелому и лимфому.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены антитело или его антигенсвязывающая часть, которые (а) связываются с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2, или (б) конкурируют за связывание с LY75 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 CDR, выбранных из группы, включающей CDR, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7, и/или переменную область легкой цепи, содержащую 1, 2 или 3 CDR, выбранных из группы, включающей CDR, содержащие SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

В предпочтительных вариантах осуществления указанные антитела являются выделенными антителами.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с LY75 (SEQ ID NO: 15) и интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75, вызывают реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в присутствии эффекторных клеток или вызывают цитотоксическую Т-клеточную реакцию в присутствии эффекторных клеток.

В другом варианте осуществления антитело содержит области, определяющие комплементарность (CDR), или переменные области (VR) тяжелых и/или легких цепей конкретного антитела, описанного в данном документе (например, упоминаемого в данном документе как "LY75 A1"). Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) антитела LY75 A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1, и/или домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи ( $V_L$ ) LY75 A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую первую  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и/или переменную область легкой цепи, содержащую первую  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 8; вторую  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 10, где необязательно любая одна или более CDR независимо содержат одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, добавлений или делеций.

В другом варианте осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с LY75 человека и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1 и/или ее консерватив-

ные модификации последовательности. Антитело может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2 и/или ее консервативные модификации последовательности.

В дополнительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с LY75 человека и содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO: 1 и/или 2, и их консервативные модификации последовательности.

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

В одном варианте осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2 или последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 2.

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

Также настоящим изобретением охватываются антитела, конкурирующие за связывание с LY75 с антителами по настоящему изобретению. В конкретном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2, или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичные им.

В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2 (LY75 A1).

Другие антитела по настоящему изобретению связываются с тем же эпитопом или эпитопом на LY75, распознаваемым антителами, описанными в данном документе. В другом конкретном варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2, или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80% идентичные им. В другом варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2 (LY75 A1).

В дополнительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению специфично связываются с одним или более, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, пептидами, wybranными из группы, включающей SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или 37, или их фрагментами, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей

мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами по настоящему изобретению, содержит один или более пептидов, два или более или три или более пептидов, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 27, 29, 30, 34, 35, 36 или 37, или их фрагментов, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами по настоящему изобретению, содержит один или более пептидов, например, два или три пептида, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 30, 36 и 37, или их фрагментов, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот.

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

Антитела по настоящему изобретению могут быть антителами полной длины, например, любого из следующих изотипов: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, секреторный компонент IgA, IgD и IgE. В альтернативном случае антитела могут представлять собой фрагменты, такие как антигенсвязывающая часть или одноцепочечное антитело (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный Fv-фрагмент, выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), или комбинация двух или более выделенных CDR). Антитела могут быть антителами любого типа, в том числе, без ограничений, человеческими, гуманизированными и химерными антителами.

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению находятся в форме иммуноконъюгата (т.е. дополнительно содержат ковалентно присоединенный компонент). В конкретном варианте осуществления компонент представляет собой лекарственное средство, такое как майтанзиноид, доластин, ауристин, трихотецен, калихеамицин, CC1065 или их производные. В предпочтительном варианте осуществления компонент-лекарственное средство представляет собой DM1 или DM4.

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению дополнительно охватывают биспецифическую молекулу и в таковом качестве могут вызывать реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в присутствии эффекторных клеток, уничтожая, таким образом, клетки, экспрессирующие LY75.

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению дополнительно охватывают биспецифическую молекулу и в таковом качестве могут вызывать цитотоксическую Т-клеточную реакцию в присутствии эффекторных клеток, уничтожая, таким образом, клетки, экспрессирующие LY75.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелых и/или легких цепей антител по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления представлена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению или ее антигенсвязывающую часть. В другом варианте осуществления представлена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую легкую цепь антитела по настоящему изобретению или ее антигенсвязывающую часть. В дополнительном варианте осуществления представлена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антител по настоящему изобретению.

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

В другом аспекте настоящего изобретения представлены векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелых и/или легких цепей антител по настоящему изобретению, функционально связанные с одним или более регуляторными элементами.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелых и/или легких цепей вышеупомянутых антител

или их антигенсвязывающих частей. Предпочтительно при этом клетка-хозяин экспрессирует указанные вариабельные области тяжелых и/или легких цепей или их антигенсвязывающих частей, если клетку-хозяина выращивают в условиях, в которых экспрессируется(ются) нуклеиновая(ые) кислота(ы).

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин содержит (i) вектор экспрессии согласно настоящему изобретению или (ii) первый вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению или ее антигенсвязывающую часть, и второй вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела по настоящему изобретению или ее антигенсвязывающую часть.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлено получение антитела или его антигенсвязывающей части, включающее культивирование клетки-хозяина согласно настоящему изобретению в условиях, в которых экспрессируются антитело или его антигенсвязывающая часть, и необязательно выделение антитела или его антигенсвязывающей части.

В дополнительном аспекте представлен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающей части согласно настоящему изобретению, где антитело или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство. Будет понятно, что антитело или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению связываются с LY75 (SEQ ID NO: 15). В одном варианте осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, содержащую первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8; вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10, а также ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.

В дополнительном аспекте представлен способ лечения рака, где пациенту, нуждающемуся в этом, вводят антитело или антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению и где такое антитело или антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению вызывают реакцию ADCC в присутствии эффекторных клеток. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, содержащую первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8; вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10.

В дополнительном аспекте представлен способ лечения рака, где пациенту, нуждающемуся в этом, вводят антитело или антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению, и где такое антитело или антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению вызывают цитотоксическую Т-клеточную реакцию в присутствии эффекторных клеток. Предпочтительно антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую первую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью vhCDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, содержащую первую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 8; вторую vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью vlCDR, содержащую SEQ ID NO: 10.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены одно или более антител по настоящему изобретению для применения в лечении рака.

Также представлено применение одного или более антител по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак почки, рак печени, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак головы и шеи, рак кожи, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак легкого, лейкоз, миелому, предпочтительно множественную миелому, и лимфому. Особенно предпочтительные формы рака включают неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмопитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфопитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы и трижды негативный рак молочной железы.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения представлен способ выявления, диагностики и/или скрининга или отслеживания прогрессирования рака, где при указанном раке экспрессируется LY75, или отслеживания эффекта противоракового лекарственного средства или терапии, направленных на указанный рак, у субъекта, включающий выявление наличия или уровня антител, способных к иммуноспецифичному связыванию с LY75, или одного или более их фрагментов.

Предпочтительно рак выбран из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак почки, рак печени, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак головы и шеи, рак кожи, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак легкого, лейкоз, миелому, предпочтительно множественную миелому, и лимфому. Особенно предпочтительные формы рака включают неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфопитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы и трижды негативный рак молочной железы.

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

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

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлено выравнивание тяжелой цепи LY75 A1 (SEQ ID NO: 1),  $V_H$  3-15 человека зародышевого типа (SEQ ID NO: 11) и JH4 человека зародышевого типа (SEQ ID NO: 12). CDR-области тяжелой цепи LY75 A1 подчеркнуты.

На фиг. 2 представлено выравнивание легкой цепи LY75 A1 (SEQ ID NO: 2),  $V_L$  012 человека зародышевого типа (SEQ ID NO: 13) и JK4 человека зародышевого типа (SEQ ID NO: 14). CDR-области легкой цепи LY75 A1 подчеркнуты.

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

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

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

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

На фиг. 3е представлена цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток Karpas 299.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

На фиг. 4c представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток HPAFII аденокарциномы поджелудочной железы в ксенотрансплантатной модели на бестимульных "голых" мышах.

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

На фиг. 4e представлена эффективность антител к LY75, конъюгированных с DM1 либо DM4, в отношении клеток MDA-MB-468 в ксенотрансплантатной модели на бестимульных "голых" мышах.

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

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

На фиг. 5b показано неконкурентное связывание LY75 A1 и mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1.

На фиг. 6a-6j показаны графические представления связывания антитела LY75 A1 с пептидами LY75 в пептидной микроматрице.

На фиг. 7 показано выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов, с которыми связывается антитело LY75 A1, как в микроматричном анализе пептидов, так и в анализе пептидов по методу соосаждения. Выделенные пептиды, вероятно, образуют эпитоп, распознаваемый антителом LY75 A1.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее раскрытие относится к выделенным антителам, связывающимся с белком LY75, которые описаны под SEQ ID NO: 15, как вкратце изложено в данном документе.

В дополнение, антитела к LY75 по настоящему изобретению могут представлять собой биспецифическую молекулу и в таковом качестве могут вызывать реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в присутствии эффекторных клеток, уничтожая, таким образом, клетки, экспрессирующие LY75.

В дополнение, антитела к LY75 по настоящему изобретению могут представлять собой биспецифическую молекулу и в таковом качестве могут вызывать цитотоксическую Т-клеточную реакцию в присутствии эффекторных клеток, уничтожая, таким образом, клетки, экспрессирующие LY75.

В дополнение, антитела к LY75 по настоящему изобретению могут интернализироваться при контакте с клетками, экспрессирующими рецептор LY75. Как обсуждается в данном документе, рецептор LY75 сверхэкспрессируется и/или дифференциально экспрессируется в определенных раковых клетках, в том числе, без ограничений, при раке почки, раке печени, раке пищевода, раке головы и шеи, раке кожи, раке щитовидной железы, раке желудка, раке ободочной и прямой кишки, раке поджелудочной железы, раке предстательной железы, раке молочной железы, раке яичника, раке мочевого пузыря, лейкозе, предпочтительно остром миелоидном лейкозе или хроническом лимфоцитарном лейкозе, миеломе, предпочтительно множественной миеломе, лимфоме, предпочтительно DLBCL, В-клеточной лимфоме, фолликулярной лимфоме, мантийноклеточной лимфоме, лимфоме из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточной лимфоме, богатой Т-клетками/гистиоцитами, лимфоме Беркитта, лимфо-плазмоцитарной лимфоме, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфоме, лимфоме из клеток маргинальной зоны, Т-клеточной лимфоме, периферической Т-клеточной лимфоме, анапластической крупноклеточной лимфоме и ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме, а также раке легкого.

В связи с этим, если антитела к LY75 по настоящему изобретению конъюгированы с лекарственными средствами (иногда называемые в данном документе "конъюгатами антитело-лекарственное средство" или "ADC"), интернализация этих молекул ADC раковыми клетками приводит к гибели клеток и, таким образом, лечению опухолей.

В настоящем изобретении представлены антитела, обладающие конкретными структурными особенностями, такими как CDR-области с конкретными аминокислотными последовательностями. В данном документе описан набор CDR, которые могут образовывать аффинный реагент, например антитело, который характеризуется связыванием с LY75.

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

#### Белки LY75.

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

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

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

Антитело по настоящему изобретению в некоторых случаях может перекрестно реагировать с LY75 от вида, отличного от человека. Например, для облегчения проведения клинического исследования антитела по настоящему изобретению могут перекрестно реагировать с молекулами LY75 мышей или приматов. В альтернативном случае в некоторых вариантах осуществления антитела могут обладать полной специфичностью к LY75 человека и могут не характеризоваться видовой перекрестной реактивностью или другими ее типами в отношении молекул, отличных от человеческих.

#### Антитела.

В настоящем изобретении представлены антитела к LY75, обычно терапевтические и/или диагностические антитела, описанные в данном документе. Антитела, находящие применение в настоящем изобретении, могут принимать ряд форматов, описанных в данном документе, включающих традиционные антитела, а также производные, фрагменты и миметики антител, описанные ниже. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены структуры антител, содержащие набор из 6 CDR, определенных в данном документе (содержащих небольшое количество аминокислотных изменений, описанных ниже).

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

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

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

Аминоконцевая часть каждой цепи содержит варибельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, несущих основную ответственность за распознавание антигена. В варибельной об-



ласти в каждом из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи три петли собраны вместе с образованием антигенсвязывающего участка. Каждая из петель называется областью, определяющей комплементарность (далее в данном документе упоминаемой как "CDR"), в которой изменчивость аминокислотной последовательности является наиболее значительной. "Вариабельный" относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельной области существенно различаются по последовательности среди антител. Вариабельность в пределах вариабельной области распределена неравномерно. На самом деле V-области содержат относительно инвариантные участки, называемые каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенные более короткими областями чрезвычайной вариабельности, называемыми "гипервариабельными областями", каждая из которых имеет длину 9-15 аминокислот или более.

Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> содержит три гипервариабельные области ("области, определяющие комплементарность", "CDR") и четыре FR, расположенные от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

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

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

CDR вносят вклад в образование антигенсвязывающего или, более конкретно, эпитопсвязывающего участка антител. Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к участку на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, расположенные рядом благодаря сворачиванию белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные благодаря сворачиванию в третичную структуру, обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Описанные в данном документе способы определения того, с какими эпитопами связывается указанное антитело (т.е. картирования эпитопов), хорошо известны из уровня техники и включают, например, анализы по методам иммуноблоттинга и иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды LY75 исследуют в отношении реактивности с указанным антителом к LY75. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные из уровня техники, и методики, описанные в данном документе, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)). Термин "картирование эпитопов" относится к способу идентификации молекулярных детерминант распознавания антигена антителом.

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

В подклассе иммуноглобулинов IgG в тяжелой цепи находится несколько доменов иммуноглобулинов. Под "доменом иммуноглобулина (Ig)" в данном документе подразумевается область иммуноглобулина, имеющая четко выраженную третичную структуру. В настоящем изобретении интерес представляют домены тяжелых цепей, включающие константные домены тяжелых цепей (CH) и шарнирные домены. Применительно к антителам IgG каждый из изотипов IgG имеет три CH-области. Соответственно, "C<sub>H</sub>"-домены применительно к IgG являются следующими: "C<sub>H1</sub>" относится к положениям 118-220 согласно EU-индексу по Kabat. "C<sub>H2</sub>" относится к положениям 237-340 согласно EU-индексу по Kabat, а "C<sub>H3</sub>" относится к положениям 341-447 согласно EU-индексу по Kabat.

Другим типом домена тяжелой цепи Ig является шарнирная область. Под "шарнирным участком", или "шарнирной областью", или "шарнирной областью антитела", или "шарнирной областью иммуноглобулина" в данном документе подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. В структурном плане C<sub>H1</sub>-домен IgG заканчивается положением 220 согласно EU, а C<sub>H2</sub>-домен IgG начинается с положения остатка 237 согласно EU. Таким образом, для антитела IgG шарнирный участок в данном документе определяется как включающий по-

ложения с 221 (D221 в IgG1) по 236 (G236 в IgG1), где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, например, применительно к Fc-области включен нижний шарнирный участок, при этом "нижний шарнирный участок" обычно относится к положениям 226 или 230.

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

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

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

В одном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. Конкретные фрагменты антител включают, без ограничений, (i) Fab-фрагмент, содержащий V<sub>L</sub>-, V<sub>H</sub>-, C<sub>L</sub>- и C<sub>H</sub>1-домены, (ii) Fd-фрагмент, содержащий V<sub>H</sub>- и C<sub>H</sub>1-домены, (iii) Fv-фрагмент, содержащий V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-домены отдельного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, включенный посредством ссылки во всей своей полноте), содержащий отдельную вариабельную область, (v) выделенные CDR-области, (vi) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащие два связанных Fab-фрагмента, (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), где V<sub>H</sub>-домен и V<sub>L</sub>-домен связаны пептидным линкером, обеспечивающим объединение двух доменов с образованием антигенсвязывающего участка (Bird et al., 1988, Science, 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, включенный посредством ссылки во всей своей полноте), (viii) биспецифические одноцепочечные Fv (WO 03/11161, включенная посредством ссылки во всей своей полноте) и (ix) "диатела" или "триатела", поливалентные или полиспецифические фрагменты, конструируемые путем слияния генов (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO 94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Химерные и гуманизированные антитела.

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

В целом, как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, в которых объединены области от более чем одного вида. Например, "химерные антитела" традиционно содержат вариабельную(ые) область(и) от мыши (или в некоторых случаях крысы) и константную(ые) область(и) от человека. "Гуманизированные антитела" обычно относятся к антителам, отличным от человеческих, у которых каркасные области вариабельных доменов были заменены на последовательности, обнаруживаемые в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело, за исключением CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или за исключением своих CDR идентично такому антителу. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими от организма, отличного от человека, трансплантируют в каркасный участок со структурой бета-листа в вариабельной области антитела человека с получением антитела, специфичность которого определяется трансплантированными CDR. Получение таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature, 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. "Обратная мутация" по типу замены выбранных остатков акцепторных каркасных участков на соответствующие донорные остатки часто необходима для восстановления аффинности, утрачиваемой конструктором после первоначальной трансплантации (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297;

US 6407213, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте). Гуманизованное антитело в оптимальном случае также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека, и, соответственно, обычно содержит Fc-область человека. Гуманизованные антитела также можно получать с применением мышей с иммунной системой, подвергнутой генной инженерии. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654, включенный посредством ссылки во всей своей полноте. Из уровня техники хорошо известен ряд методик и способов гуманизации и реконструирования антител, отличных от человеческих (см. Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA), и литературные источники, упоминаемые там, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте). Способы гуманизации включают, без ограничений, способы, описанные в Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al., 1988; *Nature*, 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:10029-33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160:1029-1035; Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:4285-9; Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng.* 11:321-8, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности переменных областей антител, отличных от человеческих, может включать способы изменения поверхности, описанные, например, в Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973, включенном посредством ссылки во всей своей полноте. В одном варианте осуществления исходное антитело было подвергнуто созреванию аффинности, известному из уровня техники. Для гуманизации и созревания аффинности можно использовать структурные способы, например, описанные в USSN 11/004590. Для гуманизации и/или созревания аффинности переменных областей антител можно использовать способы на основе отбора, в том числе, без ограничений, способы, описанные в Wu et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 294:151-162; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271(37):22611-22618; Rader et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915; Krauss et al., 2003, *Protein Engineering*, 16(10):753-759, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Другие способы гуманизации могут включать трансплантацию лишь частей CDR, в том числе, без ограничений, способы, описанные в USSN 09/810510; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, *J. Immunol.* 169:3076-3084, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению могут представлять собой полиспецифические антитела и, в частности, биспецифические антитела, также иногда называемые "диателами". Это антитела связываются с двумя (или более) различными антигенами или различными эпитопами на одном и том же антигене. Диатела можно получать с помощью ряда способов, известных из уровня техники (Holliger and Winter, 1993, *Current Opinion Biotechnol.* 4:446-449, включенный посредством ссылки во всей своей полноте), например получать химическим путем или из межвидовых гибридом.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой мини-антитело. Мини-антитела представляют собой минимизированные антителоподобные белки, содержащие scFv, соединенный с C<sub>H</sub>3-доменом. Hu et al., 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061, включенный посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых случаях scFv может быть соединен с Fc-областью и может содержать некоторую часть шарнирной области или всю ее. Следует отметить, что мини-антитела включены в определение "антитела", несмотря на то, что они не имеют полный набор CDR.

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

ет получение антитела в большом разнообразии организмов и/или клеток-хозяев, известных в данной области техники, в которых оно не образуется в естественных условиях. Обычно выделенный полипептид получают с помощью по меньшей мере одного этапа очистки. "Выделенное антитело" относится к антителу, практически свободному от других антител с другой специфичностью к антигенам. Например, выделенное антитело, которое специфично связывается с LY75, практически свободно от антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от LY75.

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

Антитела к LY75 по настоящему изобретению специфически связываются с LY75 (например, SEQ ID NO: 15). "Специфичное связывание", или "специфично связывается с", или "специфичный к" в отношении конкретного антигена или эпитопа означает связывание, измеримо отличающееся от неспецифического взаимодействия. Специфичное связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы в сравнении со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу сходной структуры, не обладающей активностью связывания. Например, специфичное связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, сходной с целевой.

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

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

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

Антитела к LY75.

В настоящем изобретении представлены антитела к LY75, которые связываются с LY75 (SEQ ID NO: 15) и могут интернализироваться при контакте с клетками, на клеточной поверхности которых экспрессируется LY75, или могут вызывать реакцию ADCC в присутствии эффекторных клеток или вызывать цитотоксическую Т-клеточную реакцию в присутствии эффекторных клеток. Эти антитела упоминаются в данном документе как "антитела, связывающиеся с LY75" либо для простоты описания "антитела к LY75".

Антитела к LY75 интернализуются при контакте с клетками, в частности опухолевыми клетками, на поверхности которых экспрессируется LY75. Иными словами, антитела к LY75, определенные в данном документе, которые также содержат конъюгированные лекарственные средства, интернализуются опухолевыми клетками, что приводит к высвобождению лекарственного средства и последующей гибели клеток, обеспечивая лечение форм рака, характеризующихся экспрессией LY75. Интернализацию в данном случае можно измерить несколькими способами. В одном варианте осуществления антитела к LY75 по настоящему изобретению приводят в контакт с клетками, такими как линия клеток, вкратце описанная в данном документе, с помощью стандартных анализов, как, например, с использованием MabZap. Для специалиста в данной области будет очевидно, что анализ с использованием MabZap иллюстрирует ожидаемый эффект, который можно наблюдать для конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). В последнем случае ADC будет интернализироваться, привнося таким образом лекарственное средство в клетку. Токсичное лекарственное средство будет иметь способность к уничтожению клетки, т.е. к унич-

тожению целевой раковой клетки. Данные анализов MabZap легко принимаются специалистами в данной области как иллюстративные для анализов ADC (Kohls, M and Lappi, D., [2000], Biotechniques, vol. 28, no. 1, 162-165).

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

В дополнение, антитела к LY75 в присутствии эффекторных клеток вызывают реакцию ADCC, в частности, в отношении опухолевых клеток, на поверхности которых экспрессируется LY75.

В одном варианте осуществления антитело содержит области, определяющие комплементарность (CDR), или переменные области (VR) тяжелых и легких цепей конкретного антитела, описанного в данном документе (например, упоминаемого в данном документе как "LY75 A1"). Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) антитела LY75 A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи ( $V_L$ ) антитела LY75 A1, имеющей последовательность, показанную под SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую первую  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 5; вторую  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 6; и третью  $vH$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 7; и переменную область легкой цепи, содержащую первую  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 8; вторую  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 9; и третью  $vL$ CDR, содержащую SEQ ID NO: 10.

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

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

Выделенные антитела, содержащие переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или большей идентичностью последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также включены в настоящее изобретение. Промежуточные диапазоны вышеуказанных значений, например переменные области тяжелых и легких цепей, характеризующиеся по меньшей мере 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-100% идентичностью последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей, также подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением. В одном варианте осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1 или последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2 или последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления антитело содержит карбасную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%,

по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную каркасной области вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, содержащей SEQ ID NO: 16, 17 и 18. В другом варианте осуществления антитело содержит каркасную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную каркасной области вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 2, содержащей SEQ ID NO: 19, 20 и 21.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело к LY75 (называемое в данном документе "антителом LY75 A1"), содержащее следующие CDR, а также его варианты, содержащие небольшое количество аминокислотных вариантов.

A1	SEQ ID NO
CDR1 вариабельной области тяжелой цепи	5
CDR2 вариабельной области тяжелой цепи	6
CDR3 вариабельной области тяжелой цепи	7
CDR1 вариабельной области легкой цепи	8
CDR2 вариабельной области легкой цепи	9
CDR3 вариабельной области легкой цепи	10

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

Антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и антитела к LY75 по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом на LY75 человека, что и любое из моноклональных антител к LY75 по настоящему изобретению. Термин "связывается с тем же эпитопом" по отношению к двум или более антителам означает, что антитела конкурируют за связывание с антигеном и связываются с теми же перекрывающимися или охватывающими непрерывными или прерывистыми сегментами из аминокислот. Специалисты в данной области понимают, что фраза "связывается с тем же эпитопом" необязательно означает, что антитела связываются именно с теми же аминокислотами, хотя в одном варианте осуществления она может быть определена таким образом. В другом варианте осуществления точно определенные аминокислоты, с которыми связываются антитела, могут различаться. Например, первое антитело может связываться с сегментом из аминокислот, полностью охватываемых сегментом из аминокислот, с которым связывается второе антитело. В другом примере первое антитело связывается с одним или более сегментами из аминокислот, значительно перекрывающимися с одним или более сегментами, с которыми связывается второе антитело. Для целей данного документа такие антитела считаются "связывающимися с тем же эпитопом".

Соответственно, настоящее изобретение в одном варианте осуществления также охватывает антитела, которые связываются с эпитопом на LY75, включающем в себя весь эпитоп, распознаваемый конкретными антителами, описываемыми в данном документе, или его часть (например, ту же или перекрывающуюся область или область, находящуюся в пределах данной области или охватывающую ее). Настоящее изобретение также охватывает антитела, которые специфично связываются по меньшей мере с одним, например с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, пептидом(ами), выбранными из группы, включающей SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или 37, или их фрагментами, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид, по меньшей мере два или по меньшей мере три пептида, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 27, 29, 30, 34, 35, 36 или 37, или их фрагмента, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по мень-

шей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления эпитоп, распознаваемый антителами по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид, например, один, два или три пептида, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 30, 36 и 37, или их фрагмента, где указанные фрагменты содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных аминокислот.

Настоящее изобретение также охватывает антитела, которые связываются с тем же эпитопом, и/или антитела, которые конкурируют за связывание с LY75 человека с антителами, описанными в данном документе. Антитела, распознающие тот же эпитоп или конкурирующие за связывание, можно идентифицировать с применением стандартных методик. Такие методики включают, например, иммунологический анализ, демонстрирующий способность одного антитела к блокированию связывания другого антитела с целевым антигеном, т.е. анализ конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором исследуемый иммуноглобулин ингибирует специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как LY75. Известно множество типов анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli et al., *Methods in Enzymology*, 9:242 (1983)); твердофазный прямой EIA с использованием комплекса биотин-авидин (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой RIA с мечением с использованием метки 1-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA с использованием комплекса биотин-авидин (Cheung et al., *Virology*, 176:546 (1990)) и прямой RIA с мечением (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Обычно такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченого исследуемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или с клетками, в присутствии исследуемого иммуноглобулина. Исследуемый иммуноглобулин обычно присутствует в избытке. Если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно обычно будет ингибировать специфичное связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-99% или более.

Другие методики включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеновские анализы кристаллов комплексов антиген:антитело, обеспечивающие атомное разрешение эпитопа. В других способах отслеживают связывание антитела с фрагментами антигенов или мутантными вариантами антигенов, где утрата связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается указанием на компонент эпитопа. В дополнение, также можно применять вычислительные комбинаторные способы для картирования эпитопов. Эти способы основаны на способности антител, представляющих интерес, к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных фаг-дисплейных библиотек пептидов. Пептиды затем рассматривают в качестве лидеров для определения эпитопа, соответствующего антителу, применяемому для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, обеспечивают картирование конформационных прерывистых эпитопов.

В конкретном варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим вариabельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2, или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичные им. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание с LY75 с антителом, содержащим вариabельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2 (LY75 A1).

Другие антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом на LY75, распознаваемым антителами, описанными в данном документе. В другом конкретном варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим вариabельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, соответственно приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2, или аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичные им. В другом варианте осуществления антитело связывается с эпитопом на LY75, распознаваемым антителом, содержащим вариabельные области тяжелых и/или легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 1 и 2 (LY75).

Установление характеристик моноклональных антител к LY75.

Моноклональные антитела по настоящему изобретению можно охарактеризовать по связыванию с

LY75 с помощью ряда известных методик. Как правило, антитела вначале характеризуют с помощью ELISA. Вкратце, титрационные микропланшеты можно покрыть очищенным LY75 в PBS, а затем блокировать нерелевантными белками, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), разведенный в PBS. В каждую лунку добавляют разведения плазмы крови мышей, иммунизированных с помощью LY75, и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают с помощью PBS/Tween 20 и затем инкубируют с поликлональным реагентом антителом козы к IgG человека, специфичным к Fc, конъюгированным с щелочной фосфатазой, в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляют с помощью субстрата ABTS и анализируют при OD<sub>405</sub>. Предпочтительно для процедур слияния будут использовать мышей, у которых развиваются наиболее высокие титры.

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

Для очистки антител к LY75 выбранные гибридомы можно выращивать во вращающихся флаконах, двухлитровых вращающихся колбах или других системах культивирования. Образцы надосадочной жидкости можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А на сефарозе (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси) для очистки белка. После замены буфера на PBS концентрацию можно определить по OD<sub>280</sub> с применением коэффициента экстинкции 1,43 или, предпочтительно, с помощью нефелометрического анализа. IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и с помощью антиген-специфического способа.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные антитела к LY75 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с помощью коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Связывание биотинилированных mAb можно выявить с помощью зонда, меченного стрептавидином. Для определения изотипа очищенных антител можно проводить изотипирующий ELISA с применением методик, принятых в данной области техники.

Например, лунки титрационных микропланшетов можно покрыть 10 мкг/мл антитела к Ig на ночь при 4°C. После блокирования с помощью 5% BSA в планшетах проводят реакцию с 10 мкг/мл моноклональных антител или очищенных изотипических контролей при окружающей температуре в течение 2 ч. В лунках затем можно провести реакцию с конъюгированными зондами, специфичными к IgG1 или другим изотипам. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими LY75, можно применять проточную цитометрию. Вкратце, линии клеток и/или PBMC человека, экспрессирующие мембраносвязанный LY75 (выращиваемые в стандартных условиях роста), смешивают с моноклональными антителами в различных концентрациях в PBS, содержащем 0,1% BSA при 4°C, в течение 1 ч. После промывания проводят реакцию клеток с антителом к IgG, меченным флуоресцеином, в тех же условиях, что и при окрашивании первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью прибора FACScan с использованием свойств светорассеяния и бокового рассеяния для введения логического ограничения по отдельным клеткам и определения связывания меченых антител. Можно применять альтернативный анализ с применением флуоресцентной микроскопии в дополнение к анализу по методу проточной цитометрии или вместо него. Клетки можно окрашивать в точности так, как описано выше, и изучать с помощью флуоресцентной микроскопии. Данный способ обеспечивает визуализацию отдельных клеток, но может иметь сниженную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

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

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

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

Предпочтительно антитело по настоящему изобретению связывается с белком LY75 с  $K_D$   $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $2 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $5 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $4 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с белком LY75 с



$K_D$   $3 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $2 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с белком LY75 с  $K_D$   $5 \times 10^{-10}$  М или менее или связывается с белком LY75 с  $K_D$   $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению конкурируют (например, перекрестно конкурируют) за связывание с LY75 с конкретными антителами к LY75, описанными в данном документе (например, LY75 A1). Такие конкурирующие антитела можно идентифицировать на основании их способности к конкурентному ингибированию связывания одного или более mAb с LY75 в стандартных анализах связывания с LY75. Например, можно применять стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок LY75 человека иммобилизован на планшете, одно из антител является флуоресцентно меченным, и оценивается способность немеченых антител к выведению меченого антитела из конкуренции за связывание. Дополнительно или в альтернативном случае можно применять анализ ВІАсоге для оценки способности антител к перекрестной конкуренции. Способность исследуемого антитела к ингибированию связывания антитела к LY75 по настоящему изобретению с LY75 человека демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с LY75 человека.

В одном варианте осуществления конкурирующее антитело представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом на LY75 человека, что и конкретные моноклональные антитела к LY75, описанные в данном документе (например, LY75 A1). Стандартные методики картирования эпитопов, такие как рентгеновская кристаллография и 2-мерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса, можно применять для определения того, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

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

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

Картирование эпитопов, например, описанное в Champe et al. (1995), *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394, можно проводить для определения того, связывается ли антитело с эпитопом, представляющим интерес. "Аланин-сканирующий мутагенез", описанный в Cunningham and Wells (1989), *Science*, 244:1081-1085, или какую-либо другую форму точечного мутагенеза аминокислотных остатков в LY75 человека также можно применять для определения функционального эпитопа для антитела к LY75 по настоящему изобретению. В исследованиях мутагенеза, однако, также могут выявлять аминокислотные остатки, критически важные для общей трехмерной структуры LY75, но непосредственно не участвующие в контактах антитела и антигена, и поэтому для подтверждения функционального эпитопа, определяемого с помощью данного способа, могут быть необходимы другие способы.

Эпитоп, с которым связывается специфичное антитело, также можно определить путем оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты LY75 человека. Ряд перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательность LY75, можно синтезировать и подвергать скринингу с выявлением связывания, например, в прямом ELISA, конкурентном ELISA (где пептид оценивают по его способности к предотвращению связывания антитела с LY75, связанным с лункой титрационного микропланшета) или на чипе. Такие способы скрининга пептидов могут быть неспособными выявить некоторые прерывистые функциональные эпитопы, т.е. функциональные эпитопы, содержащие аминокислотные остатки, не являющиеся смежными вдоль первичной последовательности полипептидной цепи LY75.

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, также можно определить с помощью структурных способов, таких как рентгеновское определение структуры кристаллов (например, WO 2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), в том числе определение скоростей обмена H-D с помощью ЯМР для активных атомов водорода в амидной группе LY75 в свободном состоянии и связанного в комплекс с антителом, представляющим интерес (Zinn-Justin et al. (1992), *Biochemistry*, 31, 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993), *Biochemistry*, 32, 6884-6891).

Что касается рентгеновской кристаллографии, кристаллизацию можно осуществлять с помощью любого из способов, известных из уровня техники (например, Giese et al. (1994), *Acta Crystallogr. D* 50:339-350; McPherson (1990), *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), в том числе метода микросерий (например, Chayen (1997), *Structure*, 5:1269-1274), метода висячей капли посредством диффузии в парах (например, McPherson (1976), *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), затравливания и диализа. Желательно применять белковый препарат, имеющий концентрацию по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/мл. Наилучшей кристаллизации можно достичь в осаждающем растворе, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (PEG; средняя молекулярная масса варьирует в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да, предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно составляет приблизительно 6000 Да, при этом концентрации варьируют в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 30% (вес/об.)). Также может быть желательным включение стабилизатора белка, например глицерина, в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 20%. В осаждающем растворе также может быть желательной подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, предпочтительно в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мМ. Осадитель предпочтительно забуферен до pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, применимые в осаждающем растворе, могут различаться и хорошо известны из уровня техники (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994), Springer-Verlag, New York). Примеры применимых буферов включают, без ограничений, HEPES, Tris, MES и ацетат. Кристаллы могут расти в широком диапазоне температур, в том числе при 2, 4, 8 и 26°C.

Кристаллы комплексов антитело:антиген можно изучать с помощью хорошо известных методик рентгеновской дифракции и можно детализировать с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяемого Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell & Johnson (1985), *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикацию заявки на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993), *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997), *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000), *Acta Cryst.* D56:1313-1323), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Конкурентные анализы антител, описанные в данном документе, можно применять для определения того, связывается ли антитело "с тем же эпитопом", что и другое антитело. Как правило, конкуренция, составляющая 50% или более, 60% или более, 70% или более, как, например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более антитела, о котором известно, что оно взаимодействует с эпитопом, со вторым антителом в условиях, в которых второе антитело находится в избытке, а первое насыщает все участки, свидетельствует о том, что антитела "связываются с тем же эпитопом". Для оценки уровня конкуренции между двумя антителами можно применять, например, радиоиммунологические анализы или анализы с использованием других меток для антител. Например, антиген LY75 можно инкубировать с насыщающим количеством первого антитела к LY75 или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированных с соединением-меткой (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ , биотином или рубидием), в присутствии такого же количества второго немеченого антитела к LY75.

Затем оценивают количество меченого антитела, связывающегося с антигеном в присутствии немеченого блокирующего антитела, и сравнивают со связыванием в отсутствие немеченого блокирующего антитела. Конкуренцию определяют по процентному изменению сигналов связывания в присутствии немеченого блокирующего антитела по сравнению с отсутствием блокирующего антитела.

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

Модификации антител.

В настоящем изобретении дополнительно представлены варианты антител, иногда также называемые "производными антител" или "аналогами антител". Иными словами, существует ряд модификаций, которые можно производить в отношении антител по настоящему изобретению, включающих, без ограничений, аминокислотные модификации CDR (созревание аффинности), аминокислотные модификации каркасных областей, аминокислотные модификации Fc-области, варианты гликозилирования, ковалентные модификации других типов (например, для присоединения конъюгированных лекарственных средств и т.п.).

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

Дополнительно, указанная замена может представлять собой замену на встречающуюся в природе либо не встречающуюся в природе аминокислоту.

В целом, варианты могут включать любое количество модификаций, при условии, что функция антитела будет по-прежнему присутствовать, как описано в данном документе. Иными словами, в случае LY75 A1, например, антитело должно по-прежнему специфично связываться с LY75 человека. Аналогично, если аминокислотные варианты получают с Fc-областью, например, то варианты антител должны сохранять функции связывания с рецепторами, необходимые для конкретного применения антитела или показания к нему.

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

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

Следует отметить, что ряд аминокислотных модификаций может находиться в функциональных доменах: например, может быть желательным наличие 1-5 модификаций в Fc-области белков дикого типа или сконструированных белков, а также от 1 до 5 модификаций в Fv-области, например. Вариант полипептидной последовательности предпочтительно будет обладать по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с исходными последовательностями (например, вариабельными областями, константными областями и/или последовательностями тяжелых и легких цепей и/или CDR LY75 A1). Следует отметить, что в зависимости от размера последовательности процентная идентичность будет зависеть от количества аминокислот.

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

Под "исходным полипептидом", "исходным белком", "полипептидом-предшественником" или "белком-предшественником", используемым в данном документе, подразумевается немодифицированный полипептид, который впоследствии модифицируют с получением варианта. Как правило, исходные полипептиды в данном документе представляют собой LY75 A1. Соответственно, под "исходным антителом", используемым в данном документе, подразумевается антитело, которое модифицируют с получением варианта антитела.

Под "диким типом", или "WT", или "нативным" в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность, обнаруживаемая в природе, в том

числе аллельные варианты. Белок, полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG и т.п. WT имеют аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

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

В некоторых вариантах осуществления в одной или более CDR LY75 A1 производят одну или более аминокислотных модификаций. Как правило, в любой отдельной CDR заменяют только 1, или 2, или 3 аминокислоты, и в наборе из 6 CDR обычно производят не более 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изменений.

Однако следует понимать, что любую комбинацию из отсутствия замен, 1, 2 или 3 замен в любой CDR можно независимо и необязательно сочетать с любой другой заменой. Будет очевидно, что замены можно производить в любой из 6 CDR. В одном варианте осуществления замены производят в CDR1 тяжелых и/или легких цепей.

В некоторых случаях аминокислотные модификации в CDR называют "созреванием аффинности".

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

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

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

Таким образом, в определение CDR и антител по настоящему изобретению включены варианты CDR и антител; иными словами, антитела по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные модификации в одной или более CDR LY75 A1. В дополнение, как вкратце изложено ниже, аминокислотные модификации можно также независимо и необязательно производить в любой области за пределами CDR, в том числе в каркасных и константных областях, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела к LY75 по настоящему изобретению содержат вариант Fc-домена. Как известно в данной области техники, Fc-область антитела взаимодействует с рядом Fc-рецепторов и лигандов, придавая целый ряд важных функциональных способностей, называемых эффекторными функциями. Эти Fc-рецепторы включают, без ограничений, (у людей) FcγRI (CD64), в том числе изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), в том числе изоформы FcγRIIa (в том числе аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (в том числе FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), в том числе изоформы FcγRIIIa (в том числе аллотипы V158 и F158, уязвимые с антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)) и FcγRIIIb (в том числе аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2), FcRn (неонатальный рецептор), C1q (белок системы комплемента, участвующий в комплементзависимой цитотоксичности (CDC)) и FcRn (неонатальный рецептор, участвующий в регуляции периода полувыведения из сыворотки крови). Подходящие модификации можно производить в одном или более положениях, как в целом изложено, например, в заявке на патент США 11/841654 и литературных источниках, упоминаемых там, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341769, патентах США № 6737056, 7670600, 6086875, все из которых явным образом включены посредством ссылки во всей своей полноте, в частности, что касается конкретных аминокислотных замен, повышающих связывание с Fc-рецепторами.

В дополнение к модификациям, изложенным выше, можно производить другие модификации. Например, молекулы можно стабилизировать путем включения в их состав дисульфидных мостиков, свя-

зываются  $V_H$ - и  $V_L$ -домены (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, включенный посредством ссылки во всей своей полноте).

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

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

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

Цистеинильные остатки чаще всего подвергаются реакции с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также можно дериватизировать посредством реакции с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-имидазолил)пропионой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, p-хлорортутьбензоатом, 2-хлорортуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом и т.п.

Гистидильные остатки дериватизируют посредством реакции с диэтилпироксикарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку данное средство является относительно специфичным к боковой цепи гистидила. Также применимым является пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

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

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

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

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

Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания антител с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью для применения в ряде способов в дополнение к способам, описанным ниже. Широко используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид,

N-Гидрокси-сукцинимидные сложные эфиры, например, сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидоэфиры, включающие дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитио-бис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватизирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]-пропиоимидат, обеспечивают получение фотоактивируемых промежуточных соединений, способных образовывать поперечные связи в присутствии света. В альтернативном случае для иммобилизации белков используют реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активированные бромистым цианогеном углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, все из которых включены посредством ссылки

ки во всей своей полноте.

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

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

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

Биспецифические молекулы.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены биспецифические молекулы, содержащие антитело к LY75 или его фрагмент по настоящему изобретению. Антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающие части можно дериватизировать или связать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора), с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или целевыми молекулами. Антитело по настоящему изобретению в действительности можно дериватизировать или связать более чем с одной другой функциональной молекулой с получением полиспецифических молекул, связывающихся более чем с двумя различными участками связывания и/или целевыми молекулами; такие полиспецифические молекулы также подразумеваются как охватываемые термином "биспецифическая молекула", используемым в данном документе. Для получения биспецифической молекулы по настоящему изобретению можно образовать функциональную связь антитела по настоящему изобретению (например, посредством соединения химическим путем, слияния генов, нековалентного объединения или иным способом) с одной или более другими связывающимися молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, в результате чего получают биспецифическую молекулу.

Соответственно, настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере один первый фактор специфичности связывания с первым целевым эпитопом (т.е. LY75) и второй фактор специфичности связывания со вторым целевым эпитопом. Второй целевой эпитоп может присутствовать на том же целевом белке, что и связываемый с первым фактором специфичности связывания; или второй целевой эпитоп может присутствовать на целевом белке, отличном от связываемого первого белка, который связывается с первым фактором специфичности связывания. Второй целевой эпитоп может присутствовать на той же клетке, что и первый целевой эпитоп (т.е. LY75); или второй целевой эпитоп может присутствовать на целевой молекуле, не представленной на клетке, на которой представлен первый целевой эпитоп. Используемый в данном документе термин "фактор специфичности связывания" относится к компоненту, содержащему по меньшей мере один вариативный домен антитела.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения второй целевой эпитоп представляет собой Fc-рецептор, например Fc $\gamma$ RI (CD64) человека или Fc $\alpha$ -рецептор (CD89) человека. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, способные к связыванию с эффекторными клетками, экспрессирующими как Fc $\gamma$ R, так и Fc $\alpha$ R (например, с моноцитами, макрофагами или полиморфноядерными клетками (PMN)), и с целевыми клетками, экспрессирующими LY75. Эти биспецифические молекулы направляют клетки, экспрессирующие LY75, к эффекторным клеткам и запускают виды активности эффекторных клеток, опосредованные Fc-рецепторами, такие как фагоцитоз клеток, экспрессирующих LY75, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), высвобождение цитокинов или образование супероксид-аниона.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения второй целевой эпитоп представляет собой CD3 или CD5. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, способные к связыванию с эффекторными клетками, экспрессирующими как CD3, так и CD5 (например, цитотоксическими Т-клетками, экспрессирующими CD3 или CD5), и с целевыми клетками, экспрессирующими LY75. Эти биспецифические молекулы направляют клетки, экспрессирующие LY75, к эффекторной клетке и запускают виды активности эффекторных клеток, опосредованные CD3 или CD5, такие как клональная экспансия Т-клеток и Т-клеточная цитотоксичность. В этом варианте осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению может иметь в общей сложности два либо три вариативных домена антитела, где первая часть биспецифического антитела способна мобилизовать активность иммунной эффекторной клетки человека путем специфичного связывания с эффекторным антигеном, расположенным на иммунной эффекторной клетке человека, при этом эффекторный антиген представляет собой антиген CD3 человека или антиген CD5 человека, при этом указанная первая часть

содержит один вариабельный домен антитела, а вторая часть биспецифического антитела способна к специфичному связыванию с целевым антигеном, отличным от эффекторного антигена, например, LY75, при этом указанный целевой антиген расположен на целевой клетке, отличной от указанной иммунной эффекторной клетки человека, и указанная вторая часть содержит один или два вариабельных домена антитела.

В варианте осуществления настоящего изобретения, в котором биспецифическая молекула является полиспецифической, молекула может дополнительно содержать третий фактор специфичности связывания в дополнение к фактору специфичности связывания с Fc-рецептором или фактору специфичности

связывания с CD3 или CD5 и фактору специфичности связывания с LY75. В одном варианте осуществления третий фактор специфичности связывания представляет собой часть антитела к фактору усиления (EF), например, молекулу, которая связывается с поверхностным белком, участвующим в цитотоксической активности, и, таким образом, повышает иммунный ответ против целевой клетки. "Часть антитела к фактору усиления" может представлять собой антитело, функциональный фрагмент антитела или лиганд, которые связываются с указанной молекулой, например, антигеном или рецептором, и, таким образом, приводят к усилению эффекта детерминант связывания для Fc-рецептора или антигена целевой клетки. "Часть антитела к фактору усиления" может связываться с Fc-рецептором или антигеном целевой клетки. В альтернативном случае часть антитела к фактору усиления может связываться с объектом, отличным от объекта, с которым связываются первый и второй факторы специфичности связывания. Например, часть антитела к фактору усиления может связываться с цитотоксической Т-клеткой, например, посредством CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1, или с другой иммунной клеткой, что приводит к повышению иммунного ответа против целевой клетки.

В одном варианте осуществления биспецифические молекулы по настоящему изобретению содержат в качестве фактора специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент этого антитела, включающий, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легких цепей или тяжелых цепей или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструктор, описанный в патенте США № 4946778, содержание которого явным образом включено посредством ссылки.

В одном варианте осуществления специфичность связывания с Fcγ-рецептором обеспечивается моноклональным антителом, связывание которого не блокируется иммуноглобулином G человека (IgG). Как используется в данном документе, термин "рецептор IgG" относится к любому из восьми генов цепи, локализованных в хромосоме 1. Эти гены кодируют в общей сложности

двенадцать трансмембранных или растворимых изоформ рецепторов, распределенных на три класса Fcγ-рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). В одном предпочтительном варианте осуществления Fcγ-рецептор представляет собой высокоаффинный FcγRI человека. FcγRI человека представляет собой молекулу размером 72 кДа, демонстрирующую высокую аффинность к мономерному IgG ( $10^8$ - $10^9$  M<sup>-1</sup>).

Получение и установление характеристик некоторых предпочтительных моноклональных антител к Fcγ описано в публикации по РСТ WO 88/00052 и в патенте США № 4954617, идеи которых в полной мере включены в данный документ посредством ссылки. Эти антитела связываются с эпитопом FcγRI, FcγRII или FcγRIII в участке, отличающемся от участка связывания Fcγ-рецептора, и поэтому блокирование их связывания физиологическими уровнями IgG является незначительным. Конкретные антитела к FcγRI, применимые в настоящем изобретении, представляют собой mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 и mAb 197. Гибридома, образующая mAb 32, доступна из Американской коллекции типовых культур, № доступа в ATCC HB9469. В других вариантах осуществления антитело к Fcγ-рецептору является гуманизированной формой моноклонального антитела 22 (H22). Получение и установление характеристик антитела H22 описано в Graziano, R.F. et al. (1995), J. Immunol. 155 (10):4996-5002 и публикации по РСТ WO 94/10332. Линия клеток, образующих антитело H22, была депонирована в Американской коллекции типовых культур под обозначением HA022CL1 и имеет номер доступа CRL 11177.

В еще других предпочтительных вариантах осуществления специфичность связывания с Fc-рецептором обеспечивается антителом, которое связывается с рецептором IgA человека, например, с Fc-альфа-рецептором [FcαRI (CD89)], связывание с которым предпочтительно не блокируется иммуноглобулином A (IgA) человека. Термин "рецептор IgA" подразумевается как включающий продукт гена одного α-гена (FcαRI), локализованного в хромосоме 19. Этот ген, как известно, кодирует несколько подвергнутых альтернативному сплайсингу трансмембранных изоформ размером 55-110 кДа. FcαRI (CD89) характеризуется конститутивной экспрессией на моноцитах/макрофагах, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитах, но не в популяциях неэффекторных клеток. FcαRI обладает средней аффинностью ( $\approx 5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>) как к IgA1, так и к IgA2, которая повышается при воздействии цитокинов, таких как G-CSF или GM-CSF [Morton, H.C. et al. (1996), Critical Reviews in Immunology 16:423-440]. Были описаны четыре специфичных к FcαRI моноклональных антител, идентифицированных как A3, A59, A62 и A77, которые связываются с FcαRI за пределами лиганд-связывающего домена для IgA [Monteiro, R.C. et al. (1992), J. Immunol. 148:1764].

Fc $\alpha$ RI и Fc $\gamma$ RI являются предпочтительными запускающими рецепторами для применения с биспецифическими молекулами по настоящему изобретению, поскольку они (1) экспрессируются главным образом на иммунных эффекторных клетках, например, моноцитах, PMN, макрофагах и дендритных клетках; (2) экспрессируются на высоких уровнях (например, 5000-100000 на клетку); (3) являются медиаторами видов цитотоксической активности (например, ADCC, фагоцитоза) и (4) опосредуют улучшенную презентацию антигена для антигенов, в том числе аутоантигенов, направленных к ним.

Антитела, которые можно использовать в биспецифических молекулах по настоящему изобретению, являются мышиными, человеческими, химерными и гуманизированными моноклональными антителами.

Биспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать путем конъюгирования составляющих факторов специфичности связывания, например факторов специфичности связывания с FcR, CD3, CD5 и LY75, с применением способов, известных из уровня техники. Например, факторы специфичности связывания каждой биспецифической молекулы можно получить в отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Если факторы специфичности связывания представляют собой белки или пептиды, то для ковалентного конъюгирования можно применять ряд средств сочетания или сшивающих средств. Примеры сшивающих средств включают белок A, карбодимид,

N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) [см., например, Karpovsky et al. (1984), J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M.A. et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8648]. Другие способы включают описанные в Paulus (1985), Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985), Science, 229:81-83, и Glennie et al. (1987), J. Immunol. 139:2367-2375. Предпочтительными конъюгирующими средствами являются SATA и сульфо-SMCC, оба из которых доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

Если факторы специфичности связывания представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы посредством образования связей между сульфгидрильными группами С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте осуществления шарнирную область модифицируют с тем, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один, перед конъюгированием.

В альтернативном случае оба фактора специфичности связывания могут кодироваться в одном и том же векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно применим, если биспецифическая молекула представляет собой mAb  $\times$  mAb, mAb  $\times$  Fab, Fab  $\times$  F(ab')<sub>2</sub> или лиганд  $\times$  белок слияния на основе Fab. Биспецифическая молекула по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858, все из которых явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела по настоящему изобретению могут быть биспецифическими активаторами Т-клеток (BiTE). BiTE представляют собой класс искусственных биспецифических моноклональных антител. Они управляют иммунной системой реципиента, более конкретно, цитотоксической активностью Т-клеток в отношении раковых клеток. BiTE обычно представляют собой белки слияния, содержащие два одноцепочечных вариабельных фрагмента (scFv) различных антител, или аминокислотные последовательности с четырех различных генов, в одной пептидной цепи, предпочтительно размером приблизительно 55 килодальтон. Предпочтительно один из scFv связывается с Т-клетками посредством CD3-рецептора, а другой - с опухолевой клеткой посредством опухолеспецифичной молекулы.

Связывание биспецифических молекул с их специфичными мишенями можно подтвердить с помощью, например, твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), радиоиммунологического анализа (RIA), FACS-анализа, биологического анализа (например, ингибирования роста) или вестерн-блот-анализа. В каждом из этих анализов обычно выявляют наличие комплексов белок-антитело, представляющих особенный интерес, путем использования меченого реагента (например, антитела), специфичного к комплексу, представляющему интерес. Например, комплексы FcR-антитело можно выявить с помощью, например, меченных ферментом антитела или фрагмента антитела, которые распознают комплексы антитело-FcR и специфично связываются с ними. В альтернативном случае комплексы можно выявить с помощью любого из ряда других иммунологических анализов. Например, антитело можно метить радиоактивным изотопом и применять в радиоиммунологическом анализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, включенный в данный документ посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно выявить с помощью таких способов, как применение счетчика  $\gamma$ -излучения или сцинтилляционного счетчика, или путем автордиографии.



Гликозилирование.

Другим типом ковалентной модификации являются изменения гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, можно модифицировать с тем, чтобы они содержали одну или более сконструированных гликоформ. Под "сконструированной гликоформой", как используется в данном документе, подразумевается углеводная композиция, ковалентно присоединенная к антителу, где углеводная композиция по химическому составу отличается от таковой у исходного антитела. Сконструированные гликоформы могут быть применимыми для ряда целей, включающих, без ограничений, усиление или ослабление эффекторной функции. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело, не имеющее гликозилирования). Гликозилирование можно изменить для, например, повышения аффинности антитела к антигену. Такие углеводные модификации можно осуществить путем, например, изменения одного или более участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно произвести одну или более аминокислотных замен, приводящих к устранению одного или более участков гликозилирования каркасного участка варибельной области с устранением, таким образом, гликозилирования в этом участке. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход более подробно описан в патентах США № 5714350 и 6350861 Со и соавт. и может осуществляться путем удаления аспарагина в положении 297.

Предпочтительной формой сконструированной гликоформы является афукозилирование, которое, как было показано, коррелирует с усилением функции ADCC, предположительно посредством прочного связывания с FcγRIIIa-рецептором. В данном контексте "афукозилирование" означает, что большинство антител, образующихся в клетках-хозяевах, практически лишены фукозы, например 90-95-98% полученных антител не имеют значительного количества фукозы в качестве составляющей углеводного компонента антитела (обычно присоединенного в N297 в Fc-области). Согласно функциональному определению афукозилированные антитела обычно проявляют по меньшей мере 50% или более высокую аффинность к FcγRIIIa-рецептору.

Сконструированные гликоформы могут быть получены рядом способов, известных из уровня техники (Umaña et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; US 6602684; USSN 10/277370; USSN 10/113929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте; технология POTELLIGENT® [Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси]; инженерная технология гликозилирования GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Цюрих, Швейцария]). Многие из этих методик основаны на регуляции уровня фукозилированных и/или имеющих N-ацетилглюкозамин в точках ветвления олигосахаридов, ковалентно присоединенных к Fc-области, например, путем экспрессии IgG в различных организмах или линиях клеток, сконструированных или иных (например, в клетках CHO Lec-13 или клетках гибридомы крысы YB2/0), путем регуляции активности ферментов, участвующих в пути гликозилирования (например, FUT8 [ $\alpha$ -1,6-фукозилтрансферазы] и/или  $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III [GnTIII]) или путем модификации углевода(углеводов) после экспрессии IgG. Например, технология "антител, получаемых с использованием инженерии сахаров" или "SEA" Seattle Genetics функционирует путем добавления модифицированных сахаридов, ингибирующих фукозилирование в ходе образования; см., например, US2009/0317869, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. "Сконструированная гликоформа" обычно относится к другому углеводу или олигосахариду по сравнению с антителом, полученным при отсутствии технологии гликозилирования; таким образом, антитело может содержать сконструированную гликоформу.

В альтернативном случае сконструированная гликоформа может относиться к варианту IgG, содержащему другой углевод или олигосахарид. Как известно из уровня техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных гликозилируемых аминокислотных остатков, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в которых образуется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно является N-сцепленным или O-сцепленным, N-сцепленное относится к присоединению углеводного компонента к боковой цепи аспарагинового остатка. Последовательности трипептидов аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих последовательностей трипептидов в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-сцепленное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно применять 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление участков гликозилирования к антителу в целях удобства осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных последовательностей трипептидов (для участков N-сцепленного гликозилирования). Изменения также можно производить путем добавления одного или более сериновых или треониновых остатков

к исходной последовательности или замены на них (для участков O-сцепленного гликозилирования). Для простоты аминокислотную последовательность антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях, так что получают кодоны, транслируемые в желаемые аминокислоты.

Другими способами увеличения количества углеводных компонентов в антителе являются соединения гликозидов с белком химическим или ферментативным путем. Эти процедуры являются преимущественными, поскольку они не требуют получения белка в клетке-хозяине, обладающей возможностями гликозилирования для N- и O-сцепленного гликозилирования. В зависимости от применяемого способа соединения сахар(сахара) могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как у цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как у серина, треонина или гидроксипролина, (e) остаткам ароматических аминокислот, таких как у фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина.

Эти способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306, оба из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Удаление углеводных компонентов, присутствующих в исходном антителе (например, посттрансляционное), можно осуществлять химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединением трифторметансульфоновой кислотой или эквивалентным соединением. Данная обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя при этом полипептид нетронутым. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, и в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131, оба из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Ферментативное отщепление углеводных компонентов от полипептидов можно осуществлять путем применения ряда эндо- и экзогликозидаз, описанных в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, включенном посредством ссылки во всей своей полноте, включая удаление остатков фукозы с применением фермента фукозидазы, известного из уровня техники. Гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно предотвратить путем применения соединения туникамина, описанного в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, включенном посредством ссылки во всей своей полноте. Туникамин блокирует образование N-гликозидных связей с белком.

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

В дополнительных вариантах осуществления, например, в случае применения антител по настоящему изобретению в целях диагностики или выявления, антитела могут содержать метку. Под "меткой" в данном документе подразумевается, что соединение имеет по меньшей мере один элемент, изотоп или химическое соединение, присоединенные для обеспечения выявления соединения. Как правило, метки подразделяются на три класса: а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы; b) магнитные, электрические, температурные метки и c) цветные или люминесцентные красители; хотя метки также включают ферменты и частицы, такие как магнитные частицы. Предпочтительные метки включают, без ограничений, флуоресцентные комплексы лантаноидов (в том числе европия и тербия) и флуоресцентные метки, включающие, без ограничений, квантовые точки, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, люциферовый желтый, Cascade синий, тexasский красный, красители Alexa, циановые красители и другие, описанные в 6-м издании Molecular Probes Handbook под редакцией Richard P. Haugland, явным образом включенном в данный документ посредством ссылки.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

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

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

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

Лекарственные средства для применения в настоящем изобретении включают цитотоксические лекарственные средства, в частности, применяемые для терапии рака. Такие лекарственные средства включают, как правило, средства, повреждающие ДНК, антиметаболиты, натуральные продукты и их аналоги. Иллюстративные классы цитотоксических средств включают ингибиторы ферментов, такие как ингибиторы дигидрофолатредуктазы и ингибиторы тимидилатсинтазы, ДНК-интеркаляторы, средства, расщепляющие ДНК, ингибиторы топоизомеразы, лекарственные средства семейства антрациклинов, лекарственные средства из барвинка, митомицины, блеомицины, цитотоксические нуклеозиды, лекарственные средства семейства птеридинов, диинены, подофиллотоксины, доластатины, майтанзиноиды, индукторы дифференцировки и таксолы.

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

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

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

#### Майтанзиноиды.

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

Иллюстративные майтанзиноидные компоненты-лекарственные средства включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, такие как C-19-дехлорпроизводные (патент США № 4256746) (получаемые посредством восстановления ансамитоцина P2 альюмогидридом лития); C-20-гидрокси- (или C-20-деметил-) +/- C-19-дехлорпроизводные (патенты США № 4361650 и 4307016) (получаемые путем деметилирования спомощью Streptomycus или Actinomycus или дехлорирования с помощью LAN) и C-20-деметокси-, C-20-ациллокси- (-OCOR) +/-дехлорпроизводные (патент США № 4294757) (получаемые путем ацилирования с помощью хлорангидридов), и те, которые имеют моди-

фикации в других положениях.

Иллюстративные майтанзиноидные компоненты-лекарственные средства также включают те, которые имеют такие модификации, как С-9-SH (патент США № 4424219) (получаемые посредством реакции майтанзинола с H<sub>2</sub>S или P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); С-14-алкоксиметил(деметокси/CH<sub>2</sub>OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH или CH<sub>2</sub>OAc) (патент США № 4450254) (получаемые из *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (получаемые путем превращения майтанзинола под действием *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США № 4313946 и 4315929) (выделяемые из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США № 4362663 и 4322348) (получаемые путем деметилирования майтанзинола под действием *Streptomyces*) и 4,5-дезокси (патент США № 4371533) (получаемые путем восстановления майтанзинола трихлоридом титана/LAH).

Особенную применимость имеют DM1 (раскрытый в патенте США № 5208020, включенном посредством ссылки) и DM4 (раскрытый в патенте США № 7276497, включенном посредством ссылки). См. также ряд дополнительных майтанзиноидных производных и способов в 5416064, WO 01/24763, 7303749, 7601354, USSN 12/631508, WO 02/098883, 6441163, 7368565, WO02/16368 и WO 04/1033272, все из которых явным образом включены посредством ссылки во всей своей полноте.

ADC, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США № 5208020; 5416064; 6441163 и европейском патенте EP 0425235 B1, раскрытия которых явным образом включены в данный документ посредством ссылки. В Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623 (1996), описаны ADC, содержащие майтанзиноид, обозначенный как DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против рака ободочной и прямой кишки человека.

Было обнаружено, что конъюгат является весьма цитотоксическим в отношении культивируемых раковых клеток толстой кишки и демонстрирует противоопухолевую активность в анализе роста опухоли *in vivo*.

В Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описаны ADC, в которых майтанзиноид был конъюгирован с помощью дисульфидного линкера с мышинным антителом A7, связывающимся с антигеном в линиях раковых клеток толстой кишки, или с другим мышинным моноклональным антителом TA.1, которое связывается с онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичность конъюгата TA.1-майтанзиноид исследовали *in vitro* в линии раковых клеток молочной железы человека SK-BR-3, в которой экспрессируется 3×10<sup>5</sup> поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгированное лекарственное средство достигало степени цитотоксичности, сходной с таковой у свободного майтанзиноидного лекарственного средства, которую можно повысить путем увеличения количества молекул майтанзиноидов на молекулу антитела. Конъюгат A7-майтанзиноид демонстрировал низкую системную цитотоксичность у мышей.

Ауристатины и доластатины.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело к LY75, конъюгированное с доластатинами или пептидными аналогами доластатин и их производными ауристатинами (патенты США № 5635483; 5780588). Было показано, что доластатины и ауристатины нарушают динамические свойства микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки (Woyke et al., (2001), Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой (патент США № 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al., (1998), Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Компонент-лекарственное средство доластатин или ауристатин может быть присоединен к антителу через N-конец (амино-) или C-конец (карбоксильный) пептидного компонента-лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связанные через N-конец монометилауристатиновые компоненты-лекарственные средства DE и DF, раскрытые в Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, опубликованном 28 марта 2004 г., и описанные в публикации заявки на патент США № 2005/0238648, раскрытие которой явным образом включено посредством ссылки во всей своей полноте.

Иллюстративный вариант осуществления ауристатина представляет собой MMAE (показан на фигуре 10, где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство; см. патент США № 6884869, явным образом включенный посредством ссылки во всей своей полноте).

Другой иллюстративный вариант осуществления ауристатина представляет собой MMAF, показанный на фигуре 10, где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к линкеру (L) конъюгата антитело-лекарственное средство (US 2005/0238649, 5767237 и 6124431, явным образом включенные посредством ссылки во всей своей полноте).

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления, содержащие MMAE или MMAF и различные линкерные составляющие (дополнительно описанные в данном документе), имеют следующие структуры и сокращения (где Ab означает антитело, р равно от 1 до приблизительно 8).

Обычно пептидные компоненты-лекарственные средства можно получить путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или фрагментами пептидов. Такие пептидные связи можно получить, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза (см. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", vol. 1, p. 76-136, 1965, Academic Press), хорошо известным в области химии пеп-

тидов. Ауристатиновые/доластатиновые компоненты-лекарственные средства можно получить в соответствии со способами из патентов США № 5635483; 5780588; Pettit et al., (1989), J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al., (1998), Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al., (1996), J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863 и Doronina (2003), Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

#### Калихеамицин.

В других вариантах осуществления ADC содержит антитело по настоящему изобретению, конъюгированное с одной или более молекулами калихеамицина. Например, милотарг является первым коммерческим лекарственным средством по типу ADC, и в качестве нагрузки в нем используется калихеамицин  $\gamma 1$  (см. патент США № 4970198, включенный посредством ссылки во всей своей полноте). Дополнительные производные калихеамицина описаны в патентах США № 5264586, 5384412, 5550246, 5739116, 5773001, 5767285 и 5877296, все из которых явным образом включены посредством ссылки. Антибиотики семейства калихеамицинов способны вызывать двухнитевые разрывы ДНК в субпиколярных концентрациях. В отношении получения конъюгатов семейства калихеамицинов см. патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все из которых принадлежат компании American Cyanamid). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно применять, включают, без ограничений,  $\gamma 11$ ,  $\alpha 21$ ,  $\alpha 21$ , N-ацетил- $\gamma 11$ , PSAG и  $\theta 11$  (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым может быть конъюгировано антитело, является QFA, который представляет собой антифолат. Как калихеамицин, так и QFA имеют внутриклеточные места приложения действия и с трудом пересекают плазматическую мембрану. Поэтому поглощение клетками этих средств посредством опосредованной антителами интернализации значительно усиливает их цитотоксические эффекты.

#### Дуокармицины.

CC-1065 (см. 4169888, включенный посредством ссылки) и дуокармицины являются представителями семейства противоопухолевых антибиотиков, используемых в ADC. Эти антибиотики, по видимому, действуют посредством избирательного по последовательности алкилирования ДНК в N3 аденина в малой бороздке, что инициирует каскад событий, приводящих к апоптозу.

Важные представители дуокармицинов включают дуокармицин A (патент США № 4923990, включенный посредством ссылки) и дуокармицин SA (патент США № 5101038, включенный посредством ссылки), а также большое количество аналогов, описанных в патентах США № 7517903, 7691962, 5101038; 5641780; 5187186; 5070092; 5070092; 5641780; 5101038; 5084468, 5475092, 5585499, 5846545, WO2007/089149, WO2009/017394A1, 5703080, 6989452, 7087600, 7129261, 7498302 и 7507420, все из которых явным образом включены посредством ссылки.

#### Пирролобензодиазепины.

Пирролобензодиазепины (PBD) (Journal of Medicinal Chemistry, 2001, 44, 737-748) являются средствами, взаимодействующими с ДНК, которые обладают значительной цитотоксичностью. Было выделено 13 структур из этого семейства, в том числе такие соединения, как антрамицин, мазетрамицин, поротрамицин, протракарцин, сибаномицин, томаимицин, сибиромидин, хикамицин A, неотрамицин A, B и DC-81 (Medicinal Chemistry and Drug Design, ISBN: 978-953-51-0513-8, Ahmed Kamal et al. DOI: 10.5772/38869). Другие аналоги из этого семейства были получены и были конъюгированы с антителами, как описано в патентах № WO 2011/130598 и WO 2011/130616, явным образом включенных посредством ссылки.

#### Другие цитотоксические средства.

Другие противоопухолевые средства, которые могут быть конъюгированы с антителами по настоящему изобретению, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство средств, известных под общим названием "комплекс LL-E33288", описанное в патентах США № 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США № 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно применять, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина А (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает ADC, образующийся между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для избирательного разрушения опухоли антитело может содержать высокорadioактивный атом. Для получения радиоconъюгированных антител доступен ряд радиоактивных изотопов. Примеры включают  $Al^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu.

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в состав конъюгата известными способами. Например, пептид можно получить путем биосинтеза или можно синтезировать путем химического синтеза аминокислот с применением подходящих предшественников аминокислот, содержащих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как Tc<sup>99m</sup> или I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> и In<sup>111</sup>, могут быть присоединены посредством цистеинового остатка в пептиде. Иттрий-90 можно присоединить посредством лизинового остатка. Способ с использованием йодогена (Fraker et al., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) можно применять для включения йода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления промежуточное соединение, представляющее собой предшественник линкера, подвергают реакции с лекарственным средством в соответствующих условиях. В других вариантах осуществления применяют реакционноспособные группы в лекарственном средстве и/или промежуточном соединении. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением, или дериватизированное лекарственное средство, затем подвергают реакции с антителом к LY75 по настоящему изобретению в соответствующих условиях.

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

Линкерные структурные единицы.

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

антах осуществления линкерная структурная единица не является расщепляемой, и лекарственное средство высвобождается, например, посредством разрушения антител в лизосомах.

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

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

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

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

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

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

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

Во многих вариантах осуществления линкер является саморасщепляющимся. Используемый в данном документе термин "саморасщепляющийся спейсер" относится к бифункциональному химическому компоненту, способному к ковалентному соединению двух разнесенных химических компонентов в стабильную молекулу из трех частей. Он будет самопроизвольно отделяться от второго химического компонента при расщеплении его связи с первым компонентом. См., например, WO 2007/059404A2, WO 06/110476A2, WO 05/112919A2, WO 2010/062171, WO 09/017394, WO 07/089149, WO 07/018431, WO 04/043493 и WO 02/083180, которые относятся к конъюгатам лекарственное средство-расщепляемый субстрат, где лекарственное средство и расщепляемый субстрат необязательно связаны с помощью саморасщепляющегося линкера, и все из которых явным образом включены посредством ссылки.

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

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

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

Ряд иллюстративных линкеров, которые можно применять в композициях и способах по настоящему изобретению, описан в WO 2004/010957, публикации заявки на патент США № 2006/0074008, публикации заявки на патент США № 20050238649 и публикации заявки на патент США № 2006/0024317 (каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и во всех отношениях).

Нагрузка лекарственным средством.

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

Также можно определить количественное распределение ADC по  $p$ . В некоторых случаях отделение, очистка однородных ADC, где  $p$  представляет собой определенное значение, от ADC с другой нагрузкой лекарственным средством и установление их характеристик можно осуществлять с помощью таких способов, как электрофорез.

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

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



Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно регулировать различными способами, например, путем (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по сравнению с антителом, (ii) ограничения продолжительности или температуры реакции конъюгирования, (iii) применения условий частичного или ограниченного восстановления для модификации тиольных групп цистеина, (iv) конструирование с помощью рекомбинантных методик аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы модифицировать количество и положение цистеиновых остатков для регулирования количества и/или положения присоединяемых компонентов линкер-лекарственное средство (как, например, в случае тимо-Маб или тимо-Fab, получаемых согласно раскрытому в данном документе и в WO 2006/034488 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте)).

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

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

Способы определения цитотоксического эффекта ADC.

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

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

Для определения цитотоксичности можно измерять некроз или апоптоз (запрограммированную гибель клеток). Некроз обычно сопровождается повышением проницаемости плазматической мембраны; отеком клетки и разрывом плазматической мембраны. Апоптоз обычно характеризуется пузырением мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение любого из этих эффектов в отношении раковых клеток указывает на то, что конъюгат антитело-лекарственное средство является применимым в лечении форм рака.

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

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

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

Апоптоз также можно определить путем измерения морфологических изменений в клетке. Например, как и в случае некроза, утрату целостности плазматической мембраны можно определить путем измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения количества апоптотических клеток был описан в Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, p. 3.17.1-3.17.16). Также можно метить клетки красителем для ДНК (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или йодидом пропидия) и наблюдать в клетках конденсацию хроматина и его краевое расположение

вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые можно измерить для определения апоптоза, включают, например, конденсацию цитоплазмы, повышенное пузырение мембраны и сжатие клетки.

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

*In vivo* эффект терапевтической композиции антитела к LY75 по настоящему изобретению можно оценить в подходящей животной модели. Например, можно применять ксеногенные модели рака, где эксплантаты раковых опухолей или пассированные ксенотрансплантатные ткани вводят животным с ослабленным иммунитетом, таким как "голые" или имеющие SCID мыши (Klein et al., 1997, *Nature Medicine*, 3:402-408). Эффективность можно измерить с помощью анализов, в которых измеряют ингибирование образования опухоли, регрессии опухоли или метастазирования и т.п.

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

Способы получения антител по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно представлены способы получения раскрытых антител к LY75. Эти способы охватывают культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную (выделенные) нуклеиновую(нуклеиновые) кислоту(кислоты), кодирующие антитела по настоящему изобретению. Как будет понятно специалистам в данной области, это можно выполнить рядом способов в зависимости от природы антитела. В некоторых вариантах осуществления в том случае, когда антитела по настоящему изобретению представляют собой традиционные антитела полной длины, например, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи находятся в таких условиях, что антитело образуется и может быть выделено.

Переменные области тяжелых и легких цепей LY75 A1 раскрыты в данном документе (последовательности как белка, так и нуклеиновой кислоты); как будет понятно в данной области, их можно легко увеличить с получением тяжелых и легких цепей полной длины. Иными словами, при наличии фрагментов ДНК, кодирующих V<sub>H</sub>- и V<sub>K</sub>-сегменты, вкратце описанные в данном документе, эти фрагменты ДНК можно подвергнуть дополнительным манипуляциям с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК, например, для превращения генов переменных областей в гены цепей антител полной длины, в гены Fab-фрагментов или в ген scFv. В ходе этих манипуляций образуют функциональную связь фрагмента ДНК, кодирующего V<sub>K</sub> или V<sub>H</sub>, с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Термин "функционально связанный", применяемый в данном контексте, подразумевает как означающий, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую V<sub>H</sub>-область, можно превратить в ген тяжелой цепи полной длины путем образования функциональной связи ДНК, кодирующей V<sub>H</sub> с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Последовательности генов мышинных константных областей тяжелых цепей известны из уровня техники [см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242], и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить путем стандартной ПЦР-амплификации.

Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительно представляет собой константную область IgG1 или IgG4. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента можно образовать функциональную связь ДНК, кодирующей V<sub>H</sub>, с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область C<sub>H1</sub> тяжелой цепи.

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

область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или лямбда-цепи.

Для получения гена scFv образуют функциональную связь фрагментов ДНК, кодирующих  $V_H$ - и  $V_L/V_K$ , с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность  $(Gly_4-Ser)_3$ , так что последовательности  $V_H$  и  $V_L/V_K$  могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, при этом  $V_L/V_K$ - и  $V_H$ -области соединены гибким линкером [см., например, Bird et al. (1988), Science 242:423-426; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990), Nature, 348:552-554].

Обычно представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела по настоящему изобретению. Такие полинуклеотиды кодируют как переменные, так и константные области каждой из тяжелой и легкой цепей, хотя другие комбинации также предусмотрены настоящим изобретением в соответствии с композициями, описанными в данном документе. Настоящее изобретение также предусматривает олигонуклеотидные фрагменты, полученные из раскрытых полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот, комплементарных этим полинуклеотидам.

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

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая(нуклеиновые) кислота(кислоты), кодирующие антитела по настоящему изобретению, включены в состав векторов экспрессии, которые могут быть внехромосомными или предназначенными для интегрирования в геном клетки-хозяина, в которую их вводят. Векторы экспрессии могут содержать любое количество соответствующих регуляторных последовательностей (включающих, без ограничений, последовательности для контроля транскрипции и трансляции, промоторы, сайты связывания рибосомы, энхансеры, точки начала репликации и т.п.) или другие компоненты (селектируемые гены и т.п.), все из которых функционально связаны, как хорошо известно из уровня техники. В некоторых случаях применяют две нуклеиновые кислоты, и каждую помещают в отдельный вектор экспрессии (например, тяжелую цепь в первый вектор экспрессии, легкую цепь во второй вектор экспрессии) или, в альтернативном случае, их можно поместить в один и тот же вектор экспрессии. Специалистам в данной области будет понятно, что конструкция вектора(векторов) экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т.п.

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

Линии клеток млекопитающих, доступных в качестве хозяев для экспрессии, известны из уровня техники и включают большое количество иммортализованных линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC), Манассас, Виргиния, в том числе, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HEK293, клетки NSO, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и множество других линий клеток. Клетки, отличные от клеток млекопитающих, включающие, без ограничений, клетки бактерий, дрожжей, насекомых и растений, также можно применять для экспрессии рекомбинантных антител. В некоторых вариантах осуществления антитела можно получать в трансгенных животных, таких как коровы или куры.

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

Фармацевтические композиции.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая одно или комбинацию из антител к LY75 или их антигенсвязывающих частей

по настоящему изобретению, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут содержать одно или комбинацию из (например, два или более различных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул по настоящему изобретению. Например, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене или которые обладают взаимодополняющими видами активности.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно вводить в ходе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может предусматривать антитело по настоящему изобретению в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым средством или противовоспалительным или иммунодепрессивным средством. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном путям применения антител по настоящему изобретению.

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

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

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

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

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

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среда или средство несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В состав композиций также могут быть включены дополнительные активные

соединения.

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

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

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

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

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

В некоторых способах одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания, и в этом случае доза каждого вводимого антитела входит в указанные

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

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

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

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

Композицию по настоящему изобретению можно вводить посредством одного или более путей введения с помощью одного или более из ряда способов, известных из уровня техники. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будут варьировать в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения антител по настоящему изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение", используемая в данном документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включает, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудную инъекцию и инфузию.

В альтернативном случае антитело по настоящему изобретению можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или чресслизистый путь введения, например,

интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

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

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

В определенных вариантах осуществления моноклональные антитела по настоящему изобретению можно составить для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения BBB терапевтическими соединениями по настоящему изобретению (при желании) их можно составить, например, в липосомах. В отношении способов получения липосом см., например, патенты США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или более компонентов, избирательно транспортируемых в конкретные клетки или органы, что, таким образом, повышает качество целенаправленной доставки лекарственных средств [см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]. Иллюстративные нацеливающие компоненты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016); маннозиды [Umezawa et al. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; антитела [P.G. Bloeman et al. (1995), *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995), *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; рецептор поверхностно-активного белка А [Briscoe et al. (1995), *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269:9090]; см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994), *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994), *Immunomethods*, 4:273.

Пути применения и способы.

Антитела, композиции антител и способы по настоящему изобретению обладают многочисленными видами диагностической и терапевтической полезности *in vitro* и *in vivo*, включающими диагностику и лечение нарушений, опосредованных LY75.

В некоторых вариантах осуществления эти молекулы можно вводить в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo* или субъектам-людям, например, *in vivo*, для лечения, предупреждения и диагностики ряда нарушений. Используемый в данном документе термин "субъект" подразумевается как включающий человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, земноводные и пресмыкающиеся. Предпочтительные субъекты включают пациентов-людей, имеющих нарушения, опосредованные активностью LY75. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, имеющих нарушение, ассоциированное с аномальной экспрессией LY75. Если антитела к LY75 вводят вместе с другим средством, то эти два средства можно вводить в любом порядке или одновременно.

С учетом специфичного связывания антител по настоящему изобретению с LY75 антитела по настоящему изобретению можно применять для специфичного выявления экспрессии LY75 на поверхности клеток и, более того, можно применять для очистки LY75 посредством иммуноаффинной очистки.

Кроме того, с учетом экспрессии LY75 на опухолевых клетках антитела, композиции антител и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта с онкогенным нарушением, например, нарушением, характеризующимся наличием опухолевых клеток, экспрессирующих LY75, или в производстве лекарственного препарата для лечения такого нарушения, включающего, например, рак желудка, рак почки, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, в том числе трижды негативный рак молочной железы, рак яичника, рак

легкого, миелому, лейкоз, в том числе хронический лимфоцитарный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, неходжкинскую лимфому, в том числе DLBCL, В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмоцитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Было продемонстрировано, что LY75 интернализируется при связывании с антителом, как проиллюстрировано в примерах 5 и 7 ниже, что, таким образом, обеспечивает применение антител по настоящему изобретению в любом механизме действия с нагрузкой, например, в подходе с ADC, в радиоиммуноконъюгате или в подходе ADEPT.

В одном варианте осуществления антитела (например, моноклональные антитела, фрагменты антител, Nanobody®, полиспецифические и биспецифические молекулы и композиции и т.п.) по настоящему изобретению можно применять для выявления уровней LY75 или уровней клеток, которые содержат LY75 на поверхности своей мембраны, для каковых уровней может быть затем установлена связь с определенными симптомами заболеваний. В альтернативном случае антитела, обычно вводимые в виде ADC, можно применять для ингибирования или блокирования функции LY75, для которого, в свою очередь, может быть установлена связь с предупреждением или уменьшением интенсивности определенных симптомов заболевания, что, таким образом, подразумевает LY75 в качестве медиатора заболевания. Этого можно достичь путем приведения образца и контрольного образца в контакт с антителом к LY75 в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом и LY75. В образце и контрольном образце выявляют и сравнивают любые комплексы, образующиеся между антителом и LY75.

В другом варианте осуществления антитела (например, моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и композиции) по настоящему изобретению можно вначале исследовать в отношении активности связывания, связанной с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции по настоящему изобретению можно исследовать с применением анализов по методу проточной цитометрии, описанных в примерах ниже.

Антитела (например, моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы, иммуноконъюгаты и композиции) по настоящему изобретению обладают дополнительной полезностью в терапии и диагностике заболеваний, связанных с LY75. Например, моноклональные антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты можно применять для того, чтобы вызвать *in vivo* или *in vitro* один или более из следующих видов биологической активности: ингибирование роста и/или уничтожение клеток, экспрессирующих LY75; опосредование фагоцитоза или ADCC клеток, экспрессирующих LY75, в присутствии эффекторных клеток человека, или блокирование связывания лиганда LY75 с LY75.

В конкретном варианте осуществления антитела (например, моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и композиции) применяют *in vivo* для лечения, предупреждения или диагностики ряда заболеваний, связанных с LY75. Примеры заболеваний, связанных с LY75, включают, среди прочих, представленные раковыми тканями человека рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак почки, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, миелому, лейкоз, в том числе хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, неходжкинскую лимфому, в том числе DLBCL, В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмоцитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, а также рак легкого.

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

Как было описано ранее, антитела к LY75 по настоящему изобретению можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммунодепрессантом. Антитело может быть связано со средством (в виде иммунного комплекса) или может вводиться отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после введения средства или одновременно с ним или можно вводить совместно с применением других известных видов терапии, например, противораковой терапии, например, лучевой терапии. Такие терапевтические средства включают, среди прочих, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, сульфат блеомицина, кармустин, хлорамбуцил, а также циклофосфамид и гидроксимочевина, которые сами по себе являются эффективными только



на уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в виде дозы 100 мг/кг один раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в виде дозы 60-75 мг/мл один раз в 21 день. Другие средства, подходящие для совместного введения с антителами по настоящему изобретению, включают другие средства, применяемые для лечения форм рака, например, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака яичника или рака легкого, такие как Avastin®, 5FU и гемцитабин. Совместное введение антител к LY75 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два противораковых средства, действующих посредством различных механизмов, которые обеспечивают достижение цитотоксического эффекта в отношении опухолевых клеток человека. Такое совместное введение может решать проблемы, обусловленные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, которое может сделать их не реагирующими с антителом.

Мишень-специфические эффекторные клетки, например эффекторные клетки, связанные с композициями (например, моноклональными антителами, полиспецифическими и биспецифическими молекулами) по настоящему изобретению, также можно применять в качестве терапевтических средств. Эффекторные клетки для целенаправленного воздействия могут представлять собой лейкоциты человека, такие как макрофаги, нейтрофилы или моноциты. Другие клетки включают эозинофилы, естественные клетки-киллеры и другие клетки, несущие рецепторы IgG или IgA. При желании эффекторные клетки можно получить от субъекта, подлежащего лечению. Мишень-специфические эффекторные клетки можно вводить в виде суспензии клеток в физиологически приемлемом растворе. Количество вводимых клеток может составлять порядка  $10^8$ - $10^9$ , но будет варьировать в зависимости от терапевтической цели. Как правило, количество будет достаточным для достижения локализации в целевой клетке, например в опухолевой клетке, экспрессирующей LY75, и для осуществления уничтожения клеток посредством, например, фагоцитоза. Пути введения также могут варьировать.

Терапию с помощью мишень-специфических эффекторных клеток можно проводить в сочетании с другими методиками для устранения целевых клеток. Например, противоопухолевую терапию с применением композиций (например, моноклональных антител, полиспецифических и биспецифических молекул) по настоящему изобретению и/или эффекторных клеток, "вооруженных" этими композициями, можно применять в сочетании с химиотерапией. Дополнительно, можно применять комбинированную иммунотерапию для направления двух различных популяций цитотоксических эффекторных клеток на отторжение опухолевых клеток. Например, антитела к LY75, связанные с антителом к Fc-гамма-RI или антителом к CD3, можно применять в сочетании со связывающими средствами, специфичными к рецепторам IgG или IgA.

Биспецифические и полиспецифические молекулы по настоящему изобретению также можно применять для модулирования FcγR или уровней FcγR на эффекторных клетках, как, например, путем экзопинга и устранения рецепторов на клеточной поверхности. Для этой цели также можно применять смеси антител к Fc-рецепторам.

Композиции (например, моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по настоящему изобретению, которые имеют участки связывания с компонентами системы комплемента, такие как части IgG1, -2 или -3 или IgM, которые связываются с компонентами системы комплемента, также можно применять в присутствии системы комплемента. В одном варианте осуществления обработку *ex vivo* популяции клеток, включающей целевые клетки, связывающим средством по настоящему изобретению и соответствующими эффекторными клетками можно дополнять добавлением системы комплемента или сыворотки крови, содержащей систему комплемента. Фагоцитоз целевых клеток, покрытых связывающим средством по настоящему изобретению, можно улучшить путем связывания с белками системы комплемента. В другом варианте осуществления целевые клетки, покрытые композициями (например, моноклональными антителами, полиспецифическими и биспецифическими молекулами) по настоящему изобретению, также могут подвергаться лизису под действием системы комплемента. В еще одном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению не активируют систему комплемента.

Композиции (например, моноклональные антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) по настоящему изобретению также можно вводить вместе с системой комплемента. В определенных вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены композиции, содержащие антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы и сыворотку крови или систему комплемента. Эти композиции могут быть преимущественными, если система комплемента находится в непосредственной близости к антителам, полиспецифическим или биспецифическим молекулам. В альтернативном случае антитела, полиспецифические или биспецифические молекулы по настоящему изобретению и систему комплемента или сыворотку крови можно вводить по отдельности.

Также в пределах объема настоящего изобретения находятся наборы, содержащие композиции антител по настоящему изобретению (например, моноклональные антитела, биспецифические или полиспецифические молекулы или иммуноконъюгаты) и инструкции по применению. Набор может дополни-

тельно содержать один или более дополнительных реагентов, таких как иммунодепрессивный реагент, цитотоксическое средство или радиотоксичное средство, или одно или более дополнительных антител по настоящему изобретению (например, антитело, обладающее дополняющей активностью, которое связывается с эпитопом на антигене LY75, отличным от такового для первого антитела).

Соответственно, пациентам, получающим лечение с помощью композиций антител по настоящему изобретению, можно дополнительно вводить (до введения антитела по настоящему изобретению, одновременно с ним или после него) другое терапевтическое средство, такое как цитотоксическое или радиотоксичное средство, которое усиливает или увеличивает терапевтический эффект антител.

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

Композиции (например, антитела, полиспецифические и биспецифические молекулы) по настоящему изобретению также можно применять в отношении целевых клеток, экспрессирующих Fc $\gamma$ R или LY75, например, для мечения таких клеток. Для такого применения связывающее средство может быть связано с молекулой, которую можно выявить. Таким образом, в настоящем изобретении представлены способы определения локализации *ex vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, такие как Fc $\gamma$ R, или LY75. Выявляемая метка может представлять собой, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы выявления наличия антигена LY75 в образце или измерения количества антигена LY75, включающие приведение образца и контрольного образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, которые специфично связываются с LY75, в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом или его частью и LY75. Затем выявляют образование комплекса, где различие в образовании комплекса при сравнении между образцом и контрольным образцом свидетельствует о наличии антигена LY75 в образце.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения нарушения, опосредованного LY75, у субъекта, например, форм рака человека, включающих рак желудка, рак почки, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак кожи, рак печени, рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, в том числе трижды негативный рак молочной железы, рак яичника, рак легкого, миелому, лейкоз, в том числе хронический лимфоцитарный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, а также неходжкинскую лимфому, в том числе DLBCL, В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому.

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительные формы рака включают неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, а также трижды негативный рак молочной железы, рак мочевого пузыря и рак поджелудочной железы.

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

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

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

Пример 1. Получение человеческих моноклональных антител против антигена LY75.

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

Специфичность антител, выработанных против LY75, исследовали при помощи проточной цитометрии с использованием клеток НЕК293, трансфицированных LY75, и, впоследствии, с использованием клеток HT29, экспрессирующих LY75. Для того чтобы исследовать способность антител связываться с белком LY75 на клеточной поверхности, антитела инкубировали с клетками, экспрессирующими LY75. Клетки промывали буфером FACS (DPBS, 2% FBS), центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл разведенного первичного антитела к LY75 (также разведенного в буфере FACS). Комплекс антитело-клетки инкубировали на льду в течение 60 мин и затем дважды промывали буфером FACS, описанным выше. Осадок клетка-антитело ресуспендировали в 100 мкл разведенного вторичного антитела (также разведенного в буфере FACS) и инкубировали на льду в течение 60 мин на льду. Осадок промывали, как описано выше, и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS. Образцы загружали в проточный цитометр BD FACScanto II, при этом данные анализировали при помощи программного обеспечения BD FACSDiva (результаты не показаны).

Пример 2. Установление структурных характеристик моноклональных антител к LY75.

Последовательности κДНК, кодирующие переменные области тяжелых и легких цепей моноклонального антитела LY75 A1, получали при помощи стандартных методик ПЦР и секвенировали при помощи стандартных методик секвенирования ДНК.

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

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области тяжелой цепи LY75 A1 показаны под SEQ ID NO: 3 и 1, соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности переменной области легкой цепи LY75 A1 показаны под SEQ ID NO: 4 и 2, соответственно.

Сравнение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина LY75 A1 с известными последовательностями зародышевого типа тяжелой цепи иммуноглобулина человека продемонстрировало, что в тяжелой цепи LY75 A1 используется V<sub>H</sub>-сегмент из V<sub>H</sub> 3-15 человека зародышевого типа и J<sub>H</sub>-сегмент из J<sub>H</sub> JH4 человека зародышевого типа. Дальнейший анализ последовательности V<sub>H</sub> LY75 A1 при помощи системы Kabat для определения области CDR привел к выявлению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, показанных под SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно. Выравнивания последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 V<sub>H</sub> LY75 A1 с последовательностью V<sub>H</sub> 3-15 зародышевого типа и J<sub>H</sub> JH4 зародышевого типа показаны на фиг. 1.

Сравнение последовательности легкой цепи иммуноглобулина LY75 A1 с известными последовательностями зародышевого типа легкой цепи иммуноглобулина человека продемонстрировало, что в легкой цепи LY75 A1 используется V<sub>L</sub>-сегмент из V<sub>L</sub> O12 человека зародышевого типа и J<sub>L</sub>-сегмент из J<sub>L</sub> JK4 человека зародышевого типа. Дальнейший анализ последовательности V<sub>L</sub> LY75 A1 при помощи системы Kabat для определения области CDR привел к выявлению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, показанных под SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно. Выравнивания последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 V<sub>L</sub> LY75 A1 с последовательностями V<sub>L</sub> O12 зародышевого типа и J<sub>L</sub> JK4 зародышевого типа показаны на фиг. 2.

Пример 3. Иммуногистохимическое исследование при помощи моноклонального антитела к LY75.

При помощи человеческого моноклонального антитела, специфичного в отношении LY75, осуществляли иммуногистохимическое исследование с использованием клеточных осадков FFPE HT-29 и A549, матриц с FFPE образцами неходжкинской лимфомы и рака поджелудочной железы и свежемороженых опухолевых образцов лимфомы/лейкоза, срезов рака яичника, рака поджелудочной железы и рака молочной железы и матрицы с нормальными тканями.

Материалы и способы.

Материалы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dual Link EnVision+ HRP-conjugated polymer, Mouse and Rabbit (K4063) от Dako, Калифорния, США. Набор DAB с двумя растворами (882014) от Invitrogen, Нью-Йорк, США.

Гематоксилин Гарриса (23-245-677) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США. Заливочная среда Faramount (S302580) от Dako, Калифорния, США.

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

Получение микропрепаратов FFPE Удаление парафина и регидратация.

Осуществляли удаление парафина из микропрепаратов FFPE в ксилоле (2×3 мин), а затем осуществляли регидратацию с использованием 1:1 ксилол: 100% этанол (1×3 мин), 100% этанол (2×3 мин), 95% этанол (1×3 мин), 70% этанол (1×3 мин), 50% этанол (1×3 мин) и водопроводная вода (1×3 мин).

Получение микропрепаратов FFPE демаскирование антигена (микроволновое излучение).

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

Получение микропрепаратов FF.

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

Получение комплексов антител.

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

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

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

Иммуноокрашивание.

При этом эндогенную тканевую пероксидазную активность блокировали посредством инкубирования тканей с ингибитором пероксидазы в течение 5-10 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали в PBS 3 раза в течение 3 мин для каждой промывки. Ткани инкубировали в SFPB в течение 30 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Конечные окрашивающие комплексы наносили на каждый тканевой срез и/или микроматрицу, и при этом микропрепараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали один раз в PBS и один раз в PBST (PBS+0,125% Tween-20) в течение 3 мин для каждой промывки. Третичное антитело мыши к FITC применяли при концентрации 2 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем срезы промывали один раз в PBS и один раз в PBST в течение 3 мин для каждой промывки. Затем на ткани наносили полимер на основе конъюгированного с HRP антитела кролика к Ig мыши Dual Link EnVision+, и при этом микропрепараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в увлажнительной камере. Затем микропрепараты промывали один раз в PBS, один раз в PBST в течение 3 мин для каждой промывки. Ткани инкубировали в растворе DAB, полученном в соответствии с инструкциями производителя, при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем микропрепараты один раз промывали проточной водопроводной водой в течение 2 мин и один раз в PBS в течение 3 мин. Осуществляли контрастное окраши-

вание микропрепаратов при помощи гематоксилина в течение 30 с при комнатной температуре и промывали проточной водопроводной водой. Микропрепараты сушили при комнатной температуре в течение 30 мин и затем микропрепараты заключали под покровные стекла с использованием заливочной среды Faramount.

Результаты.

LY75 A1 характеризовалось положительным результатом при использовании образцов FFPE трижды негативного рака молочной железы, причем 77% срезов характеризовались положительным окрашиванием и 55% демонстрировали интенсивное (+++) окрашивание.

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

Пример 4. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с PM1, в отношении клеток HT-29.

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

Пример 5. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с PM4, в отношении клеток рака ободочной и прямой кишки.

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

PBS, pH 7,4 (1X) (SP30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

На фиг. 3f показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток В×PC3. На фиг. 3g показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток НupT4. На фиг. 3h показана цитотоксическая активность антител к LY75, конъюгированных с DM1 и DM4, в отношении клеток HPAFFII. Эти результаты демонстрируют увеличение цитотоксической активности, пропорциональное концентрации антител, по сравнению с другими антителами к LY75, конъюгированными с DM1 и DM4 (выбранными из примера 1).

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

Материалы.

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

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

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

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

PBS, pH 7,4 (1X) (SP30028LS) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

Пример 10. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с PM4, в отношении линий клеток рака молочной железы.

Материалы.

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

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

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

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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



## Результаты.

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

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

## Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

## Способ.

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

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

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

## Результаты.

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

Пример 12. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с PM4, в отношении линий клеток рака головы и шеи.

## Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

## Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

вращения испарения. Планшет инкубировали в течение 72 ч при 37°C.

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

Результаты.

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

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

Материалы.

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

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

Среда RPMI1640 (MT-10-041-CM) от Fisher Scientific, Пенсильвания, США.

Cell Titer Glo (G7572) от Promega, Висконсин, США.

Способ.

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

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

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

Результаты.

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

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

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток Raji лимфомы Беркитта.

Иммунодефицитных мышей с SCID подкожно инокулировали опухолевыми клетками Raji (лимфомы Беркитта человека). Опухолям давали возможность развиваться и мышей распределяли в пять групп обработки по 3-6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 129-132 мм на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS));

группа 2 (LY75DM1; 10 мг/кг);

группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг);

группа 4 (LY75 DM4; 5 мг/кг);

группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг).

Вторую дозу вводили спустя одну неделю. Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опу-

холи измеряли два раза в неделю. Мышей эвтаназировали, когда их опухоли достигали конечного показателя объема опухоли 2000 мм или через 60 дней, в зависимости от того, что произошло первым. Эффективность определяли исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до конечного показателя (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых был достигнут конечный показатель, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4а показано, что каждый из LY75 DM1 и LY75 DM4 продемонстрировал значительную противоопухолевую активность и значительно пролонгированное выживание в ксенотрансплантатной модели с клетками Raji лимфомы Беркитта на мышах с SCID по сравнению с контролями; тем не менее дозы 5 мг/кг LY75 DM4 были значительно более эффективными, чем дозы 10 мг/кг LY75 DM1, в результате чего у 5 из 6 мышей наблюдалась полная, но временная регрессия опухоли. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении раковых пациентов с неходжкинской лимфомой человека.

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

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток Namalwa лимфомы Беркитта.

Иммунодефицитных мышей с SCID подкожно инокулировали опухолевыми клетками Namalwa (лимфомы Беркитта человека). Опухолям давали возможность развиваться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 114 мм<sup>3</sup> на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS));

группа 2 (LY75 DM1; 10 мг/кг);

группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг);

группа 4 (LY75 DM4; 5 мг/кг);

группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг).

Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей эвтаназировали, когда их опухоли достигали конечного показателя объема опухоли 2000 мм или через 60 дней, в зависимости от того, что произошло первым. Эффективность определяли исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до конечного показателя (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых был достигнут конечный показатель, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4b показано, что каждый из LY75 DM1 и LY75 DM4 продемонстрировал значительную противоопухолевую активность и пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели с клетками Namalwa лимфомы Беркитта на мышах с SCID по сравнению с контролями; тем не менее доза 5 мг/кг LY75 DM4 была значительно более эффективной, чем доза 10 мг/кг LY75 DM1, причем она приводила к тому, что наблюдалось кратковременное уменьшение объема опухоли. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении раковых пациентов с неходжкинской лимфомой человека.

Пример 18. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с PM4, в ксенотрансплантатных моделях рака поджелудочной железы.

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток HPAFII аденокарциномы поджелудочной железы.

Иммунодефицитных бестимусных голых мышей подкожно инокулировали опухолевыми клетками HPAFII (аденокарциномы поджелудочной железы человека). Опухолям давали возможность развиваться и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя ~114 мм<sup>3</sup> на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS));

группа 2 (LY75 DM1; 10 мг/кг);

группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг);

группа 4 (LY75 DM4; 5 мг/кг);

группа 5 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг).

Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опухоли измеряли три раза в неделю. Мышей эвтаназировали, когда их опухоли достигали конечного показателя объема опухоли 2000 мм или через 90 дней, в зависимости от того, что произошло первым. Эффективность определяли исходя из эффекта обработки на объем опухоли и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы опухолей у контрольных мышей, обработанных наполнителем, и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4с показано, что LY75 DM1 и LY75 DM4 проявляли значительную и аналогичную по силе противоопухолевую активность, и при этом наблюдалось пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели HPAFII на голых мышах по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с раком поджелудочной железы.

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

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением мышам с SCID клеток SW780 карциномы мочевого пузыря человека.

Иммунодефицитных бестимусных голых мышей подкожно инокулировали опухолевыми клетками HPAFII (аденокарциномы поджелудочной железы человека). Опухолям давали возможность развиваться и мышей распределяли в восемь групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя ~114 мм<sup>3</sup> на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

- группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS));
- группа 2 (LY75 DM1; 1 мг/кг);
- группа 3 (LY75 DM1; 2,5 мг/кг);
- группа 4 (LY75 DM1; 5 мг/кг);
- группа 5 (LY75 DM4; 1 мг/кг);
- группа 6 (LY75 DM4; 2,5 мг/кг);
- группа 7 (LY75 DM4; 5 мг/кг);
- группа 8 (изотипический контроль-SPBDDM4; 5 мг/кг).

Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опухоли измеряли три раза в неделю. Мышей эвтаназировали, когда их опухоли достигали конечного показателя объема опухоли 2000 мм или через 90 дней, в зависимости от того, что произошло первым. Эффективность определяли исходя из эффекта обработки на объем опухоли и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы опухолей у контрольных мышей, обработанных наполнителем, и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4d показано, что LY75 DM1 и LY75 DM4 проявляли значительную и аналогичную по силе противоопухолевую активность, и при этом наблюдалось пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели SW780 на голых мышах по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например, LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с раком мочевого пузыря.

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

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток MDA-MB-468.

Иммунодефицитных бестимусных голых мышей подкожно инокулировали опухолевыми клетками MDA-MB-468 (трижды негативной аденокарциномы молочной железы человека). Опухолям давали возможность развиваться и мышей распределяли в семь групп обработки по 10 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 167 мм на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

- группа 1 (наполнитель; 20 mM сукцинат натрия, pH 5,0, 6% трегалоза, 0,04% полисорбат);
- группа 2 (LY75 DM1; 5 мг/кг);
- группа 3 (LY75 DM1; 10 мг/кг);
- группа 4 (LY75 DM4; 5 мг/кг);
- группа 5 (LY75 DM4; 2,5 мг/кг);

группа 6 (LY75 DM4; 1 мг/кг);

группа 7 (изотипический контроль-DM4; 5 мг/кг).

Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей эвтаназировали через 82 дня после инокуляции опухоли. Эффективность определяли исходя из противоопухолевой активности (среднее значение размера опухоли в группе обработки/среднее значение размера опухоли в контрольной группе  $\times 100$ ) и увеличения среднего значения времени до конечного показателя (TTE) у мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. Отбирали образцы пяти самых больших опухолей от контрольных мышей, обработанных наполнителем, в день 71 после инокуляции и обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4е показано, что каждый из LY75 DM1 и LY75 DM4 продемонстрировал существенную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-468 на голых мышах по сравнению с контролями. При использовании LY75 DM4 наблюдали зависимость от дозы активности, причем 2,5 и 5 мг/кг характеризовались намного более сильным эффектом, чем 1 мг/кг. При 5 мг/кг LY75 DM1 и LY75 DM4 характеризовались аналогичной эффективностью. Длительные регрессии среднего значения объема опухоли наблюдали в случае LY75 DM1 при 10 и 5 мг/кг и LY75 DM4 при 5 и 2,5 мг/кг. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с трижды негативным раком молочной железы.

Пример 21. Эффективность моноклональных антител к LY75, конъюгированных с DM1 и конъюгированных с PM4, в ксенотрансплантатных моделях рака ободочной и прямой кишки.

Эффективность LY75 DM1 и LY75 DM4 исследовали в ксенотрансплантатной модели с подкожным введением бестимусным голым мышам клеток COLO205 аденокарциномы ободочной и прямой кишки.

Иммунодефицитных бестимусных голых мышей подкожно инокулировали опухолевыми клетками COLO205 (аденокарциномы ободочной и прямой кишки человека). Опухолям давали возможность развиться, и мышей распределяли в пять групп обработки по 6 мышей на группу. Когда среднее значение объема опухоли достигало среднего показателя 117 мм на группу, каждую группу обрабатывали одним из следующих соединений, вводимых внутривенно при указанных дозах:

группа 1 (наполнитель; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS));

группа 2 (LY75 DM1; 10 мг/кг);

группа 3 (изотипический контроль-DM1; 10 мг/кг);

группа 4 (LY75 DM4; 5 мг/кг);

группа 5 (изотипический контроль-DM4; 5 мг/кг).

Вторую дозу вводили через 12 дней после первой. Отслеживали значения массы тела (BW), мышей часто осматривали для определения состояния здоровья и нежелательных побочных реакций, и при этом опухоли измеряли два раза в неделю. Мышей эвтаназировали, когда их опухоли достигли конечного показателя объема опухоли 1000 мм или через 60 дней, в зависимости от того, что произошло первым. Эффективность определяли исходя из задержки роста опухоли (TGD), увеличения медианного значения времени до конечного показателя (TTE) и исходя из анализа при помощи логарифмического рангового критерия различий по кривым выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных ADC, по сравнению с мышами, обработанными PBS. У первых пяти контрольных мышей, обработанных наполнителем, у которых был достигнут конечный показатель, отбирали образцы опухолей, которые обрабатывали путем фиксации в формалине и заливки парафином.

Результаты.

На фиг. 4f показано, что LY75 DM1 и LY75 DM4 демонстрировали аналогичную небольшую противоопухолевую активность и пролонгирование выживания в ксенотрансплантатной модели COLO205 на голых мышах с аденокарциномой ободочной и прямой кишки по сравнению с контролями. Все обработки были хорошо переносимыми и не наблюдались клинические признаки токсичности. Эти данные позволяют предположить, что ADC, направленные на LY75, например LY75 DM1 и LY75 DM4, могут обеспечивать клиническую пользу при лечении пациентов-людей с раком ободочной и прямой кишки.

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

Шесть самцов обезьяны рандомизировали в исследовании с 2 обезьянами/группа. Наполнитель (PBS), или LY75 DM4 (расщепляемый), или LY75 DM1 (нерасщепляемый) вводили два раза (в день 1 и день 29) посредством внутривенной инфузии продолжительностью 15 мин при 0 мг/кг/доза (PBS, наполнитель), 5 мг/кг/доза (LY75 DM4, расщепляемый) или 10 мг/кг/доза (LY75 DM1, нерасщепляемый). Отбирали образцы крови для токсикокинетических исследований перед началом введения доз (день 1) и через 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 дней после каждой дозы. Отбирали образцы крови для анализов в отношении клинической патологии перед началом введения доз (день 1) и через 1, 3, 7, 14, 21 и 28 дней после каждой дозы (момент времени 28 дней после первой дозы также использовали в качестве момента времени

перед введением дозы для второй дозы). Всех экспериментальных животных эвтаназировали и проводили некропсию после последнего забора крови в день 57. Выделяли плазму, отделенную из каждого образца крови, замораживали и транспортировали в Oxford BioTherapeutics, Inc. для анализа в отношении концентрации ADC при помощи ELISA.

Данные клинической патологии, связанной с обработкой, включали слабовыраженную регенеративную анемию и временные уменьшения количества клеток лейкоцитарного профиля крови, наиболее существенные для количества нейтрофилов. Анемию наблюдали как у животных, обработанных 5 мг/кг LY75 DM4, так и у одного из двух животных, обработанных 10 мг/кг LY75 DM1. Тяжелую нейтропению с максимальным снижением количества нейтрофилов через одну неделю после введения дозы и быстрое восстановление их количества наблюдали у всех животных; при этом максимальное снижение абсолютного количества нейтрофилов было меньшим у животных, обработанных LY75 DM4. Не наблюдали влияния на параметры коагуляции АРТТ и РТ, связанного с исследуемым препаратом. Изменения химического состава сыворотки включали временное повышение уровня AST, СК, LDH (у 1 из 2 животных в каждой группе обработки) и глобулина после введения 5 мг/кг LY75 DM4 и 10 мг/кг LY75 DM1. Кроме того, наблюдали временное повышение уровня фермента ALT, специфичного для печени, только у животных, обработанных LY75 DM4. Небольшая продолжительность и/или величина повышений параметров химического состава сыворотки позволяли предположить, что они не относились к нежелательным явлениям. Отсутствовали данные, связанные с исследуемым препаратом, полученные при помощи анализа мочи. В ходе обследования при некропии после 4-недельного периода восстановления отсутствовали данные клинической патологии, связанные с обработкой, или изменения абсолютных и относительных значений массы органов. Данные гистопатологии только для щитовидной железы (изменение морфологии коллоидного содержимого в фолликулах) и почки (расширенные каналы во внешнем слое коркового вещества) классифицировали как минимальной тяжести; не связанные с изменениями других исследуемых параметров, и не относящиеся к нежелательным явлениям, и имеющие минимальную токсикологическую значимость.

#### Заклучение.

Обработка многократными дозами при двух дозах - 5 мг/кг LY75 DM4 или 10 мг/кг LY75 DM1 хорошо переносилась макаками-крабоедами. Все данные для токсичности, связанной с обработкой, полученные после 4-недельного периода восстановления, указывали на ее обратимый характер.

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

#### Способ.

Клетки COLO205 (ATCC, № в каталоге CCL-222) отделяли от матрасов для тканевых культур при помощи Cell Stripper (Cellgro, № в каталоге MT-25-056CI). Клетки промывали и ресуспендировали в буфере (PBS + 2% FBS), нейтрализовали питательной средой и подсчитывали. Клетки высевали при 50000 клеток/лунку в 96-луночный планшет с лунками с V-образным дном. Клетки промывали один раз буфером FACS (PBS (Fisher, № в каталоге SH30028-03) + 2% FBS). Добавляли mAb к LY75 (выбранное из примера 1) или LY75 A1 в лунки при исходной концентрации 250 нМ, и осуществляли 3-кратные серийные разведения, и вносили в соответствующие лунки в течение 45 мин на льду. Исследуемое содержимое лунок, для которого требовался один или несколько этапов окрашивания, при необходимости выдерживали в буфере FACS для обеспечения одновременного завершения последнего окрашивания для всех исследуемых условий. Содержимое двух лунок с буфером FACS оставляли неокрашенным в качестве контролей.

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

#### Результаты.

На фиг. 5а показано, что блокирование с использованием mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1, приводило к снижению связывания mAb к LY75. Анализ связывания LY75 A1 с клетками COLO205 продемонстрировал, что LY75 A1 неспособно блокировать связывание mAb к LY75, конъюгированного с MCC-DM1 (см. фиг. 5b). Таким образом, можно определить, что mAb к LY75 и LY75 A1 не являются конкурирующими антителами, и при этом LY75 A1 распознает отличный и уникальный эпитоп LY75 по сравнению с другими антителами к LY75.

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

Способ.

Микроматричный анализ с использованием пептидов осуществляли в LC Sciences, Хьюстон, Техас, при этом, вкратце, способ включал следующие этапы: синтезировали непрерывные 8-мерные пептиды белка LY75, перекрывающиеся по одной аминокислоте, охватывающие остатки 216-1666 белка LY75 полной длины, и иммобилизовали на микроматричном чипе. Чип содержал три панели, так что эксперимент проводили в трех повторностях. Микроматрицу исследовали с использованием LY75 A1 для идентификации пептидов, с которыми связывалось антитело. Анализ связывания осуществляли при следующих условиях: микроматрицу, содержащую непрерывные пептиды в трех повторностях, промывали 1 мл буфера для связывания при 4°C в течение 20 мин. Затем ее инкубировали с 1 мкг/мл LY75 A1 в буфере для связывания (pH 7,0) при 4°C в течение 2 ч. Матрицу еще раз промывали 0,5 мл промывочного буфера при 4°C в течение 30 мин, затем инкубировали с 25 нг/мл конъюгата антитела к IgG человека с Alexa 647 в буфере для связывания (pH 7,0) при 4°C в течение 1 ч. Матрицу еще раз промывали 0,5 мл промывочного буфера при 4°C в течение 30 мин.

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

Результаты.

Как показано на фиг. 6, антитело LY75 A1 характеризовалось специфичным связыванием с рядом пептидов, расположенных на матрице. Максимальный уровень сигнала, наблюдаемый для связывания с LY75 A1, составлял 25000 (шкала 1 - 65535), при этом средний уровень сигнала для всех пятен на матрице составлял приблизительно 885. Интенсивность сигнала, равную 3000, устанавливали в качестве точки отсечения фона, обусловленного неспецифичным связыванием. Исходя из наблюдаемого уровня интенсивности сигнала связывания с антителом идентифицировали последовательности, образующие эпитоп для LY75 A1. Эти области показаны на фиг. 6а-6j и под SEQ ID NO: 22-31.

Пример 25. Анализ LY75 A1 с использованием пептидов при помощи методики соосаждения.

Способ.

1.1. Анализ при помощи методики соосаждения.

Рекомбинантный белок LY75 расщепляли путем триптического протеолиза белка, связанного с гранулами (Promega, США). Полученные в результате расщепления пептиды извлекали при помощи C18 колонки для извлечения (Thermo Fisher Scientific). Затем очищенные пептиды инкубировали с 200 мкл гранул белка А, сшитых с антителом LY75 A1, в течение ночи при 4°C. На следующий день отбирали несвязанные пептиды, и при этом гранулы два раза промывали 1 мл PBS. Пептиды, связанные с антителом, элюировали из гранул путем их нагревания при 90°C в 100 мкл PBS в течение 5 мин. Повторяли этот этап элюирования.

1.2. Масс-спектрометрия.

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

1.3. Анализ аминокислотной последовательности пептида.

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

1.4. Распознавание пептидов, ассоциированных с LY75.

В способе идентификации LY75 использовали пептидные последовательности, полученные экспериментальным путем при помощи масс-спектрометрии, как описано выше, встречающихся в природе белков человека для идентификации и упорядочивания кодирующих экзонов в опубликованной геном-



ной последовательности человека. Эти экспериментально определенные последовательности сравнивали с базой данных OGAP®, которая была скомпилирована путем обработки и интеграции множества пептидов, сигнатурных последовательностей пептидов, EST и общедоступных данных геномных последовательностей, как описано в международной патентной заявке WO 2009/087462.

Результаты.

Результаты анализа пептидов при помощи методики соосаждения с использованием антитела LY75 A1 показаны в таблице и на фиг. 7. Пептиды, которые были идентифицированы при обоих элюированиях пептидов 1a и 1b в анализе при помощи методики соосаждения и в микроматричном анализе, считались наиболее вероятными кандидатами для образования эпитопа.

Сравнение экспериментов с микроматричным анализом пептидов и соосаждением пептидов

Пептид, идентифицированный при помощи микроматричного анализа	Пептид, идентифицированный при помощи анализа с использованием методики соосаждения
Область 1 (аминокислоты 609-618)	-
Область 2 (аминокислоты 651-662)	-
Область 3 (аминокислоты 761-780)	GWHFYDDR (765-772)
Область 4 (аминокислоты 883-901)	ISEWPIDDHFTYSR (877-890) FPVTFGEECLYMSAK (896-910)
Область 5 (аминокислоты 1029-1040)	ELTYSNFHPLLVSQR (1030-1044)
Область 6 (аминокислоты 1077-1093)	HFVSLCQK (1084-1091)
Область 7 (аминокислоты 1107-1118)	QTLQNASETVK (1099-1109)
Область 8 (аминокислоты 1368-1378)	-
Область 9 (аминокислоты 1518-1528)	-
Область 10 (аминокислоты 1535-1554)	-

В таблице показано, что ряд перекрывающихся областей пептидов LY75 был идентифицирован как в микроматричном анализе пептидов, так и при обоих элюированиях 1a и 1b в анализе пептидов при помощи методики соосаждения. Считалось, что эти области наиболее вероятно содержат эпитоп, распознаваемый антителом LY75 A1, поскольку они связываются с LY75 A1 при исследовании с помощью обеих используемых методик.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с лимфоцитарным антигеном 75 (LY75), при этом указанное антитело содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

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

б) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

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

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, дополнительно содержащие ковалентно присоединенное лекарственное средство, выбранное из группы, включающей майтанзиноид, доластатин, гемиастерлин, ауристин, трихотен, калихеамицин, CC1065 и их производные.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.3, где указанное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, включающей DM4 и DM1.

5. Выделенное антитело по п.1 или 2, где указанное антитело вызывает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

6. Выделенное антитело по п.5, характеризующееся повышенным связыванием с Fc-рецепторами и/или повышенной эффективностью в отношении ADCC.

7. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из предыдущих пунктов вместе с одним или более фармацевтически приемле-

мыми разбавителями, наполнителями или носителями.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6.

10. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами, и/или нуклеиновую кислоту по п.9, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами.

11. Клетка-хозяин для получения антитела по любому из пп.1-6, содержащая:

(i) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами, и нуклеиновую кислоту по п.9, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами; или

(ii) первый вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами, и второй вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.9, функционально связанную с одним или более регуляторными элементами.

12. Способ получения антитела или его антигенсвязывающей части, включающий культивирование клетки-хозяина по п.11 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части.

13. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6.

14. Способ по п.13, где антитело или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.

15. Способ по п.13 или 14, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство, где лекарственное средство выбрано из группы, включающей майтанзиноид, доластатин, гемиастерлин, ауристин, трихотецен, калихеамицин, CC1065 и их производные.

16. Способ по п.15, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой DM4.

17. Способ по п.13, где антитело вызывает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

18. Способ по любому из пп.13-17, где указанный рак выбран из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак кожи, рак щитовидной железы, рак легкого, рак почки, рак печени, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак желудка, лейкоз, предпочтительно острый миелоидный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз, миелому, предпочтительно множественную миелому, и лимфому, предпочтительно диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому.

19. Способ по п.18, где рак выбран из группы, включающей рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, трижды негативный рак молочной железы и DLBCL.

20. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 в лечении рака.

21. Применение по п.20, где антитело или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.

22. Применение по п.20 или 21, где антитело или антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.

23. Применение по п.22, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, предпочтительно DM4.

24. Применение по п.20, где антитело вызывает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

25. Применение по любому из пп.20-24, где указанный рак выбран из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак кожи, рак щитовидной железы, рак легкого, рак почки, рак печени, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак желудка, лейкоз, предпочтительно острый миелоидный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз, миелому, предпочтительно множественную миелому, и лимфому, предпочтительно диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную

лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому.

26. Применение по п.25, где рак выбран из группы, включающей рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, трижды негативный рак молочной железы и DLBCL.

27. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-6 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

28. Применение по п.27, где антитело или его антигенсвязывающая часть интернализируются клеткой, экспрессирующей LY75.

29. Применение по п.27 или 28, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство.

30. Применение по п.29, где ковалентно присоединенное конъюгированное лекарственное средство представляет собой майтанзиноид.

31. Применение по п.30, где майтанзиноид представляет собой DM4.

32. Применение по п.27, где антитело вызывает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

33. Применение по любому из пп.27-32, где указанный рак выбран из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак пищевода, рак кожи, рак щитовидной железы, рак легкого, рак почки, рак печени, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак желудка, лейкоз, предпочтительно острый миелоидный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз, миелому, предпочтительно множественную миелому, и лимфому, предпочтительно диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), В-клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами, лимфому Беркитта, лимфоплазмочитарную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, Т-клеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому.

34. Применение по п.33, где рак выбран из группы, включающей рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, трижды негативный рак молочной железы и DLBCL.

```

SEQ ID No: 11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 1      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 12      -----
                    *****;*****
SEQ ID No: 11      DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTTTT---
SEQ ID No: 1      DYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 12      -----
                    *****;*****

```

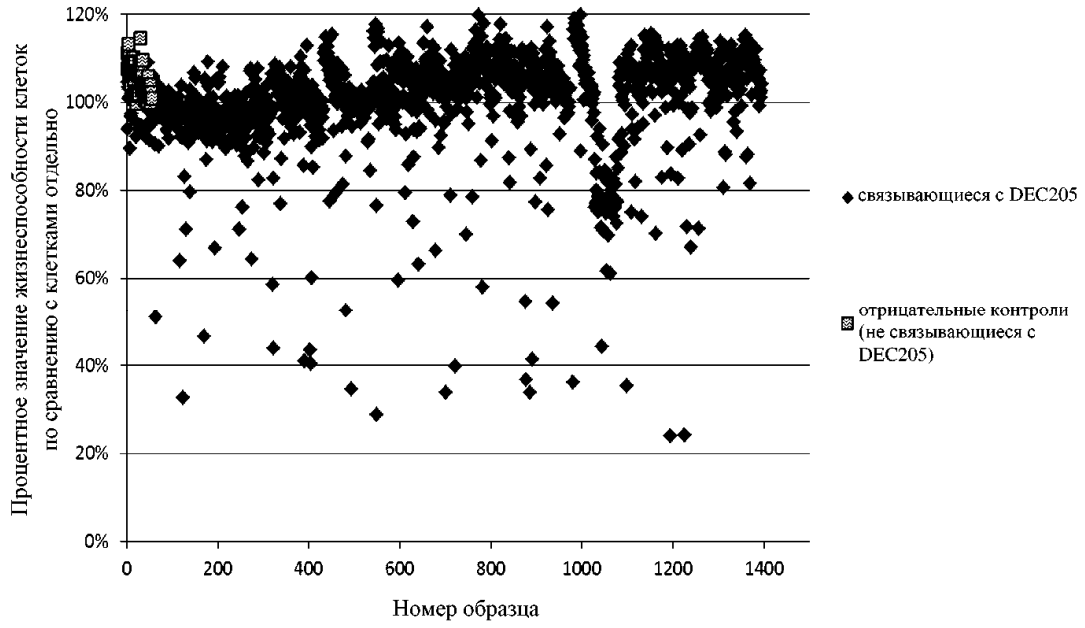
Фиг. 1

```

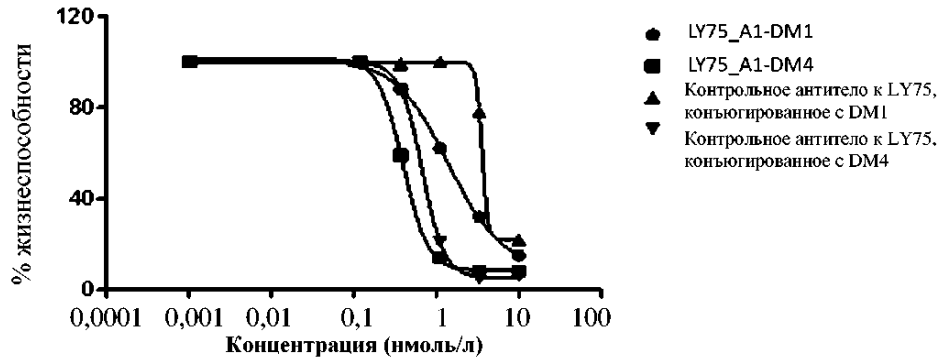
SEQ ID No: 2      DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISDYLSWYQQRPGKAPNLLIYAASNLTGVPS
SEQ ID No: 13      DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISSYLNWYQQRPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
SEQ ID No: 14      -----
                    *;***** ** *;***** *; ****
SEQ ID No: 2      RFGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQQSYRSPWTFGQGTKVEIKR
SEQ ID No: 13      RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS-----
SEQ ID No: 14      -----WTFGQGTKVEIKR
                    *****;*****

```

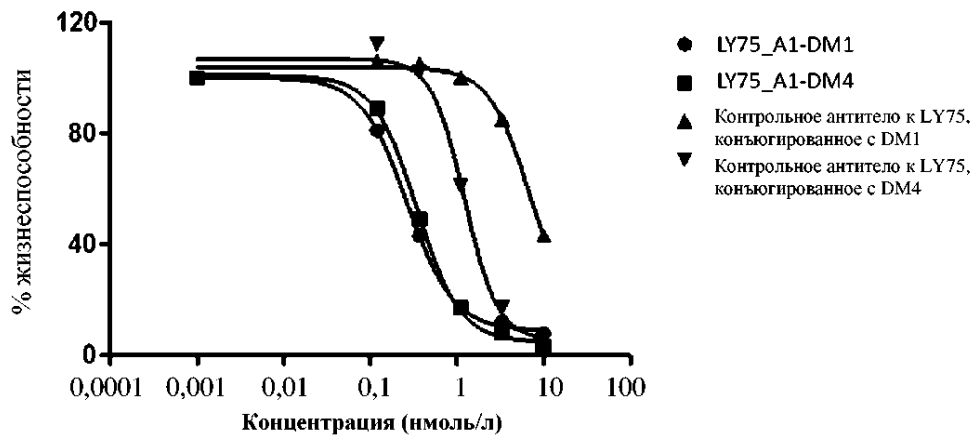
Фиг. 2



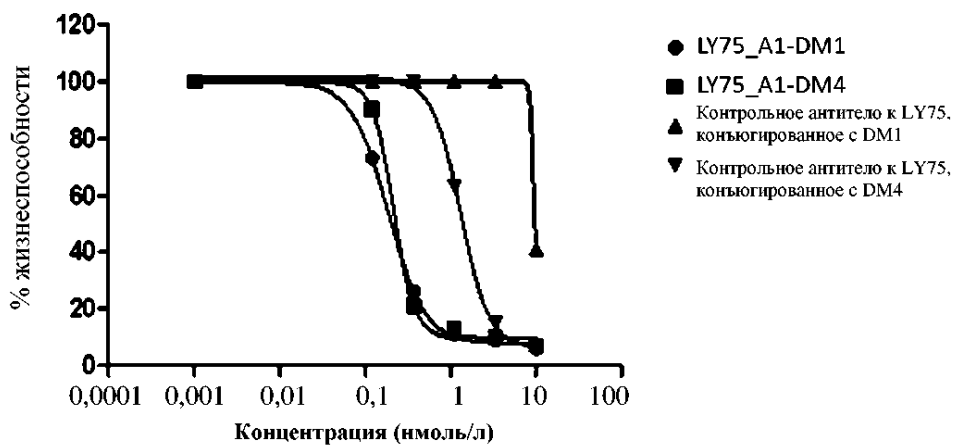
Фиг. 3а



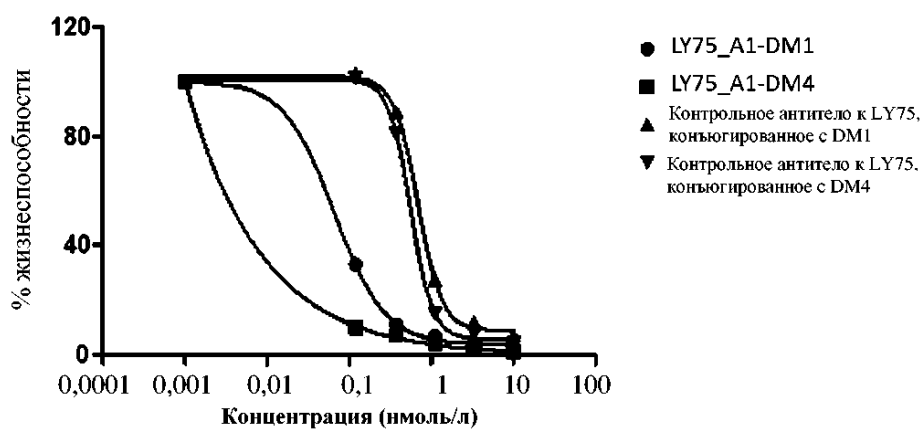
Фиг. 3b



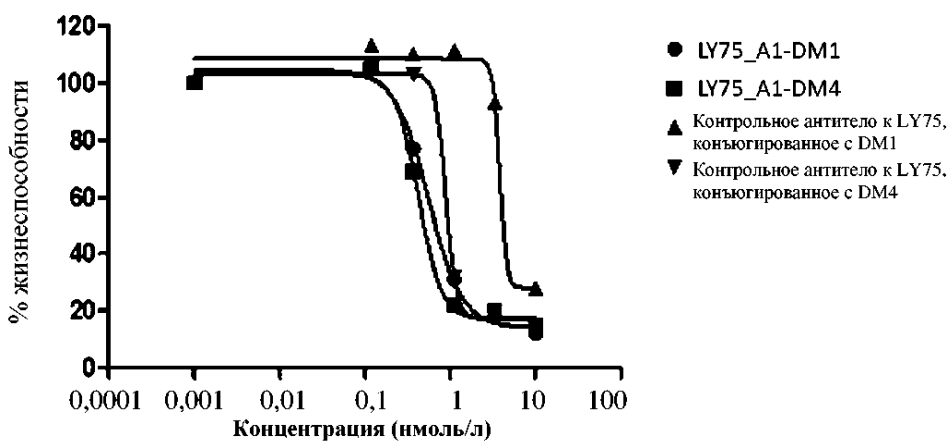
Фиг. 3с



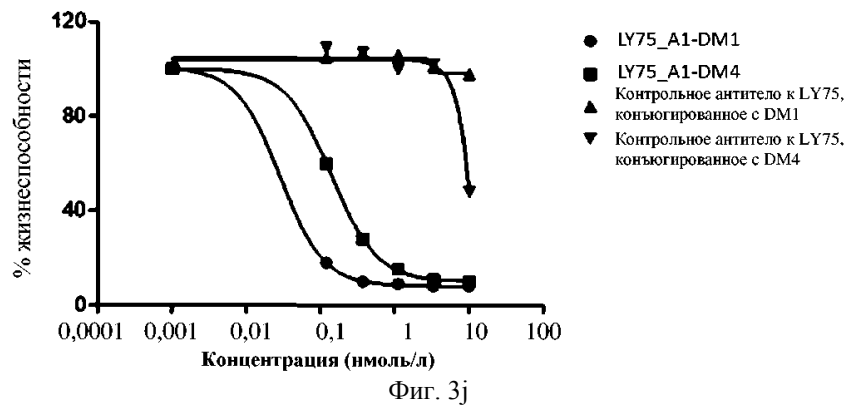
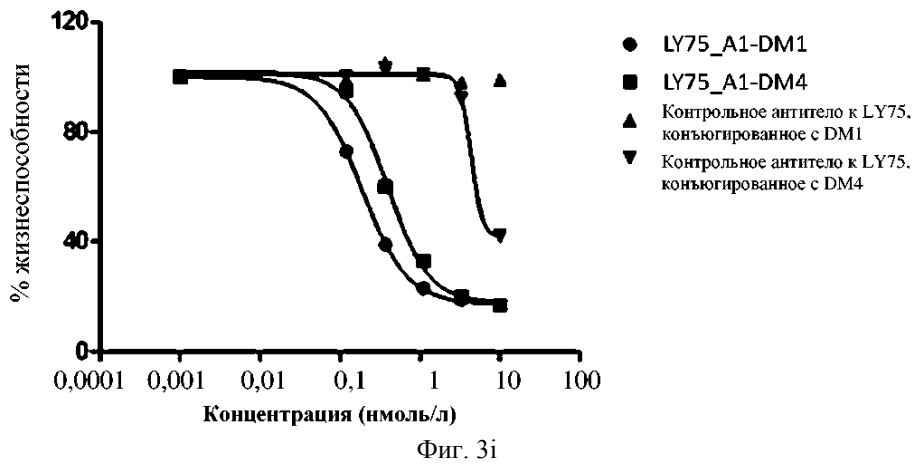
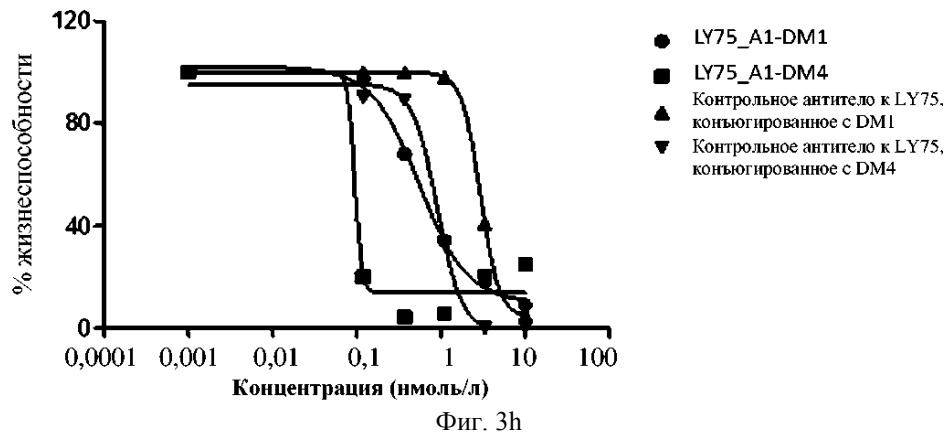
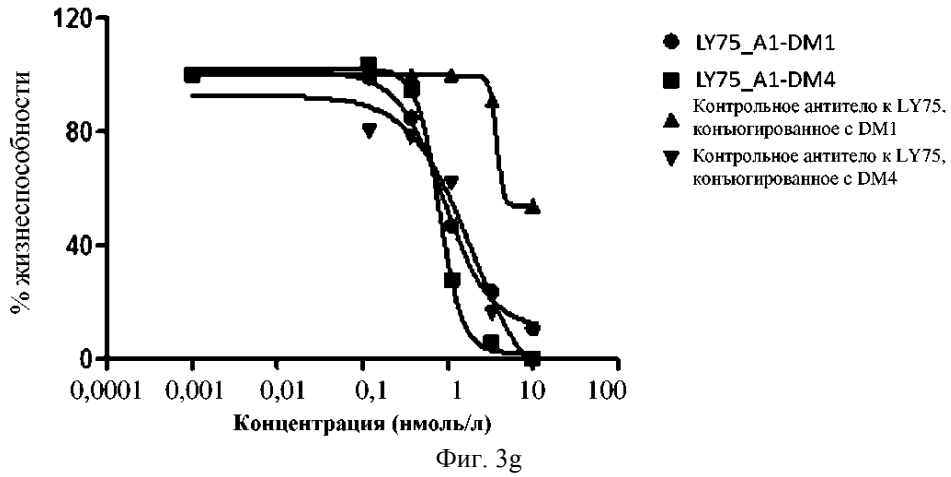
Фиг. 3d

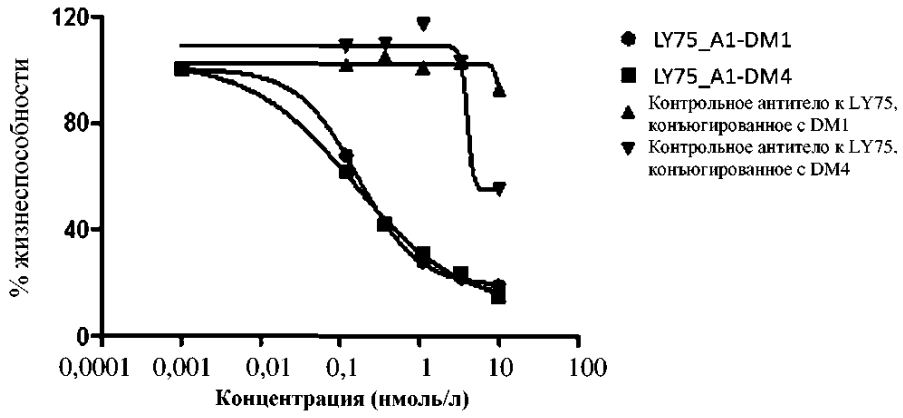


Фиг. 3e

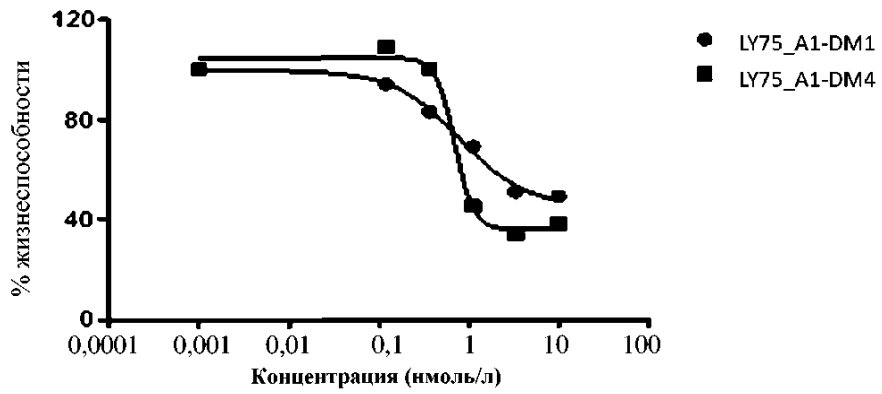


Фиг. 3f

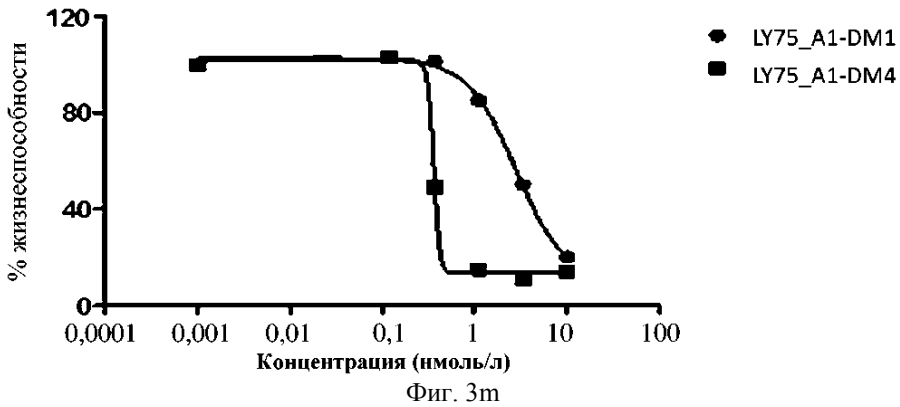




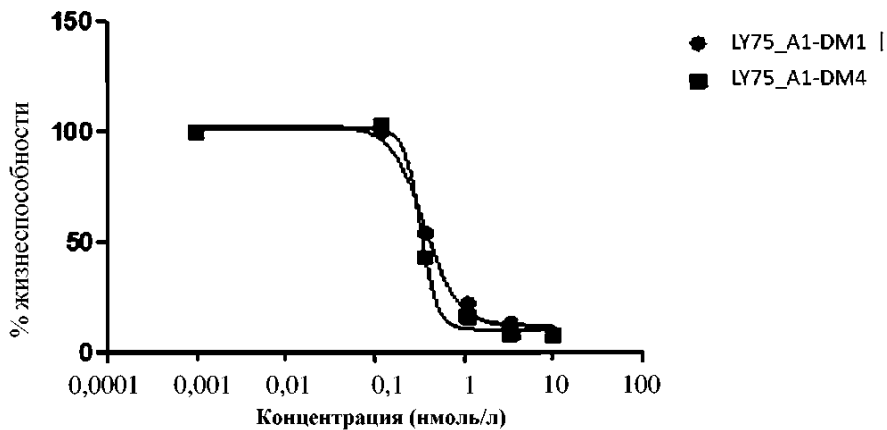
Фиг. 3к



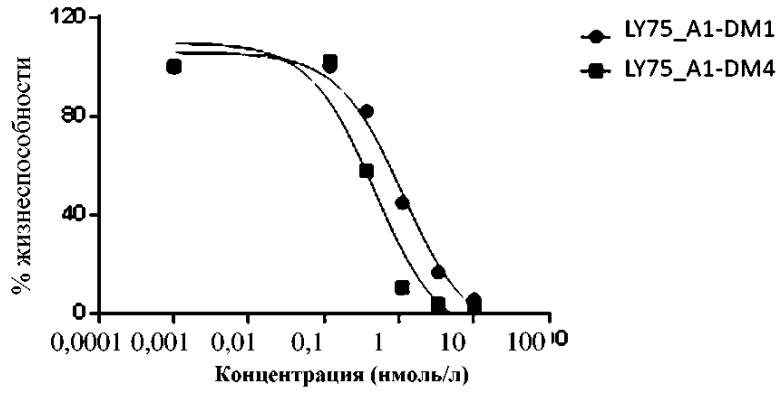
Фиг. 3л



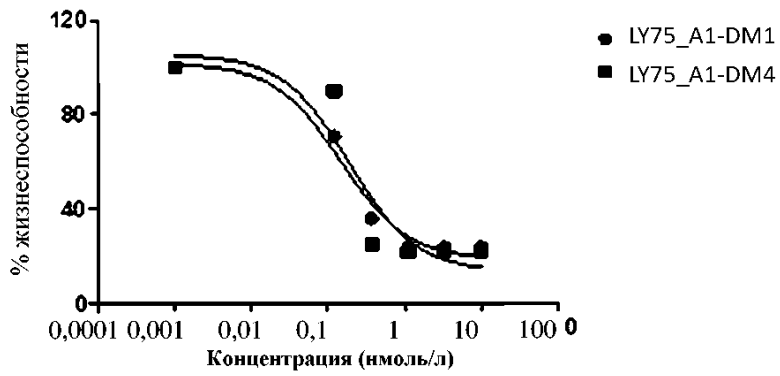
Фиг. 3м



Фиг. 3н



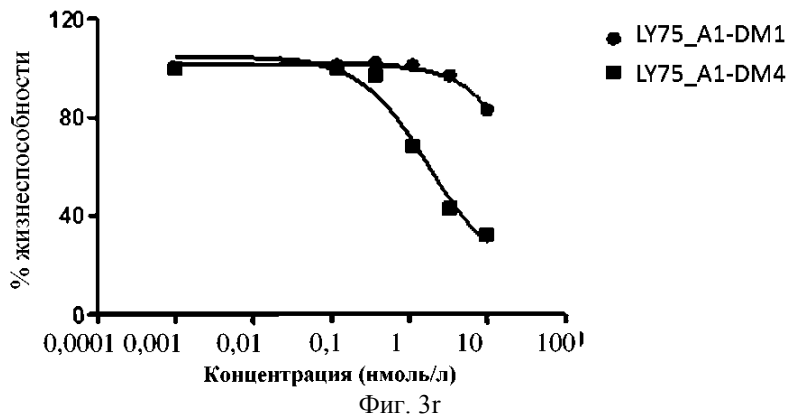
Фиг. 3o



Фиг. 3p

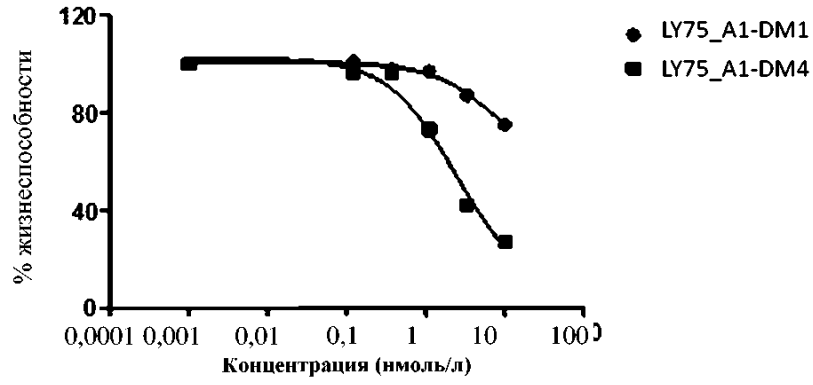


Фиг. 3q

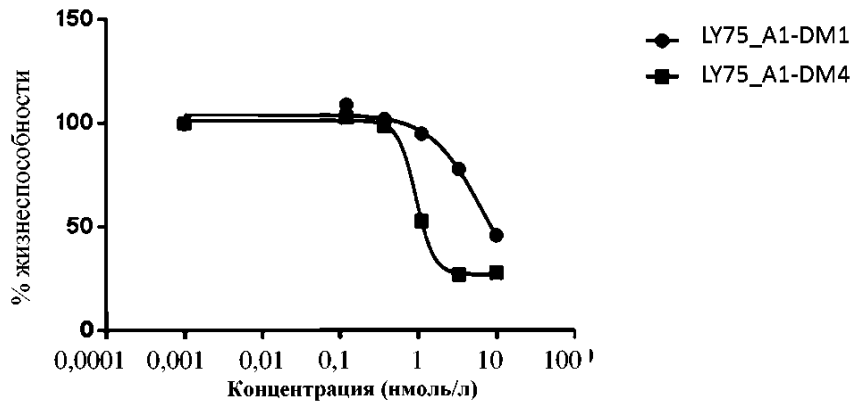


Фиг. 3r

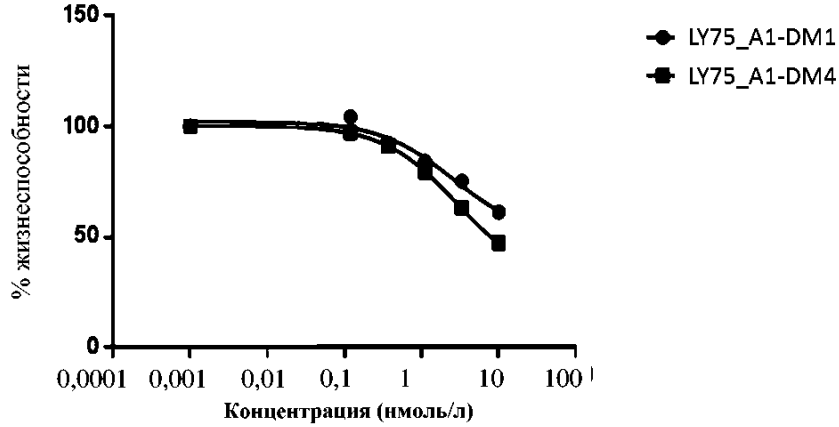




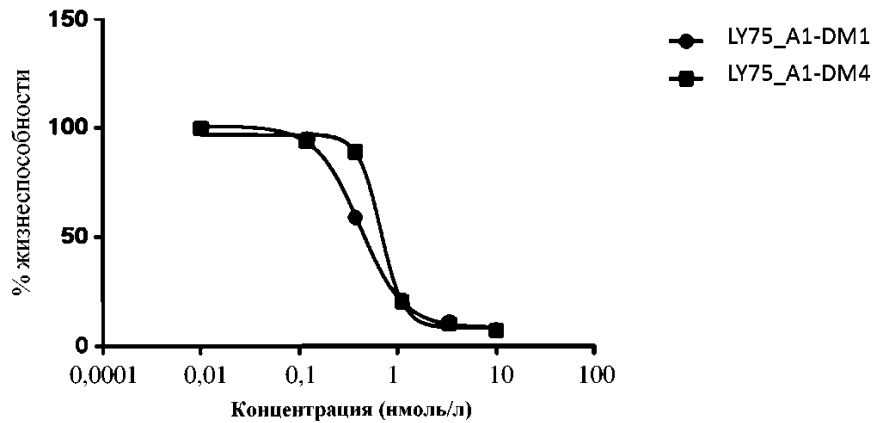
Фиг. 3s



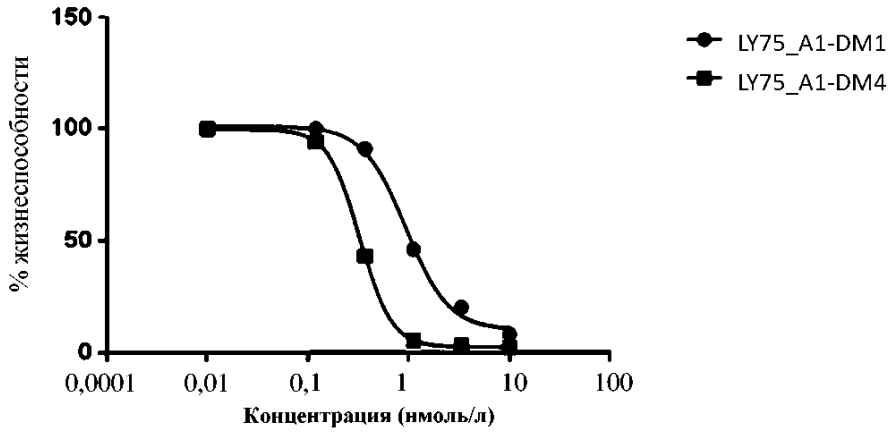
Фиг. 3t



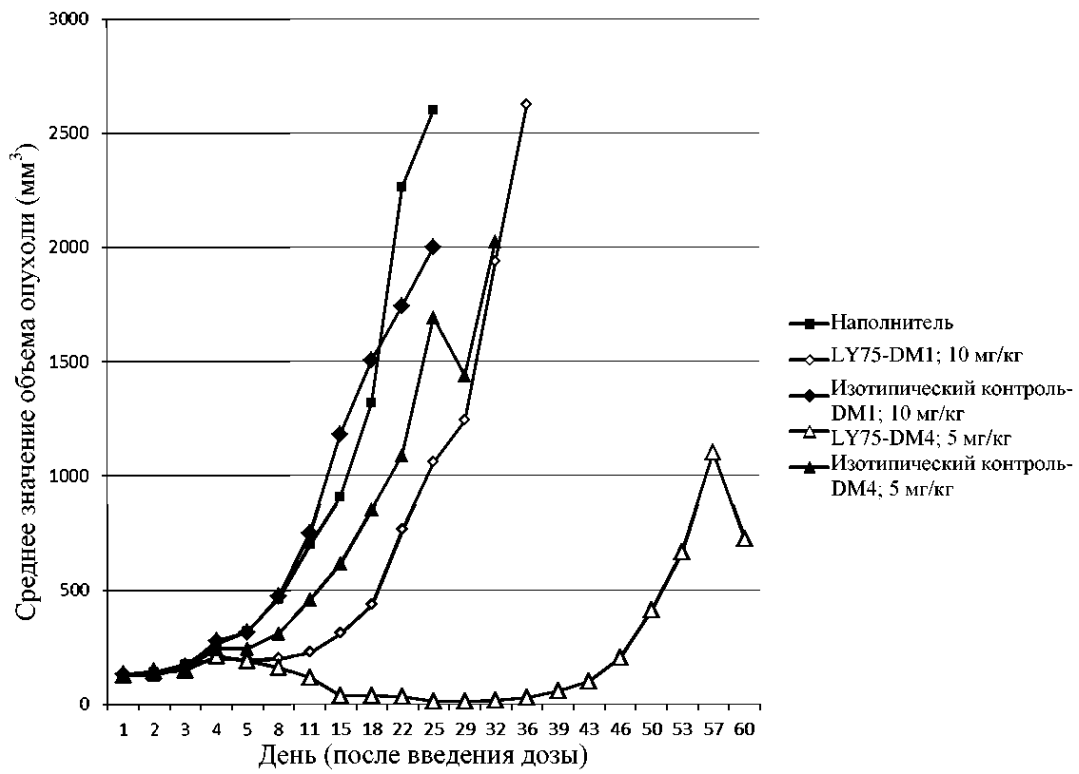
Фиг. 3u



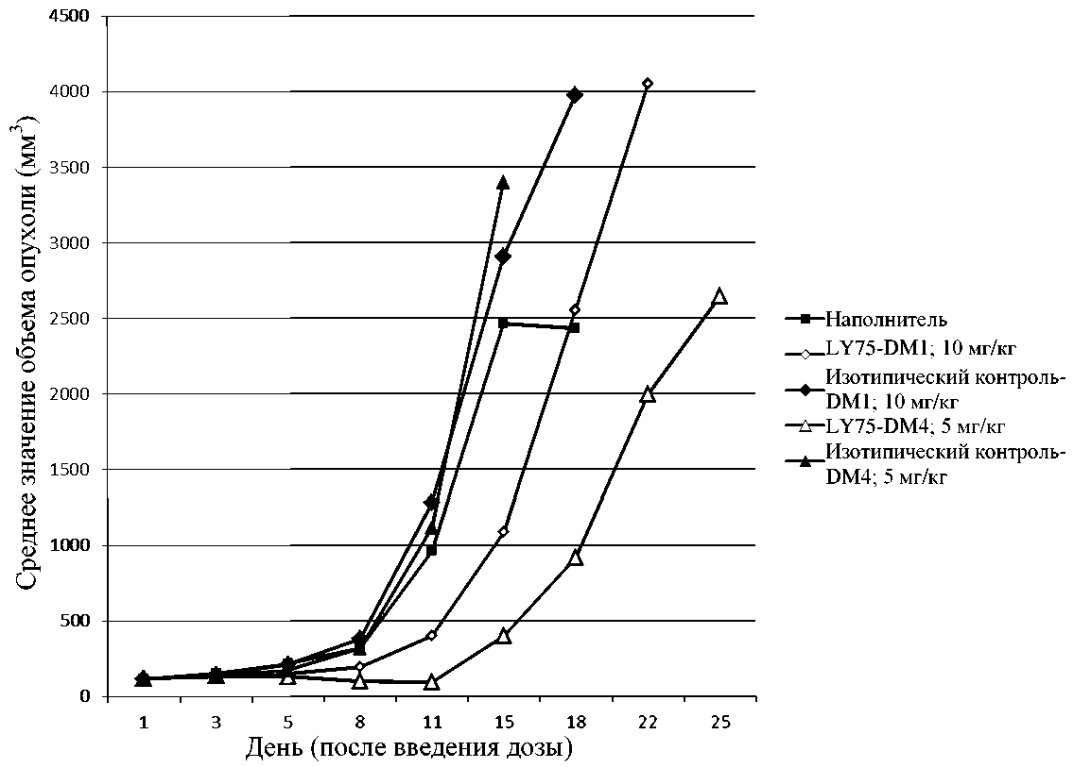
Фиг. 3v



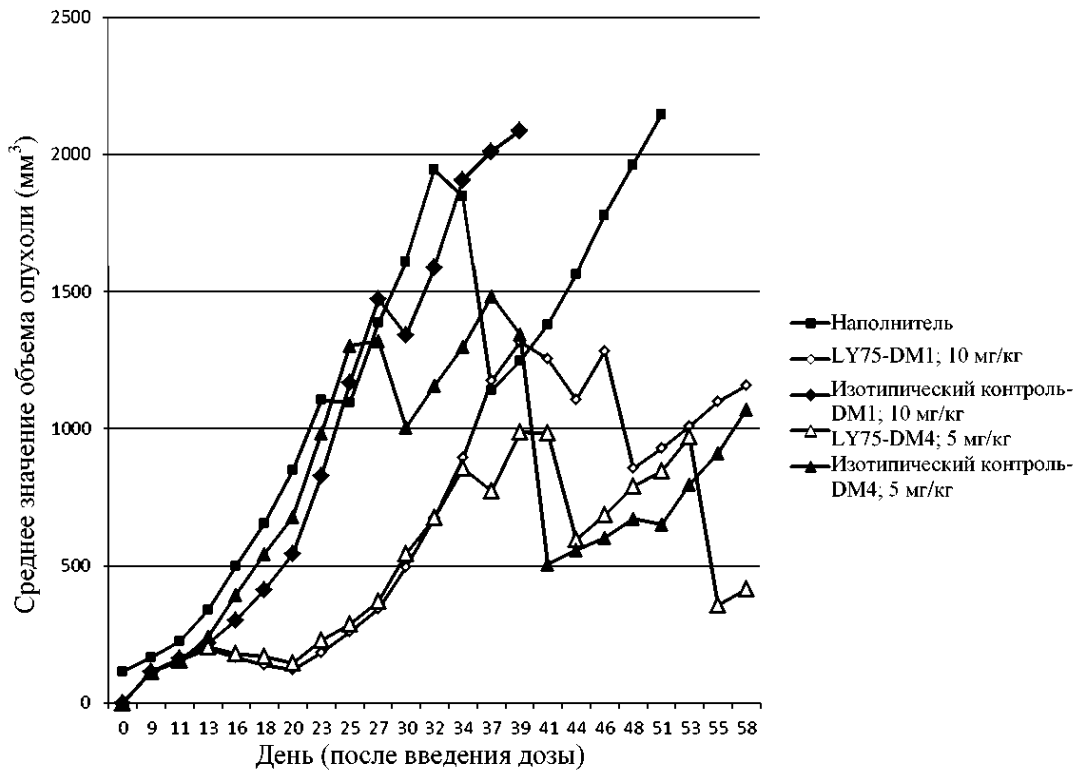
Фиг. 3w



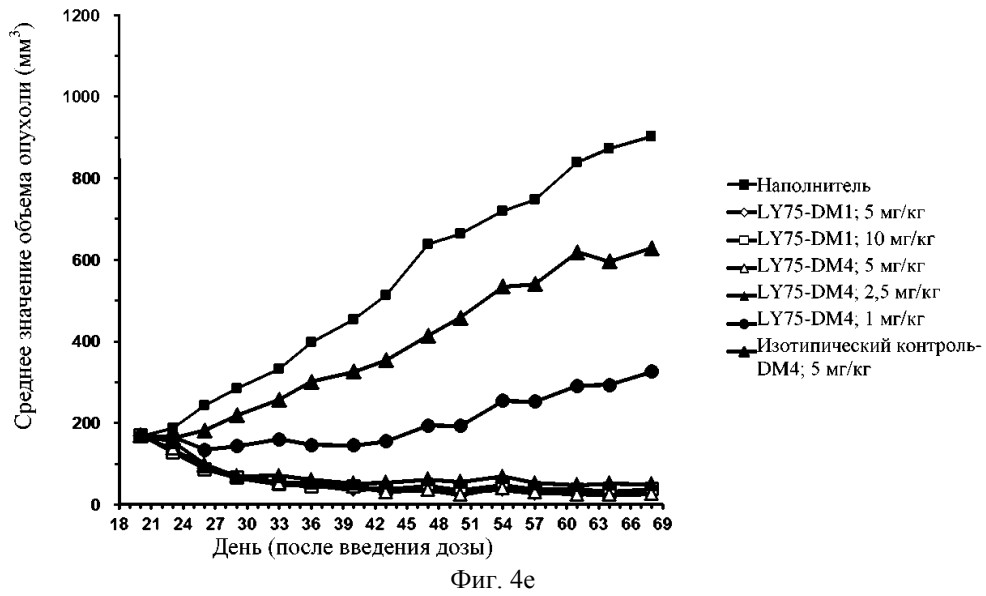
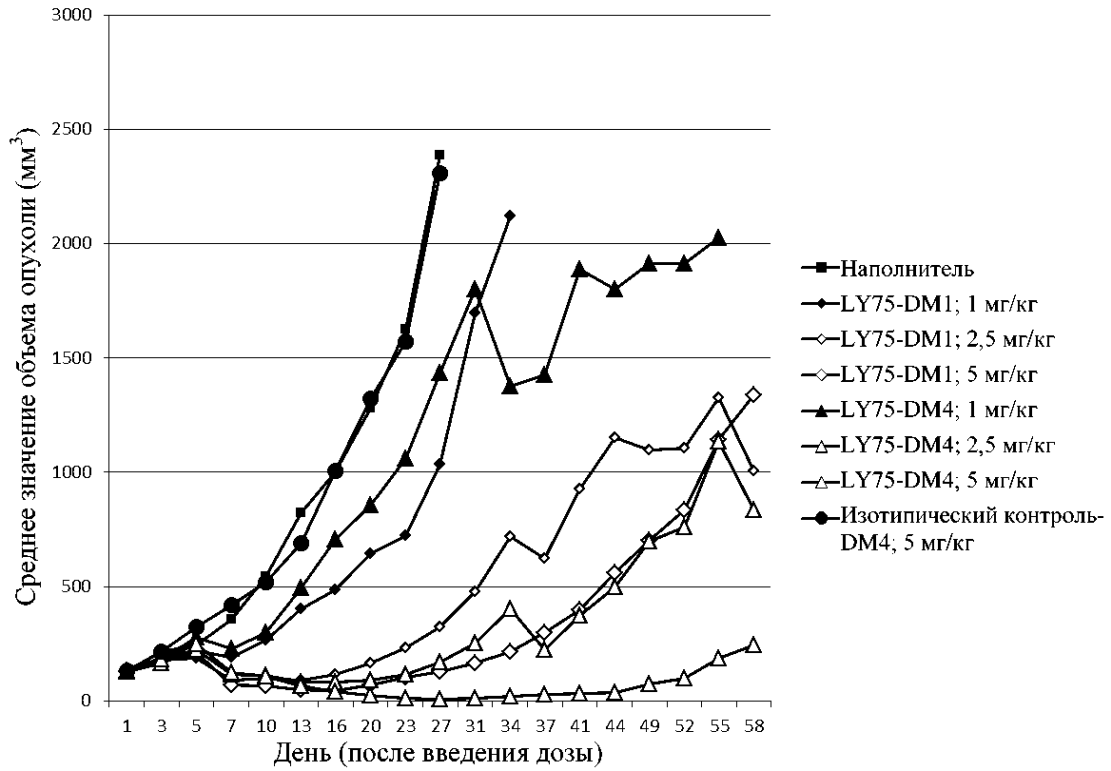
Фиг. 4a

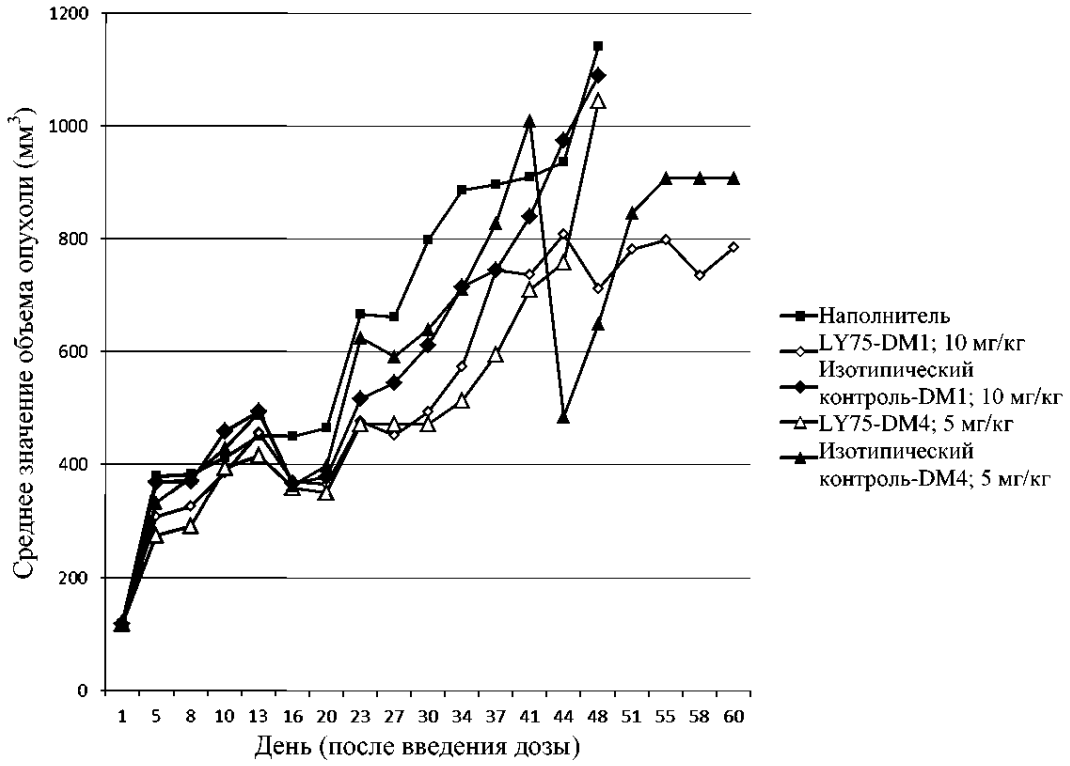


Фиг. 4b



Фиг. 4c





Фиг. 4f

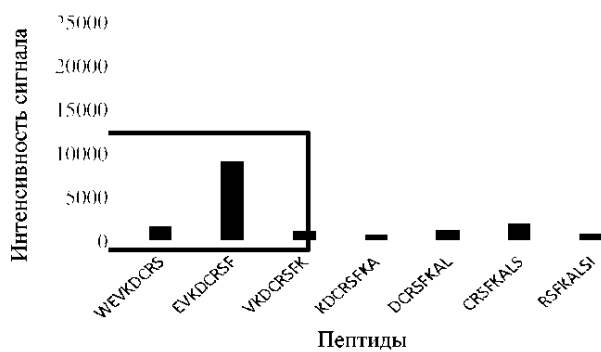


Фиг. 5a



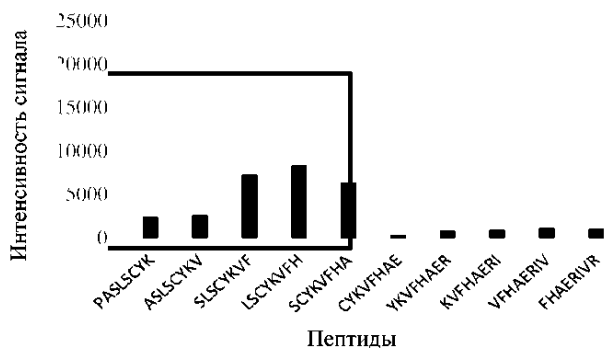
Фиг. 5b

Область 1



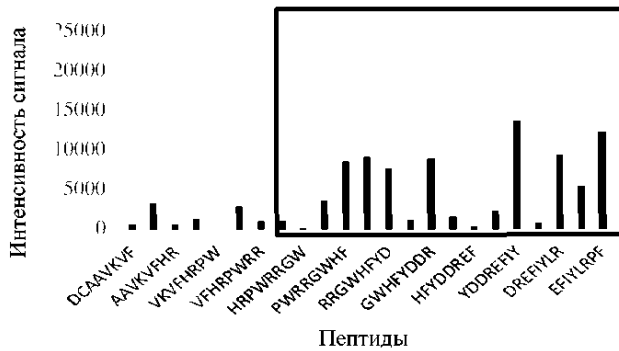
Фиг. 6a

Область 2



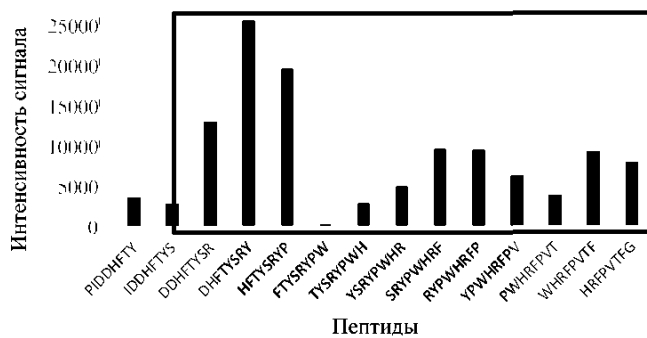
Фиг. 6b

Область 3



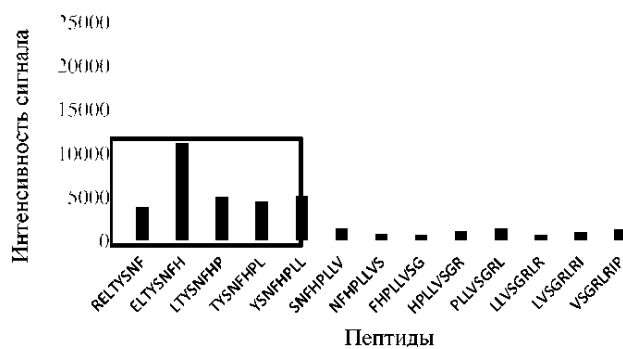
Фиг. 6c

Область 4



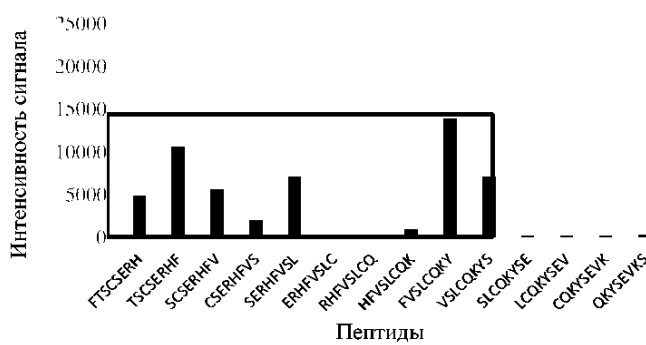
Фиг. 6d

Область 5



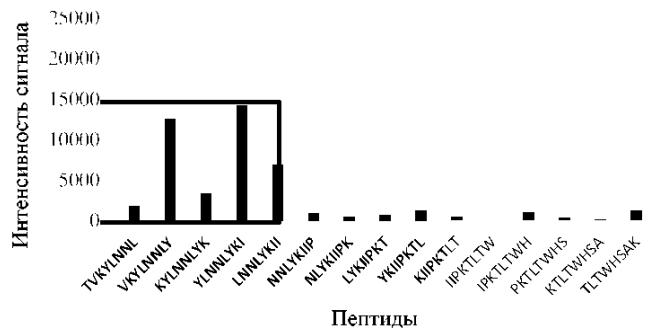
Фиг. 6e

Область 6



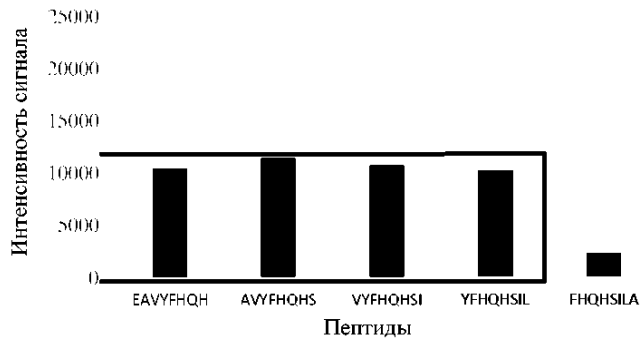
Фиг. 6f

Область 7



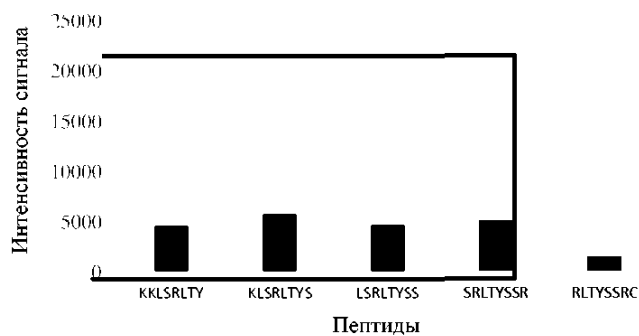
Фиг. 6g

Область 8



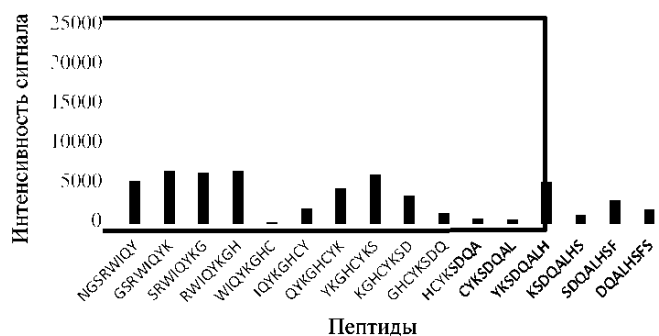
Фиг. 6h

Область 9



Фиг. 6i

Область 10



Фиг. 6j



```

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | MRTGWATPRRPAGLLMLLFFFDLAEPSSGRAANDPFTIVHGNTGKCIKPVYGWIVADDCD | 60
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----CIKPVYGWIVADDCD
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | ETEDKLWKVWSQHRLFLHLSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWVKCEHHSLYGAAR | 120
MS-пептиды_элюирование | 1a | ETEDKLWK-----CEHHSLYGAAR
MS-пептиды_элюирование | 1b | ETEDKLWK-----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | YRLALKDGHGTAINASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNSYGRPCFFFLIDGTWH | 180
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----DGHGTAINASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----KGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
LC-пептиды | -----DGHGTAINASDVWVK-----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | HDCILDEDHSGPWCATTLNVEYDRKKGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSW | 240
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----WGICLKPENGCEDNWEK-----
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | KEAVVSCQNQGADLLSINSAEELTYLKEKEGIAKI FWIGLNQLYSARGWENSDHKPLNFL | 300
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | NWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCQAQLPYVCRKPLNNTVELTDVWTYSRTR | 360
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | CDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHARCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEE | 420
MS-пептиды_элюирование | 1a | -----LHNEDIKEE
MS-пептиды_элюирование | 1b | -----LHNEDIKEE
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | VWIGLKNINIPTLFQWSDGTEVTLTYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGELGQWKVQSCEEK | 480
MS-пептиды_элюирование | 1a | VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-пептиды_элюирование | 1b | VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-пептиды_элюирование | 2a | -----
MS-пептиды_элюирование | 2b | -----
LC-пептиды | -----

```

```

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | LKYVCKRRKGEKLNDASSDKMCPDEGWKRHGETCYKIYEDEVFPFGTNCNLTITSRFEQEY | 540
MS-пептиды_элюирование 1a | -----
MS-пептиды_элюирование 1b | -----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | LNDLMKKYDKSLRKYFWTGLRDVDSGGEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLEPASPGGCVAM | 600
MS-пептиды_элюирование 1a | -----YFWTGLRDVDSGGEYNWATVGGR-----
MS-пептиды_элюирование 1b | -----YFWTGLRDVDSGGEYNWATVGGR-----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----YFWTGLRDVDSGGEYNWATVGGR-----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----YFWTGLRDVDSGGEYNWATVGGR-----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | STGKSVGKWEVKDCRSFKALSICKRMSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFPAASLSCYKVF | 660
MS-пептиды_элюирование 1a | ---SVGKWEVKDCR---ALSICKK---
MS-пептиды_элюирование 1b | -----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | -----WEVKDCRSFK-----PASLSCYKVF

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | HAERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKFPLHFLTDQFSGQHNLWIGLNKRSP | 720
MS-пептиды_элюирование 1a | -----RNWEEAER-----RSP
MS-пептиды_элюирование 1b | -----RNWEEAER-----RSP
MS-пептиды_элюирование 2a | -----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | HA-----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPF | 780
MS-пептиды_элюирование 1a | -----TPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-пептиды_элюирование 1b | DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----GWHFYDDR-----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | -----PWRRGWHFYDDREFIYLRPF

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | ACDTKLEWVCQIPKGRTPKTPDWNPDRAIGHGPPLIIEGSEYWFVADLHLNYEEAVLYC | 840
MS-пептиды_элюирование 1a | -----
MS-пептиды_элюирование 1b | -----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | -----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | ASNHSFLATITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYFWHRFPVTF | 900
MS-пептиды_элюирование 1a | -----ISEWPIDDHFTYSR-----FPVTF
MS-пептиды_элюирование 1b | -----ISEWPIDDHFTYSR-----
MS-пептиды_элюирование 2a | -----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----
LC-пептиды | -----DDHFTYSRYFWHRFPVTF
*****

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | GEECLYMSAKTWLIDLKPTDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYSKSPDAAKVCSEQWIPFQN | 960
MS-пептиды_элюирование 1a | GEECLYMSAKTWLIDLKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-пептиды_элюирование 1b | -----TWLIDLKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-пептиды_элюирование 2a | -----TWLIDLKPTDCSTK-----
MS-пептиды_элюирование 2b | -----TWLIDLKPTDCSTK-----
LC-пептиды | G-----

sp | 1060449 | LY75_ЧЕЛОВЕК | KCFLKIKPVSLTFSQASDTCCHSYGGTLPSVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYE | 1020
MS-пептиды_элюирование 1a | -----

```

```

MS-пептиды_элюирование 1b -----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК KINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGLRLIPENFFEEESRYHCALILNLQKSPFTGTW[FTSC] 1080
MS-пептиды_элюирование 1a K-----ELTYSNFHPLLVSGLRLIPENFFEEESRYHCALILNLQK-----
MS-пептиды_элюирование 1b K-----YHCALILNLQK-----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----RELTYSNFHPLL-----[FTSC]

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК [SERHFVSLCQK]YSEVKSRQTLQNA[TVKYLNNLYKI]PKTLTWHSKRECLKSNMQLVS 1140
MS-пептиды_элюирование 1a --[HFVSLCQK]-----QTLQNA[TVK]-----TLTWHSK-----
MS-пептиды_элюирование 1b --[HFVSLCQK]-----QTLQNA[TVK]-----TLTWHSK-----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды [SERHFVSLCQKYS]-----[TVKYLNNLYKI]-----
*****
***

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК ITDPYQQAFLSVQALLHNSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWAETNGQLEDCVVL 1200
MS-пептиды_элюирование 1a -----
MS-пептиды_элюирование 1b -----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК DTDGFWKTVDNNDNQPGAICYSGNETEKEVKPVD[SVKCPSPV]LNT[PWIPFQ]NCCYNFII 1260
MS-пептиды_элюирование 1a -----
MS-пептиды_элюирование 1b -----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК TKNRHMATTQDEVHTKQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFN[MYMASWV]MLGITYRN 1320
MS-пептиды_элюирование 1a -----SHILSIR-----
MS-пептиды_элюирование 1b --NRHMATTQDEVHTK-----SHILSIR-----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК KSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFK[VIIEAVYFHQ]HSILAC 1380
MS-пептиды_элюирование 1a -SLMWFDKTPLSYTHWR-----
MS-пептиды_элюирование 1b -SLMWFDK-----
MS-пептиды_элюирование 2a -SLMWFDK-----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----EAVYFHQHSIL--

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК KIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQK[KV]TWYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLF 1440
MS-пептиды_элюирование 1a -----
MS-пептиды_элюирование 1b -----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК LEDIVKRDGFFLWVGLSSHGSESSFEWSDGSTFDYI[PWK]QTSPGNCVLLDPKGTWKHE 1500
MS-пептиды_элюирование 1a -----
MS-пептиды_элюирование 1b -----
MS-пептиды_элюирование 2a -----
MS-пептиды_элюирование 2b -----
LC-пептиды -----

```

```

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК      KCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWIQYKGHCYKSDQALHSFSEAK 1560
MS-пептиды_элюирование 1a  -----
MS-пептиды_элюирование 1b  -----
MS-пептиды_элюирование 2a  -----
MS-пептиды_элюирование 2b  -----
LC-пептиды                   -----KKLSRLTYSS-C----NGSRWIQYKGHCYKSDQALH-----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК      KLCCKHDHSATIVSIKDEDEKDFVSRMLRENNTMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVT 1620
MS-пептиды_элюирование 1a  ----HDHSATIVSIKDEDEKDFVSR-----
MS-пептиды_элюирование 1b  ----HDHSATIVSIKDEDEKDFVSR-----
MS-пептиды_элюирование 2a  ----HDHSATIVSIKDEDEKDFVSR-----
MS-пептиды_элюирование 2b  -----
LC-пептиды                   -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК      FVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFRVVKVPLGPDYTAIAIIVATLSIL 1680
MS-пептиды_элюирование 1a  -----VECEHGFR-----
MS-пептиды_элюирование 1b  -----VECEHGFR-----
MS-пептиды_элюирование 2a  -----
MS-пептиды_элюирование 2b  -----
LC-пептиды                   -----

sp |060449| LY75_ЧЕЛОВЕК      VLMGGLIWFLPQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNDEIMLPSEHD 1722
MS-пептиды_элюирование 1a  -----
MS-пептиды_элюирование 1b  -----
MS-пептиды_элюирование 2a  -----
MS-пептиды_элюирование 2b  -----
LC-пептиды                   -----

```

Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2